

**Universidad del País Vasco/
Euskal Herriko Unibertsitatea**

Kimika Fakultatea

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

Polifenol eduki totalaren determinazioa irudi digitalen analisi bidez
eta hauen tratamendurako softwarearen garapena.

Egilea: Jokin Ezenarro Garate

Zuzendariak: Ane Bordagaray eta Rosa Garcia Arrona

Donostia, 2020ko uztaila.

GIPUZKOAKO CAMPUSA

Pº. Manuel de Lardizabal, 3

20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN

GIPUZKOA

Nire eskerrik beroenak eman nahi dizkiet lan honetan zehar gidatu nauten zuzendariei, Ane eta Rosari, mugarik jarri ez didatelako. Nire familiari, ni honaino iristea posible egin dutelako. Eta nire lagunei, bereziki Cerverako Kondeari, bidea errazagoa egin dutelako.

Aurkibidea

Laburpena	5
Abstract	7
1. Sarrera.....	9
1.1. Polifenolak.....	9
1.2. Azido Galikoa	10
1.3. Azido Tanikoa	10
1.4. Folin-Ciocalteu erreakzioa.....	11
1.5. Espektroskopia UM-Ikuskorra	13
1.6. Mikroplaken analisia irudi digitalen deskonposizio bidez.....	14
1.6.1. Argiaren zuzenketa.....	18
1.6.2. MADDI Programa.....	19
1.7. Metodo baten balidazioa.....	19
2. Helburuak	23
3. Prozedura Esperimentala.....	25
3.1. Instrumentazioa eta <i>softwarea</i>	25
3.2. Erreaktiboak eta Materiala.....	25
3.3. Laginak.....	25
3.4. Folin-Ciocalteu Erreakzioa	26
3.4.1. Mikroplakan.....	26
3.4.2. Matrazean.....	28
3.5. Argazkiak Ateratzea	29
4. Emaitzak eta Eztabaida	30
4.1. Laginen Prestaketa.....	30
4.1.1. Erauzketaren Optimizazioa.....	30
4.1.2. Diluzioen Optimizazioa.....	39
4.2. Absorbantziaren Optimizazioa.....	40
4.2.1. Espektrofotometroa.....	40
4.2.2. Irudi Digitalen Analisia	41
4.3. Irudi Digitalen Analisi Bidezko Metodoaren Balidazioa.....	43
4.3.1. Tarte Lineala	43
4.3.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak	44
4.3.3. Prezisioa	46
4.3.4. Zehaztasuna	49

4.4. Laginen Analisia.....	61
4.5. Irudi Digitalen Analisiaren Automatizazioa	62
5. Ondorioak.....	65
5. Conclusions	67
6. Bibliografia.....	69
I Eranskina: Argiaren zuzenketa	71
II Eranskina: MADDI programa	79

Laburpena

Gradu Amaierako Lan honetan infusio mota ezberdinek izan ditzaketen polifenol totalen kontzentrazioak aztertu dira, honetarako metodo berri bat garatuz. Metodo honen oinarritzat Folin-Ciocalteu erreakzioa hartu da honela determinazio kolorimetrico bat egin ahal izateko. Baina espektrofotometro batekin egin beharrean irudi digitalen analisi bidez.

Metodo honen erreferentziatzat espektroskopia ultramore-ikuskorra hartu da, eta berau balioztatzeko erabili da, beste hainbat probekin batera. Horrez gain, metodo berri honen optimizazioa, baldintzen azterketa eta automatizazioa garatu dira, helburu honetarako ez ezik argi ikuskorra absorbatzen duen edozein konposaturen irudi digitalen analisi bidezko determinaziorako baliagarria den programa bat garatuz: MADDI (*Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images*).

Bestalde, lagin batzuk solidoak direnez hauen polifenolen erauzketa ere optimizatu da kimiometria erabiliz, eta argiaren zuzenketa matematiko bat proposatu da irudi digitalen analisisia argi iturri ez-kontrolatuekin burutzea posible izan dadin.

Abstract

In this work different kinds of infusions have been analysed in order to determine their total content of polyphenols. In order to do this a new method has been developed based on the Folin-Ciocalteu reaction that allows to carry out a colorimetric determination of the before mentioned polyphenols. But instead of using a spectrophotometer digital image analysis has been used.

UV-Vis spectroscopy has been used as the reference for this method and its validation, together with other tests. In addition, optimisation of this method, its conditions and its automatization have been carried out. An automatization that not only Works for this purpose but for the determination of any coloured compound using digital image analysis, creating a program called MADDI (*Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images*).

Also, as some samples are solid, the extraction of polyphenols from these has been also optimized, and a mathematical light correction has been proposed in order to be able to use this method with non-controlled light sources.

1. Sarrera

1.1. Polifenolak

Polifenolak, polihidroxifenolak bezala ere ezagutzen direnak, jatorri naturaleko (nahiz eta sintetiko eta erdisintetikoak ere existitu) molekula organikoen familia bat dira. Molekula berean fenol (alkohol bentzilik) unitate asko izatea da hauen egitura-ezaugarri nagusia, hauek berebiziko ezaugarri fisiko, kimiko eta biologikoak ekartzen baitizkie.^[1]

White-Bate-Smith-Swain-Haslam-ek (WBSSH) ematen duten polifenolen definizioa izan zen zabalki onartua izaten lehena, eta honako baldintza hauek betetzen dituzten molekulei deritze polifenol:^[2]

- Orokorrean modu moderatuan baina uretan disolagarriak dira.
- Pisu molekularra 500 eta 4000 Da bitartekoa dute.
- 12 hidroxifenol talde baino gehiagoko dituzte.
- 1000 Da-eko 5-7 eraztun aromatiko dituzte.

Baina muga hauek ez dira zurrinak, definizio orokor bat bakarrik ematen dute, eta badira definizio hau betetzen ez duten baina bere ezaugarri fisiko eta kimikoengatik polifenol gisa sailkatzen diren molekulak.

Folin-Ciocalteu bezalako analisiekin polifenol kantitate totala determinatzen denean, hau da, disoluzioan egon daitezkeen polifenolen familiako molekula guztien kantitatearen batura, baliokide bat ematen da. Horretarako azido galikoa erabiltzen da, nahiz eta ez bete WBSSH-ren definizio-baldintzak polifenolik txikiena bezala har daiteke, hidroxifenol talde bakarra duena.

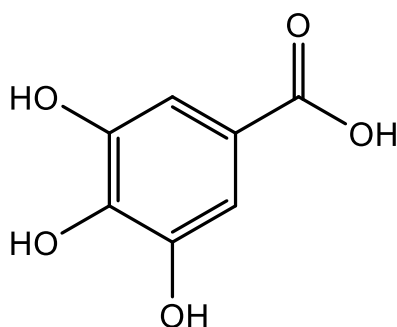
Gizakiontzat sekulako garrantzia izan dezaketen molekulak dira polifenolak, mota askotako elikagaietan aurki baitaitezke, eta kontzentrazio garrantzitsuetan, eguneko 1 g polifenol hartzera ere iritsi arte.^[3] Hala nola fruitu, barazki, zereal, kafe, ardo eta tean. Eta ez produktu freskoetan bakarrik, baita hauen deribatuetan ere, oro har kafe eta te infusioetan edo ardoan.^[4]

Zelularen hazkunderako beharrezkoa den oxigenoaren kontsumoak oxigeno erradikal askeak sortzen ditu, oxidazio-estres deritzon prozesuan rol nagusi bat hartzen dutenak. Prozesu honek superoxido erradikalak eta hidrogeno peroxidoa sortzen ditu, zelulak zuzenean kaltetuz. Eta antioxidatzaileen presentziak erradikal hauek inaktibatzen laguntzen duenez, kalte zelularra murriztu dezake hauen kontsumoak.^[5]

Prozesu honetatik deribatutako onuren artean dago hainbat gaixotasunen prebentzioa: gaixotasun kardiobaskularrak, minbiziak, osteoporosia... eta gaixotasun neurodegeneratiboetan eta diabetes mellitusean eragina izan dezakeela uste da.^[6]

1.2. Azido Galikoa

Azido galikoa (azido 3,4,5-trihidroxibentzoikoa, 1. irudia) naturan leku askotan aurki daitekeen molekula organikoa da, azido fenoliko bat, hala nola landareen hostoetan, fruituetan edo hazietan.



1. irudia: Azido galikoaren egitura molekularra.

Ezaugarri fisiko-kimikoak:^[7]

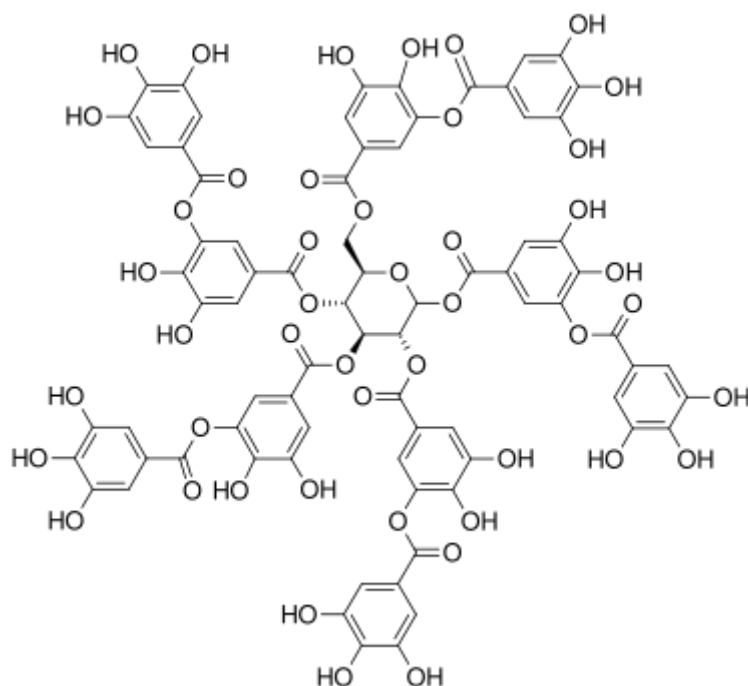
Formula kimikoa	$C_7H_6O_5$
Pisu molekularra	170,12 g/mol
Itxura	Zuria, zuri-horixka
Dentsitatea	1,694 g/cm ³ (anidroa)
Fusio puntua	260°C
Azidotasuna (pK _a)	COOH: 4,5; OH: 10
Disolbagarritasuna uretan	1,19 g/100 mL, 20°C (anidroa)

Historikoki hainbat erabilera izan dituen konposatua da azido galikoa, besteak beste mendeetan zehar erabili den idazteko tintaren osagai garrantzitsuetako bat izan da,^[8] hala nola, eskuz idatzitako testuen zaharberritzean.^[9]

1.3. Azido Tanikoa

Azido tanikoa (1,2,3,4,6-penta-O-{3,4-dihidroxi-5-[(3,4,5-trihidroxibentzoil)oxi]ben-tzoil}-D-glukopiranosia, 2. irudia), azido galikoa bezala naturan aurki daitekeen polifenolen molekula familiako kidea da.

Molekula organiko honek dituen hainbat erabileraren artean aurkitzen dira egurraren tratamendua (suaren, usteltzearen eta izurriteen aurka), elikagaietan, hala nola garagardo edo zukuetan, eta medikuntzan, hainbat tratamendu ezberdinetarako.^[10]



2. irudia: Azido tanikoaren egitura molekularra.

Ezaugarri fisiko-kimikoak:^[11]

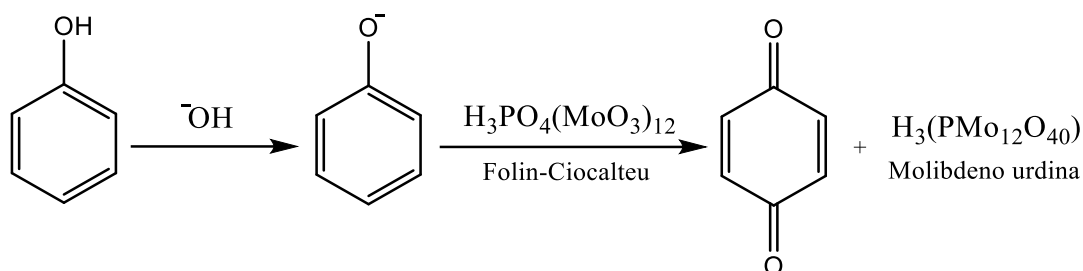
Formula kimikoa	$C_{76}H_{52}O_{46}$
Pisu molekularra	1700,17 g/mol
Itxura	Zuria, zuri-horixka
Dentsitatea	2,12 g/cm ³
Fusio puntua	200°C
Azidotasuna (pK _a)	≈6
Disolbagarritasuna uretan	2850 g/L

1.4. Folin-Ciocalteu erreakzioa

Folin-Ciocalteu erreakzioa Folin-Ciocalteu errektiboa (FCR), Folin-Denis errektiboa bezala ere ezagutua, erabiliz ematen den erreakzioa da. Erreaktibo hau fosfomolibdatoz eta fosfowolframatoz osatuta dago eta ingurune basiko batean erreduzitzaileekin erreakzionatzen du.

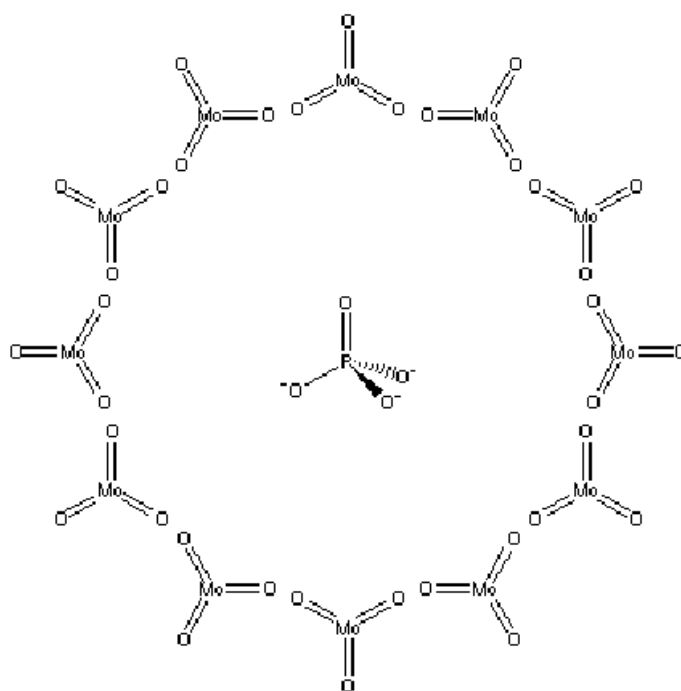
3. irudian azaltzen den bezala disoluzio bati Folin-Ciocalteu errektiboa gehitzerakoan (eta ingurune basikoa, jadanik ez badu) bertan aurkitzen diren konposatu erreduzitzaile guztiekin erreakzionatuko du errektiboan dagoen molibdeno gatzak ($H_3PO_4(MoO_3)_{12}$), konposatu hauek oxidatuz eta molibdeno gatzak erreduzituz. Egitura konplexuko gatz erreduzitu hau ($H_3(PMo_{12}O_{40})$) molibdeno urdina izeneko koloratzailea da, eta izenak dioen bezala kolore urdina du. Sortutako kolore urdin honen intentsitatea laginak zuen

ahalmen erreduzitzailearekiko proportzionala da, eta beraz, hau determinatzeko baliatu daiteke.^[12]



3. irudia: Folin-Ciocalteu erreakzioa.

Esan bezala, molibdeno urdinaren egitura oso konplexua da eta ez da guztiz ziurra, honen inguruko ikerketak badauden arren. Halere, Folin-Ciocalteu erreaktibo nahastean sortzen den konposatuaren ($\text{H}_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}$, 4. irudia) egitura ezaguna da: molibdeno oxido polimero bat osatzen da fosfato tetraedriko baten inguruan, molibdeno eta wolframaren elkartrukea posible giten duena.



4. irudia: Folin-Ciocalteu erreaktiboaren egitura eskematikoa.^[13]

Horrela espektro ikuskorrean eta konposatu erreduzitzaileen kantitatearekiko modu proportzionalan argia absorbatzen duen espezie bat lortuko dugu. Honek metodo kolorimetriko simple bezain fidagarri batekin disoluzio batean dagoen polifenol totalen

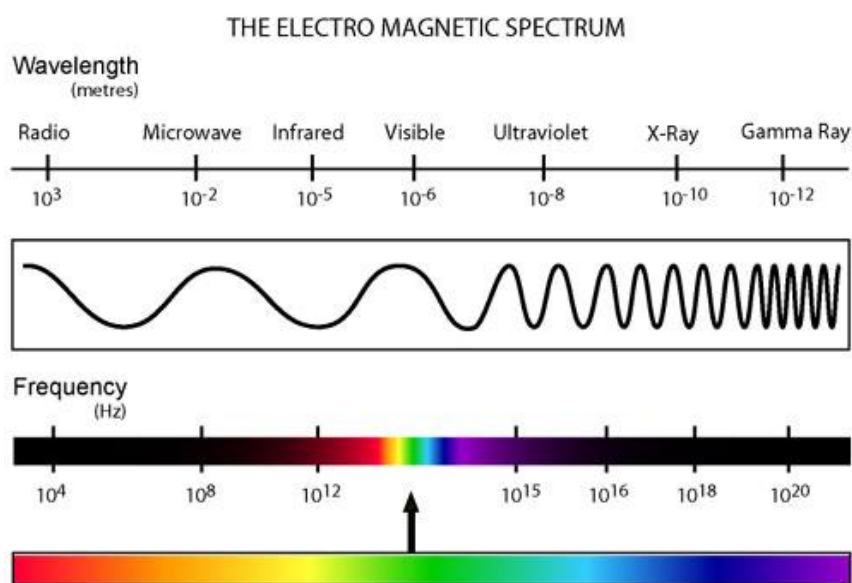
kontzentrazioa determinatzeko aukera ematen du, eta hortik dator metodo honen erabilera zabala.

Kontuan hartu behar da ordea, disoluzioan polifenolak ez diren konposatu erreduzitzaileak egon daitezkeela, beraz determinatzen dena ez da polifenol totalen kontzentrazioa baizik eta disoluzioaren ahalmen erreduzitzaile totala, nahiz eta baliokidetzat hartu daitezkeen.^[14]

Gainera, lehen azaldu bezala polifenolen familia oso anitza izan daitekeenez eta metodo honekin guztiak batera determinatzen direnez, ezin banaturik, azido galiko baliokide bezala ematen da polifenol totalen kontzentrazio edo kantitatea. Honek esan nahi duena da disoluzio baten azido galiko kontzentrazio bezala ematen den ahalmen antioxidatzaileak adierazten duela disoluzio horri Folin-Ciocalteu erreaktiboa gehitzerakoan absorbatuko lukeen argia, adierazitako azido galiko kontzentrazioa duen disoluzio batek absorbatuko lukeenaren berdina izango dela.

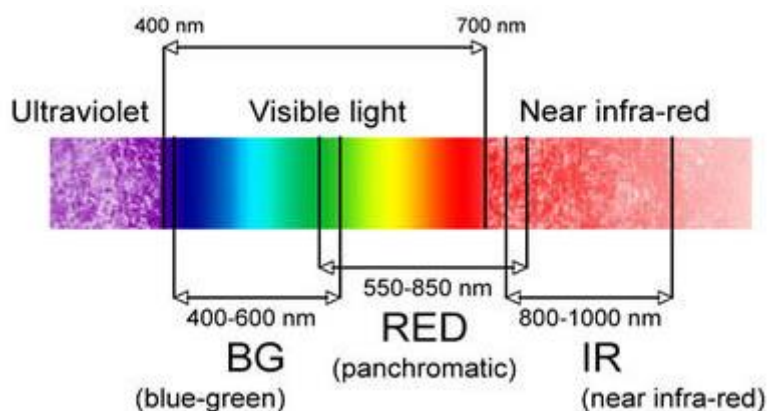
1.5. Espektroskopia UM-Ikuskorra

Espektroskopia ultramore-ikuskorra lagin batek uhin elektromagnetikoen espektroaren (5. irudia) zati batean duen argia absorbatzeko gaitasuna (absortzioa) neurtzean oinarritzen den teknika analitikoa da. Uhin-luzeraren tarte hori, hain zuzen ere, 200 nm-tatik 800 nm-tarainokoa da, beraz, argi ultramore-ikuskorrarekin lan egiten duen espektrofotometro bat disoluzio batek espektroaren tarte horretan absorbatzen duen argia neurtzeko gai izango da, aparailuaren ezaugarrien arabera zehaztasun eta espezifikotasun ezberdinarekin uhin-luzera bakoitzarekiko.^[15]



5. irudia: Espektro elektromagnetikoa. (Domeinu publikoko irudia)

Folin-Ciocalteu metodoaren kasuan, disoluzioen absorbantzia maximoa 765 nm-tan dagoenez, absorbatzen duen kolorea gorria da (6. irudia), horregatik ikusten dira disoluzioak urdin kolorekoak.



6. irudia: Uhin-luzera ezberdinen koloreak. (Domeinu publikoko irudia)

Lambert-Beer legea

Lambert-Beer-en legeak (1. ekuazioa) dio, disoluzio batek absorbatzen duen argia honek duen analito (argia absorbatzen duen konposatu) kontzentrazioarekiko eta argiak disoluzioan zehar egin behar duen distantziarekiko zuzenki proportzionala dela.^[15]

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{1. ekuazioa}$$

A: absorbantzia; ε : absorptibitatea; b: argiaren bidea; c: kontzentrazioa

Beraz, lege hau (1. ekuazioa) baliatuz analito baten kontzentrazio jakineko disoluzioak prestatu daitezke eta dimentsio ezaguneko kubeta batean absorbantzia neurtu, honela datu hauek zuzen batera doitu daitezke, ondoren, analito beraren kontzentrazio ezezagun bat duen disoluzio baten absorbantzia neurtuta honen kontzentrazioa ezagutzeko.^[15]

1.6. Mikroplaken analisia irudi digitalen deskonposizio bidez

Ondoren azalduko den bezala, lan honen helburu nagusia disoluzio baten eduki totala determinatzeko metodo berri bat garatzea da. Gaur egun punta-puntako ikerkuntzan dagoen arlo bat da irudi digitalen analisi bidezko teknika analitikoaren garapena.

Metodo hauen oinarria espektrofotometro baten oinarriaren antzekoa da, hau da, Lambert-Beer legea:^[15] disolbatuta dagoen konposatu batek argia absorbatuko du eta

absorbatzen duen argia, argiak zeharkatu behar duen disoluzioaren kontzentrazioaren eta disoluzioan zehar egin beharreko distantziarekiko zuzenki proportzionala da.

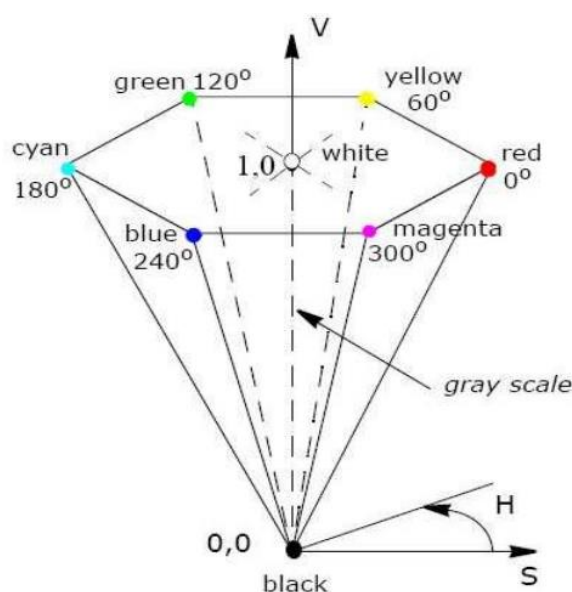
Lege hau oinarritzat hartuta ondorioztatu daiteke disoluzio batek absorbatzen duen argia bezala, absorbatzen ez duen argia (edo transmititzen duena) ere proportzionala dela kontzentrazioarekiko, baina alderantziz proportzionala.

Espektrofotometro batek disoluzio batek absorbatzen duen argia neurtzen duen bezala (emititutakoaren eta neurtutakoaren arteko kendura), argazki batek disoluzio batek transmititzen duen argia neurtzen du, hau da, igorri zaion argitik absorbatzen ez duen zatia, berriz igortzen duena, neurtzen du. Beraz, aurreko atalean azaldutako Lambert-Beer-en legea argazkiei ere aplikatu dakieke analito kontzentrazioa determinatzeko asmoz.

Argazki digitalek koloreak zenbaki-balio bezala gordetzen dituzte, jasotako argia kanal ezberdinetan deskonposatzen dute eta kanal hauetako bakoitzean argazkiko puntu (pixel) bakoitzak dituen balioak gorde.

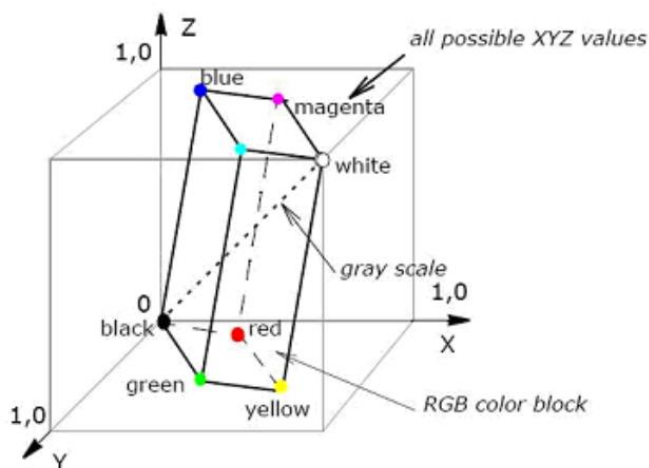
Hau egiteko hainbat sistema daude, baina zabalduenak HSV eta RGB sistemak dira:

Bi sistema hauek argi ikuskorren espektroa hiru dimentsio erabiliz irudikatzen dute, HSV sistema, 7. irudian ikusten den bezala, sistema polarra da, hau da, oinarri zirkularra du. Sistema honetan kolore bat definitzeko sistemari izena ematen dioten hiru koordenatuak (kanalak) erabiltzen dira: *H*, *hue* (ñabardura), *S*, *saturation* (saturazioa) eta *V*, *value* (balioa).^[16]



7. irudia: HSV espazioaren irudikapen grafikoa.^[16]

RGB sistema, aurrekoa ez bezala, sistema kartesiarra da, hiru dimentsioak elkarzutak dira. Sistema hau erabiliena da irudi digitalekin tratatzerako garaian. HSVrekin bezala, sistema honi izena ematen dioten koordinatuak erabiltzen dira kolore bat definitzeko, 8. irudian ikus daitekeenez: R, *red* (gorria), G, *green* (berdea) eta B, *blue* (urdina).^[16]



8. irudia: RGB espazioaren irudikapen grafikoa.^[16]

Sistema honen koordinatu edo kanalek 0 tik 255erainoko balioak izan ditzakete, biak barne. Sistema sortu zenean pixel bakoitzaren kanalek 0 edo 1eko balioa izan zezaketen, sistema bitarrean oinarrituak baitaude hardware eta software digitalak, eta beraz, baita argazki digitalak ere. Modu honetan kanal bakoitzak *bit* bateko memoria behar du, pixel bakoitzak 3 *bit*-ekoa. Oinarritzko bi balio hauen konbinaketak, ordea, 8 (2^{3-1}) kolore bakarrik sortu ditzake eta kolore espektro handiago baten beharrean *bit* gehiago erabiltzen hasi ziren, gaur egungo kanal bakoitzeko *byte* batera (8 *bit*) iritsi arte. Modu honetan 16.777.216 (2^{8-3}) kolore ezberdin sortu daitezke.

Erabilera zabalduena izateaz gain, RGB sisteman hiru kanalak mota berekoak direnez (3 koordinatu euklidear), hau da irudi digital bidezko mikroplaken analisia egiteko erabiliko dena. Baina irudi batetik interesekoak diren RGB balioak lortzea ez da lan erraza, horregatik prozesu hau automatizatzeko programa bat sortu eta erabili da. Programa honi MADDI deitu zaio bere ingelerazko akronimoagatik: *Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images*. (II Eranskina)

Behin disoluzio bati ateratako argazki baten RGB balioak eskura ditugula disoluzio horren kontzentrazioarekin erlazionatu daitezke, absorbantziaren baliokidea den balio bat (A) lortuz, honetarako 2. ekuazioa aplikatzen da, kanal bakoitzarentzat antzekoa dena.

$$A_X = \log_{10}(X_0/X)$$

2. ekuazioa

A_X : absorbantzia X kanalean; X: laginaren balioa X kanalean; X_0 : zuriaren balioa X kanalean

Kanal bakoitzarentzat:

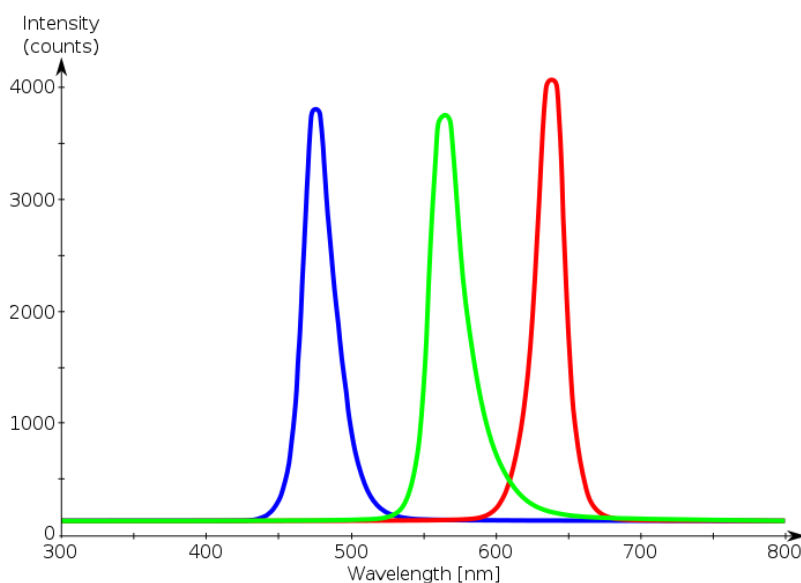
$$A_R = \log_{10}(R_0/R)$$

$$A_G = \log_{10}(G_0/G)$$

$$A_B = \log_{10}(B_0/B)$$

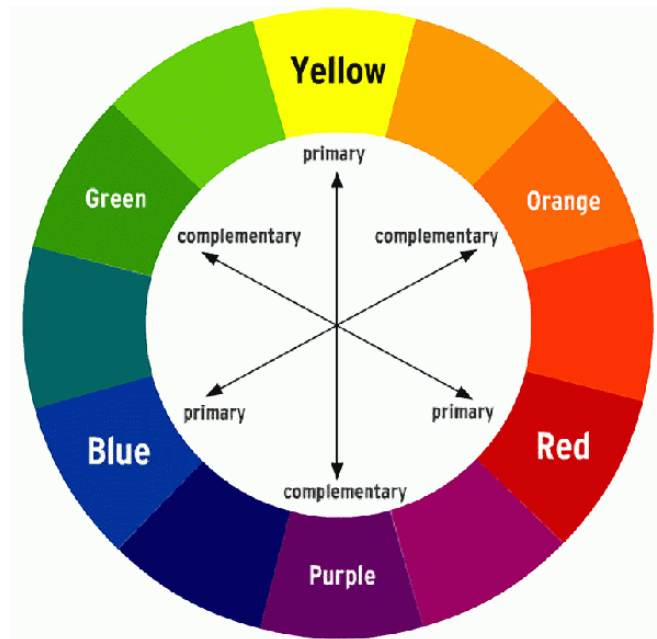
Absorbantzia hauek espektrofotometro batekin neurtutako absorbantzien baliokideak dira, hau da, disoluzio baten kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak dira Lambert-Beerren legeak dioen bezala.

Espektrofotometro batekin absorbantziak uhin-luzera jakinetan neurtu daitezke zehaztasun erlatiboki handiarekin. RGB sistemaren kanaletako bakoitzak, ordea, uhin luzera ezberdinetako argiaren intentsitatea neurtzen du, hau da, absorbantzia hauek ez dira uhin-luzera zehatz batean neurtutakoak, baizik eta banda zabalago batean neurtutakoen batura. 9. irudian ikusten den bezala R, G eta B kanaletako bakoitzak espektriko ikuskorraren zati bat hartzen du, honela, hiruren artean eta hauen konbinazioz, kolore guztiak adierazi ditzake RGB sistemak.



9. irudia: R, G eta B kanalen espektra. Tijl Schepens.

Beraz, teknika honekin erabili beharreko absorbantziaren kanala (uhin-luzera) aukeratzeko espektrofotometroan egingo litzatekeen bezala absorbantzia maximoa duen espektraren zatia hautatu beharko da, metodoaren sentikortasuna hobea izango baita tarte horretan.^[15] Disoluzio baten kolorea absorbatzen ez duen argiarena denez, absorbantzia maximo hau osagarria den koloreari dagokion espektraren tartean egongo da 10. irudian ikusten den bezala.



10. irudia: Kolore osagarrien diagrama. Warren Kramer.

Disoluzio urdin batentzat espektroaren tarte konplementarioa laranja litzatekeen arren, RGB sistemak kolore konkretu hori ez duenez hurbilen duena izango da egokiena, kasu honetan gorria: R kanala.

1.6.1. Argiaren zuzenketa

Espektrofotometro batean argi iturriak kontrolatuta daude, neurtzen ari den disoluzioari iristen zaion argi bakarra instrumentuak berak baldintza kontrolatuetan emititzen duena da. Irudiekin lan egiten denean, ordea, eta batez ere lan honetan aztertu diren baldintzetan, argazkia ateratzerako orduan inguruko argiarekin egiten da lan, ez dago kaxa itxirik ez argi iturri kontrolaturik, eguzki argiaren aldaketa nabarmenak minimizatzen saiatu arren. Hau horrela izanik, bi argi baldintza ezberdinetan atera diren argazkiak ez dira alderagarriak, kasu gutxi batzuetan salbu. Esaterako, egun batean neurtutako lagin batzuk ezingo liriateke beste egun batean neurtutako stock disoluzioak erabiliz determinatu, ezta momentu berean baina bi leku ezberdinetan neurtutakoak ere.

Posible da baldintzak kontrolatzen saiatzea, adibidez kaxa itxi batean eta argi iturri kontrolatu batekin ateraz argazkiak edo eskaner baten bidez.^[17] Lan honetan, ordea, egokiagoa ikusi da baldintza ezberdinetan lortutako balio horiei argiaren aldakortasuna kontuan hartzen duen zuzenketa matematiko bat aplikatzea, alderagarriak bihurtzeko. Zuzenketa hau I Eranskina atalean azaltzen da, eta lan honetan MADDI bidez egin diren neurketa guztiei aplikatu zaie.

1.6.2. MADDI Programa

Lortutako datu kopurua handitu ahala, hauek prozesatu eta tratatzeko denbora izugarri hazten da, batez ere eskuz egin behar bada. Lan honetarako erabili den bezalako kamera digital batek 13 MP ditu, hau da, kamera honekin ateratako argazki batek 13 milioi pixel ditu, eta pixel bakoitzeko 3 kanal (RGB), beraz, argazki batean, tratatu aurretik, interesekoak izan litezkeen 39 milioi datu daude. Lehenik interesekoak diren pixelak hautatu eta besteak baztertu behar dira, suposatuz mikroplakaren putzu guztiak beteta daudela eta bakoitzetik 100 pixel hartzen direla: (96 putzu + 10 kolore barran) x 100 pixel x 3 kanal = 31.800 datu daude erabiltzeko. Azkenik, batezbesteko eta logaritmoak aplikatu ondoren, gehienez 106 (putzu + kolore) x 3 kanal = 318 datu lortuko lirateke. Ikus daitekeenez "big data" honi egiten zaion prozesaketa izugarria da:

$$39.000.000 \rightarrow 31.800 \rightarrow 318$$

Prozesamendu hau guztia eskuz egiteko, edo baita ordenagailu batek lagunduta ere, orduak beharko lirateke, beraz, beharrezkoa da nolabaiteko automatizazioa, edozein irudiren deskonposizioa eta analisisa egiteko balio duena, baita argazkiaren baldintzak aldatuta ere. Hau honela II Eranskina atalean azaltzen den izen bereko programa sortu da.

1.7. Metodo baten balidazioa

Metodo baten balidazioa metodo analitiko hau erabiliko den helburuetarako egokia dela frogatzeko prozesua da.^[18] Horretarako ondoren azalduko diren hainbat parametro baliatzen dira.^[15]

- Tarte lineala

Kalibrazio kurba baten tarte lineala kurba hori zuzen batera doitzen den tartea da, seinalea eta analito kopurua proportzionalak direla erakutsiz.

Doitasun hau egokia den ala ez adierazten duen parametroetako bat, sinplea izan arren oso erabilia, korrelazio koefizientearen karratua (R^2) da, 3. ekuazioan adierazten den bezala kalkulatzeko dena.

$$R^2 = \frac{[\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2} \quad 3. \text{ ekuazioa}$$

Non x analitoaren kantitateari dagokion balioa den eta y seinaleari dagokiona.

Balio hau zenbat eta gehiago hurbildu 1era, orduan eta korrelazio hobea da. Erabilera gehienetarako 0,995en gaineratik dauden balioak ontzat hartzen dira, eta 0,999ren gaineratik daudenak oso ontzat. Beraz, korrelazio ona duen kalibrazio kurbaren kontzentrazio tartea izango da tarte lineala, determinazioetarako erabiliko dena.

- Detekzio eta kuantifikazio mugak

Detekzio limitea (LOD: *limit of detection*) zuriaren seinaletik bereizi daitekeen seinalea sortzen duen analito kopuruari dagokion kontzentrazioa da.

Limite hau determinatzeko metodo ezberdinak daude, erabilienetako bat zuriaren metodoa da, LOD 4. ekuazioan adierazi bezala definitzen duena:

$$Y_{LOD} = \bar{V}_{zuria} + 3 \cdot s \quad 4. \text{ ekuazioa}$$

Non \bar{V}_{zuria} lagin zuriekin lortutako seinaleen batezbestekoa den eta s hauen desbideratze estandarra.

Ondoren, seinale honen balioa kalibrazioa kurban sartuz, honi dagokion kontzentrazioa ($X_{LOD} = LOD$) lortzeko 5. ekuazioa lortzen da.

$$Y_{LOD} = m \cdot X_{LOD} + b \quad \rightarrow \quad X_{LOD} = (Y_{LOD} - b) / m \quad 5. \text{ ekuazioa}$$

Kuantifikazio muga (LOQ: *limit of quantification*), berriz, kuantifikatu daitekeen analito kopuru edo kontzentrazio minimoa da, 6. ekuazioan adierazi bezala definitzen dena.

$$LOQ = 3,3 \cdot LOD \quad 6. \text{ ekuazioa}$$

- Prezioa

Prezioa lagin berdinen erreplika ezberdinek elkarren artean duten berdintasuna da. Gehienetan desbideratze estandar edo konfiantza tarte gisa adierazten dena. Ez da berdina analista trebatu batek, prozedura, laborategi, instrumentu eta baldintza berdinetan neurtzen dituen errepliketako duten prezioa (errepikakortasuna) eta analista ezberdinek instrumentazio eta prozedura

ezberdinekin, laborategi eta baldintza ezberdinetan neurtzen dituzten erreplikien prezisioa (erreproduzigarritasuna).

Hauek neurtzeko, ohikoa da analisi ezberdinak egitea, baldintza antzekoetan eta baldintza guztiz ezberdinetan, eta lortutako emaitzen arteko alderaketa bat egitea. Zenbat eta antzekoagoak izan lortutako emaitzak, orduan eta hobeago izango da metodo hori, fidagarriagoa.

- Zehaztasuna

Zehaztasuna neurtutako balioak benetako baliotik duen hurbiltasuna da.

Konparaketa hau egiteko beharrezkoa da benetako balioa ezagutzea, eta horretarako hainbat modu daude:

1. Erreferentziako material estandarra erabiltzea: analito kantitate ezaguna analizatutako laginen antzeko matrize batean.
2. Metodo analitiko onartu batekin alderatzea emaitzak.
3. Lagin zuriei analito kopuru ezaguna gehitzea, lagin errealek duten matrize berean. Analito kopurua determinatu eta gehitutakoarekin alderatu.
4. Matrize bera analitorik gabe lortu ezin bada egokia da patroia gehikuntzaren metodoa erabiltzea gehitutako analito kopurua determinatu eta benetan gehitutakoarekin alderatzeko.

2. aukera izan da lan honetarako erabili dena, MADDIrekin lortutako emaitzak espektrofotometroarekin alderatzea, hain zuzen ere.

2. Helburuak

Lan honen helburua polifenolak determinatzeko Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarritzen den metodo berri, merke eta ingurugiroarekiko errespetagarriago bat garatzea da, horretarako mikroplaketan dauden disoluzioen mugikorreko kamerarekin ateratako irudien analisia eginez.

Bestalde, metodo hau infusioen polifenol total edukia determinatzeko optimizatu nahi da, horretarako lagin solidoetatik polifenolen erauzketa optimizatzeaz gain hauei aplikatu beharreko diluzio egokiak aurkituz. Ondoren lagin erreal batzuen polifenol edukia determinatzeko.

Gainera, metodo hau balioztatzea da helburua. Metodo hau erabiltzea posible den baldintzak aztertzea, honen mugak eta abantailak aztertuz. Horrez gain, metodo honen eta irudi digitalen analisi bidezko edozein metodoren erreproduzigarritasuna hobetzeko asmoz inguruko argiaren eragina zuzenduko duen tratamendu matematiko bat diseinatzea.

Azkenik, irudi digitalen analisia kalkulu asko eskatzen dituen prozesua denez prozesu hau automatizatuko duen, erabilerraza izango den eta eskuragarria izango den erabiltzailearentzako interfazedun programa bat sortu nahi da. Ez polifenolen determinaziorako bakarrik baizik eta edozein oinarri kolorimetrico (espektro ikuskorrean) baliatzen duen determinazio metodoentzako balio duena.

3. Prozedura Esperimentalak

3.1. Instrumentazioa eta *softwarea*

- Espektrofotometroa: T92+ UV espektrofotometer
- Mugikorra: Motorola Moto G⁴, Android 7.0, kamera: 13 MP
- Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2019)
- Matlab 2020a
- Design Expert 11 (Stat-Ease, Minneapolis)
- MADDI (Ikusi II Eranskina)

3.2. Erreaktiboak eta Materialak

- Folin-Ciocalteu erreaktiboak (Panreac, VINIKIT): 10 g sodio wolframato 2-hidrato, 2,5 g sodio molibdato 2-hidrato, 5 mL azido orto-fosforiko (%85), 10 mL azido klorhidriko (%35) eta 15 g litio sulfato 1-hidrato 100 mL uretan.
- Sodio karbonatoa %7,5: 1,875 g Na₂CO₃ (Panreac, PA-ACS) 25 mL arte eraman ur bidestilatuarekin.
- Azido galiko *stock* patroia disoluzioa 100 mg/L: 10 mg az. galiko (Sigma, 97.5-102.5% by titration) 100 mL arte eraman ur bidestilatuarekin.
- Azido taniko *stock* patroia disoluzioa 100 mg/L: 10 mg az. taniko (Sigma-Aldrich, CAS 1401-55-4) 100 mL arte eraman ur bidestilatuarekin.
- Plastikozko mikroplakak (96 putzu).

3.3. Laginak

Proposatutako metodoaren balidazioa egiteko 10 lagin erreal aukeratu dira, hauetako 5 lagin solidoak dira, te hosto edo fruitu birrinduz betetako poltsatxo komertzialak, beste 5 lagin likidoak dira, te ezberdinak erabiliz egindako infusio komertzialak. Hemendik aurrera 1. taulan adierazten diren izenekin ezagutuko direnak.

1. taula: Laginen kodeak. I: Lagin solidoa K: Lagin likidoa

Lagina	Infusio mota
I1	Mugurdia
I2	Frutak
I3	Te beltza
I4	Te gorria
I5	Te berdea
K1	Te berdea
K2	Te beltza
K3	Te berdea
K4	Te berdea
K5	Te zuria

3.4. Folin-Ciocalteu Erreakzioa

Disoluzio baten polifenol totalen kontzentrazioa determinatzeko Folin-Ciocalteu erreakzioa baliatzen da. Erreakzio honek disoluzioari duen polifenol kontzentrazioarekiko proportzionala den kolorea ematen dio, determinazio kolorimetrikoa (espektrofotometroarekin edo irudi digitalen analisi bidez) burutzea ahalbidetuz.

3.4.1. Mikroplakan

Erreakzio hau mikroplaka baten putzuetan (400 μ L-ko bolumena) burutzeko ondorengo prozedura jarraitu da:^[19]

1. Polifenolak dituen disoluziotik dagokion bolumena gehitu.
300 μ L inguru arte gehitu daitezke, betiere izango duen diluzio faktorea eta bukaerako polifenol totalen kontzentrazioa kontuan hartuz.
2. Folin-Ciocalteu erreaktibo gehitu: 20 μ L
Erreaktibo hau komertziala da eta disoluzio moduan saltzen da. Bolumen honekin nahikoa da gehitutako polifenol guztiek erreakzionatu dezaten.
3. 5 minutu itxaron.
Aurreko bi disoluzioak ongi nahasi daitezen.
4. Sodio karbonato % 7,5 disoluzioa gehitu: 64 μ L
Kontzentrazio hau duen disoluzioaren bolumen honek, putzuan izango duen diluzio faktorea kontuan izanda erreakzioa burutzeko pH baldintza egokiak sortuko ditu.

5. 5 minutu itxaron eta gas burbuilak kendu.

Disoluzioa basiko bihurtzeaz gain sodio karbonatoa deskonposatu egiten da karbono dioxidoa sortuz, eta hain bolumen txikiekin lan egiterakoan kapilaritatearen eragina kontuan hartzekoa da, burbuilak putzuan harrapatuta gelditzen baitira. Horregatik erreakzioaren zati nagusia emateko 5 minutu itxaron ondoren mikroplaka astinduz eta beharrezkoa bada putzuetako disoluzioak banaka irabiatuz gas guztia askarazten da.

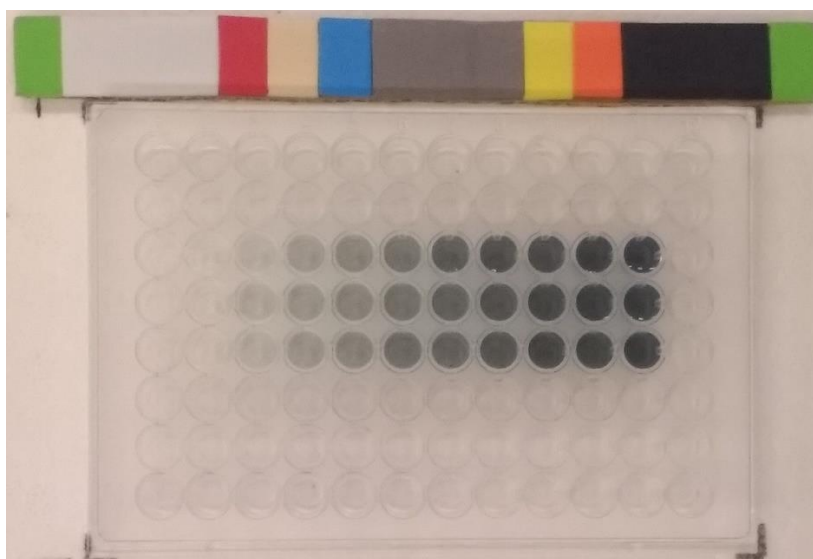
6. Ura gehitu.

Disoluzio guztien bolumena 400 μ L-koa izan dadin gehitzen den ur bolumena polifenolak dituen disoluziotik gehitu den bolumenaren menpekoa da, beste bi erreaktibo bolumenak beti berdinak baitira. Hau da, gehitutako ur bidestilatua honakoa da: 400 – 20 – 64 – Polifenol disoluziotik gehitutako bolumena.

7. Argazkia atera.

Erreakzioak kolore maximoa har dezan 2 ordu itxaron ondoren argazkia ateratzen zaio mikroplakari.

Sarreran azaldu bezala erreakzio honek kolore urdin iluna ematen dio disoluzioari, kolorea polifenolen kontzentrazioarekiko proportzionala izanik. 11. irudian ikusten den bezala ezkerretik eskuinera kontzentrazioa handitu ahala disoluzioek kolore ilunagoa hartzen dute.



11. irudia: Azido galiko kontzentrazio ezberdineko patroi disoluzioei aplikatutako Folin-Ciocalteu erreakzioaren irudia.

3.4.2. Matrazean

Erreakzio hau matraze aforatu batean (10 mL-ko bolumena) burutzeko, berriz, ondorengo prozedura jarraitu da:^[19]

1. Polifenolak dituen disoluziotik dagokion bolumena gehitu.
7 mL inguru arte gehitu daitezke, betiere izango duen diluzio faktorea eta bukaerako polifenol totalen kontzentrazioa kontuan hartuz.
2. Folin-Ciocalteu erreaktibo gehitu: 0,5 mL
Erreaktibo hau komertziala da eta disoluzio moduan saltzen da. Bolumen honekin nahikoa da gehitutako polifenol guztiek erreakzionatu dezaten.
3. 5 minutu itxaron.
Aurreko bi disoluzioak ongi nahasi daitezten.
4. Sodio karbonato % 7,5 disoluzioa gehitu: 1,6 mL
Kontzentrazio hau duen disoluzioaren bolumen honek, putzuan izango duen diluzio faktorea kontuan izanda erreakzioa burutzeko pH baldintza egokiak sortuko ditu.
5. 5 minutu itxaron eta ura gehitu.
Kasu honetan bolumenak handiagoak direnez karbono dioxido gasa bere kabuz irtengo da, gehienez matrazea pixka bat astinduz. Halere beharrezkoa da gasik ez dagoela ziurtatzea matrazea ur bidestilatuarekin marraraino bete aurretik.
6. Neurtu.
Erreakzioak kolore maximoa har dezan 2 ordu itxaron ondoren espektrofotometroko kubetara isuriz absorbantzia neurtu edo mikroplaka batera isuriz eta argazkia ateraz neurtu daiteke disoluzioaren absorbantzia.

3.5. Argazkiak Ateratzea

Espektrofotometroan ez bezala, irudi digitalen analisia baliatzen duen metodoan argi iturria ez dago kontrolatuta, inguruko argiarekin egiten da lan. Hau horrela, metodoaren prezisioa eta zehaztasuna hobetzeko argazkiak baldintza ahalik eta egokienetan atera beharra dago.

Baldintza hauen optimizazio egoki batek beharko lituzkeen denbora eta lana eskaini ezin zaizkionez lan honetan gutxi gorabehera saiatu da errore hauek gutxitzen. Horretarako argazki guztiak baldintza berdinetan atera dira, leku finko batean eta mugikorreko kameraren parametroak 2. taulako balioetan finkatuz, argazkiaren kalitatea ahalik eta onena izan dadin.

2. taula: Mugikorreko kamerarentzat finkatutako parametroen balioak.

Parametroa	Balioa
ISO	200
Obturazio denbora	1/45 s
Zuri balantzea	Fluoreszente argia

Argazkiak atera diren lekuak, berriz, ondorengo baldintzak betetzen ditu:

- Ez dago itzalik ezta zuzeneko argi iturririk ere.
- Eguzki-argiaren eragina ahalik eta txikiena izan dadin gortinak itxita eta lanpara fluoreszenteak piztuta egin dira argazkiak.
- Oraindik ere kanpoko argiak (eguzki-argiak) izan dezakeen eragina gutxitzeko disoluzio ezberdinak leihoekiko paraleloan orientatu dira, argi-iturritik distantzia berdinerara, eta erreplika ezberdinak perpendikularrean, hauen batezbestekoa egiten denez batezbesteko distantzia bera izango baitute.
- Mugikorra mikroplakatik 30 cm ingurura kokatu da, zuzenean gainean, paraleloki.

4. Emaitzak eta Eztabaida

Atal honetan prestatutako disoluzio guztien hiru erreplika prestatu dira eta hauekin lortutako seinaleen batezbestekoa hartu da baliozkat kontrakorik esaten ez bada. Gainera I Eranskinean azaltzen den argiaren zuzenketa aplikatu zaie absorbantzia balio guztiei.

4.1. Laginen Prestaketa

4.1.1. Erauzketaren Optimizazioa

Folin-Ciocalteu erreakzioa erabiliz lagin baten polifenol totalen edukia determinatu ahal izateko lagina disoluzio moduan izan behar dugunez, lagin solidoekin lanean hasi aurretik beharrezkoa da polifenol horien erauzketa bat egitea.

Hau honela, lagin solido birrinduaren poltsatxoetatik ura erabiliz polifenolen erauzketa egiteko baldintza optimoak aurkitu behar dira, honetarako Design Expert programa erabili da.

Bestalde, froga guzti hauen emaitzak ezin direnez egin aurretik estimatu, disoluzio guztiak bi diluzio faktore ezberdinekin egin dira, eta emaitzetan bietatik egokiena dena (kalibratuaren tarte linealean hobeto kokatzen dena) bakarrik hartu da kontuan.

Miaketa

Lehenik miaketa probak egin dira. Proba hauekin erauzketa baten efizientzian eragina izan ditzaketen aldagaiak zein diren ikusiko da. Horretarako aldeztatik erauzketan eragina izan dezaketela pentsa daitekeen aldagaiak hautatu dira: uraren temperatura (T), erauzketa denbora (t) eta irabiatzea (I).

Aldagai posible hauek Design Expert programan sartuz ondorioztatu da 3. taulan adierazitako erauzketak egin behar direla aldagai horiek garrantzia duten ala ez ikusteko. Suposatu denez erauzketa baldintza optimoak berdinak direla lagin solido guztientzat, proba hauek egiteko 15 lagina erabili da. Disoluzio guztiak 100 mL ur bidestilatu erabiliz egin dira, 250 mL-ko hauspeakin ontzietan, plaka berogailua eta irabiagailu magnetikoa erabiliz.

3. taula: Miaketa proba moduan egin beharreko erauzketak.

Erauzketa Proba	T (°C)	t (min)	I
1	60	3	Bai
2	20	1	Bai
3	100	1	Ez
4	20	5	Bai
5	100	5	Ez
6	60	3	Ez
7	20	5	Ez
8	100	1	Bai
9	100	5	Bai
10	60	3	Ez
11	60	3	Bai
12	20	1	Ez

Bestalde, lagin hauek solidoak direnez emaitzak erabilitako lagin solidoen pisuarekiko normalizatzeko lagin hauek pisatu dira, 4. taulako emaitzak lortuz.

4. taula: Lagin solidoen pisuak.

Poltsa	Erauzketak	Lagina (g)
1	2, 4	1,526
2	1, 6	1,492
3	3, 5	1,562
4	7, 12	1,506
5	10, 11	1,480
6	8, 9	1,660

Behin erauzketa hauek egin eta hoztu bezain laster, bakoitzetik 1 mL-ko alikuota hartu eta 25 mL-ko matraze aforatuetan isuri da, ur bidestilatuaarekin betez ondoren, kontzentrazioa frogak egiteko egokia izan dadin. Gero disoluzio originalen polifenol eduki totala determinatu da, Folin-Ciocalteu errektiboa eta MADDI metodoa erabiliz. Bi mikroplaka prestatu dira, bakoitzean 0,00; 1,04; 2,08; 3,12; 4,16; 5,20; 6,24; 7,28 eta 8,32 mg/L azido galikoko patroi disoluzioak eta 6 erauzketa proba dituena (1. mikroplaka: 1-6 erauzketa probak; 2. mikroplaka: 7-12 erauzketa probak), hauetako bakoitza 5. taulako errektibo eta bolumenekin.

5. taula: Diluzio faktore ezberdineko disoluzioak.

Erauzketa Proba	Gehitutako lagina (μL)	F-C erreaktiboa (μL)	Na_2CO_3 %7,5 (μL)	Ura (μL)	Diluzio faktorea
1-12	40	20	64	276	1/250
1-12	80			236	1/125

1. mikroplakako patroi disoluzioekin lortutako erregresio ekuazioa honakoa da: $A_R = 0,6647 \cdot C + 0,6141$; $R^2 = 0,9807$, 2. mikroplakakoekin lortutakoa, berriz, honakoa: $A_R = 0,7030 \cdot C + 0,2964$; $R^2 = 0,9738$. Beraz, behin kalibratuak eta laginen pisuak ezagututa, prestatutako laginen disoluzioak MADDIrekin prozesatu ondoren 6. eta 7. tauletako emaitzak lortu dira.

6. taula: 1 mikroplakako laginen emaitzak.

Erauzketa	A_R	C_1 (mg/L)	C_0 (mg/L)	C_0 (mg/g)
1	3,08	3,70	463	31
2	0,93	0,48	59	4
3	2,15	2,30	288	18
4	1,93	1,98	247	16
5	4,19	5,38	1346	86
6	2,69	3,13	391	26

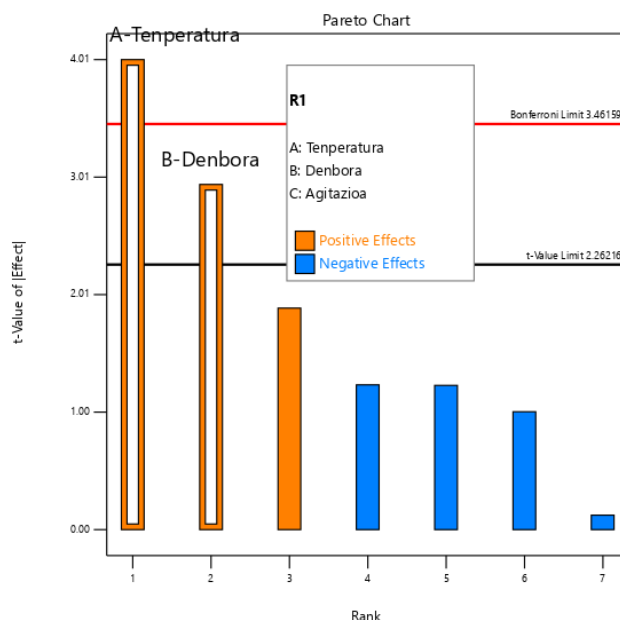
7. taula: 2 mikroplakako laginen emaitzak.

Erauzketa	A_R	C_1 (mg/L)	C_0 (mg/L)	C_0 (mg/g)
7	0,81	0,73	92	6
8	2,56	3,22	402	24
9	2,59	3,26	814	49
10	1,55	1,78	444	30
11	3,21	4,13	517	35
12	0,14	-0,22	-27	-2

Emaitza hauei kimiometria aplikatzerakoan Design Expert erabiliz, 8. taulako parametroak lortu dira, 12. irudian grafikoki azalduta ikus daitezkeenak.

8. taula: Miaketa frogaren aldagaien adierazgarritasuna.
m: adierazgarria; **e**: ez-adierazgarria

	Term	Stdized Effect	Sum of Squares	% Contribution
🔒	Intercept			
m	A-Temperatura	1.5355	4.71552	48.5095
m	B-Denbora	1.1276	2.54296	26.16
e	C-Agitazioa	-0.0470914	0.00443521	0.0456259
e	AB	0.72355	1.04705	10.7712
e	AC	-0.47125	0.444153	4.5691
e	BC	-0.38505	0.296527	3.05043
e	ABC	-0.4729	0.447269	4.60115
🔒	Curvature	0.242545	0.117656	1.21035
e	Lack of Fit		0.0815034	0.838442
e	Pure Error		0.0237348	0.244165



12. irudia: Miaketa frogako aldagaien adierazgarritasuna grafikoki.

12. irudian baloratu diren aldagai ezberdinen eta hauen arteko interakzioen eraginek izan dezaketen adierazgarritasuna ikus daiteke. Laranja eragin positiboa duten aldagaiak daude, hau da, aldagaiaren balio altuetan erantzun hobea ematen dutenak. Urdinez, berriz, eragin negatiboa dutenak, aldagaiaren balio negatiboetan erantzun hobea ematen dutenak. Ikus daitekeenez aldagaietako bi bakarrik dira adierazgarriak: temperatura eta denbora, irabiatzea ez da grafikoa agertu ere egiten.

Beraz, bai zenbakiekin edo bai grafikoki ikus daitekeena da irabiatzearen eragina ez dela adierazgarria, kontribuzioa %0,05aren inguruan dagoelako eta t balioa limitea baino askoz beherago. Horregatik, efektu adierazgarri bakarrak erauzketaren tenperatura eta iraupena direnez, gainerako eraginak eta hauen arteko elkarrekintzak ez dira kontuan hartuko optimizazioan. Hau honela, hemendik aurrerako erauzketa guztiak irabiagailu magnetikoa erabiliz egin dira erosotasunagatik.

Optimizazioa

Behin miaketa probak bukatuta daudela, eta emaitzak ezagututa, erauzketaren optimizazioa egin daiteke, horretarako, berriz ere Design Expert programaren argibideak jarraituz 9. taulan adierazten diren erauzketak prestatu dira.

9. taula: Optimizaziorako prestatutako disoluzioak.

Erauzketa Proba	T (°C)	t (min)
1	93	7
2	76,5	5
3	76,5	7,8
4	60	7
5	76,5	5
6	100	5
7	53	5
8	76,5	5
9	60	3
10	76,5	5
11	76,5	2,2
12	76,5	5
13	93	3

Proba hauek egiteko erabilitako laginen pisuak ere neurtu dira. 10. taulako emaitzetan ikus daitekeenez antzeko laginek pisu ezberdina dute ondoren hauek determinatzeko erabili den metodoaren arabera, posible da lehortasun maila ez izatea berdina egun ezberdinetan egin direlako eta lehortze denbora ez delako kontrolatua izan. Beraz, lagin solidoekin kontuan hartzeko beste aldagai bat izan daiteke hau lan honetan aztertuko ez den arren (alderatuko diren emaitzen laginek prozesu berbera jarraitzen dutelako).

10. taula: Erauzketa optimizatzeko erabilitako laginen pisuak.

Poltsa	Erauzketak	Lagina (g)	
		Irudi	Fotometro
1	6, 13	1,7563	1,5367
2	2, 3, 5	1,5260	1,3064
3	4	1,7821	1,5625
4	7	1,7735	1,5539
5	8, 10, 11, 12	1,7944	1,5748
6	9	1,6186	1,3990
7	1	1,7089	1,4893

Ondoren, berriz ere erauzketa proba hauei Folin-Ciocalteu proba erabiliz polifenol eduki totala determinatu zaie, oraingoan ez irudi digitalen analisia bakarrik, baizik eta espektrofotometroa ere erabiliz. Miaketa frogan bezala erauzketa bakoitzetik 1 mL 25 mL-ko matraze aforatuetara eramán da eta urarekin bete kontzentrazioa tarte egokiagoan egon dadin.

- Irudi digitalen analisi bidez

11. taulako disoluzioak prestatu dira 2 mikroplaketan (1. mikroplaka: 1-6 erauzketa probak; 2. mikroplaka: 7-13 erauzketa probak). Ez da patroirik disoluziorik prestatu miaketako patroiak baliatu direlako hemen ere.

11. taula: Diluzio faktore ezberdineko disoluzioak mikroplaketan.

Erauzketa Proba	Gehitutako lagina (µL)	F-C erreaktiboa (µL)	Na ₂ CO ₃ %7,5 (µL)	Ura (µL)	Diluzio faktorea
1-13	40	20	64	276	1/150
	80			236	1/125

Ondoren, prestatutako erauzketen disoluzioen irudiak MADDIrekin prozesatuz eta lehen sortutako kalibratua erabiliz hauen kontzentrazioak determinatu dira (12. eta 13. taulak), laginen pisuarekiko normalizatuz.

12. taula: 1 Mikroplakako laginen kontzentrazioak.

Erauzketa	A _R	C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
1	1,36	1,89	471	28
2	1,47	2,06	257	17
3	2,41	3,53	441	29
4	2,09	3,03	378	21
5	1,41	1,96	245	16
6	1,58	2,22	556	32

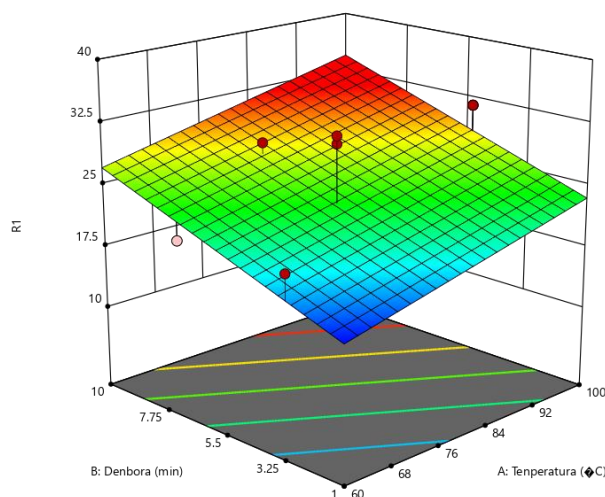
13. taula: 1 Mikroplakako laginen kontzentrazioak.

Erauzketa	A _R	C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
7	2,19	2,81	351	21
8	3,05	4,00	999	58
9	2,30	2,96	370	22
10	3,33	4,38	548	32
11	1,88	2,38	297	17
12	3,23	4,25	531	31
13	2,53	3,27	408	24

Azkenik, emaitza hauek eta Design Expert erabiliz modelo bat sortu da erauzketen efizientzia azaltzeko erabilitako aldagaien arabera. 14. taulan ikus daitekeen bezala modelo lineala da egokiena, hau da, kontzentrazioak aldagaiekiko zuzenki proportzionalak dira. Modelo hau hiru-dimentsioko grafiko moduan jarri daiteke 13. irudian egin den bezala.

14. taula: MADDI bidez lortutako emaitzak azaltzeko modeloa.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	24.07	1	1.59	20.48	27.66	
A-Temperatura	3.04	1	1.94	-1.35	7.44	1.0000
B-Denbora	2.45	1	1.94	-1.95	6.84	1.0000



13. irudia: MADDI bidez lortutako emaitzak azaltzeko modeloaren irudikapena.

13. irudian ikusten denez modelo lineala da, hau da, plano bat osatzen du, eta temperatura eta denborarekiko zuzenki proportzionala da erantzuna, balio maximoak infinituan daudelarik.

- Espektrofotometro bidez

Metodo espektrofotometrikoa burutzeko, berriz, 14. taulan agertzen diren errektibo eta bolumenak gehitu dira 10 mL-ko matrize aforatuetan eta ur bidestilatuarekin marraraino eraman, ondoren 765 nm-tan duten absorbantzia neurtu zaie. Azkenik, tarte linealean hobekien egokitzen den diluzio faktoredun emaitza hartu da ontzat.

14. taula: Diluzio faktore ezberdineko disoluzioak matrizeetan.

Erauzketa Proba	Gehitutako bolumena (mL)	F-C errektiboa (mL)	Na ₂ CO ₃ %7,5 (mL)	Ura	Diluzio faktorea
1-13	1	0,5	1,6	10 mL arte	1/250
	2				1/125

Ondoren, prestatutako erauzketen disoluzioen absorbantziak izanda eta jada sortutako kalibratua ($A = 0.0951 \cdot C + 0.0782$; $R^2 = 0,996$) baliatuz hauen kontzentrazioak determinatu dira (15. taula), laginen pisuarekiko normalizatuz.

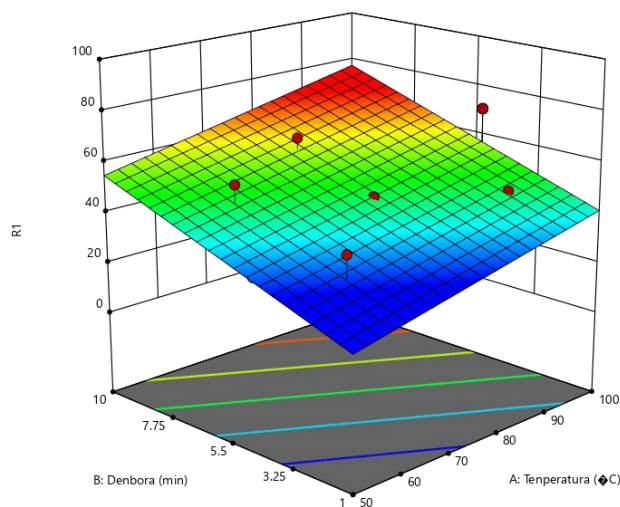
15. taula: Espektrofotometro determinatutako laginen kontzentrazioak.

Erauzketa	A (765 nm)	C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
1	0,362	2,98	745	50
2	0,295	2,28	570	44
3	0,390	3,28	820	63
4	0,404	3,43	856	55
5	0,312	2,45	613	47
6	0,494	4,37	1093	71
7	0,254	1,85	462	30
8	0,362	2,98	745	47
9	0,296	2,29	573	41
10	0,334	2,69	672	43
11	0,253	1,84	460	29
12	0,324	2,58	645	41
13	0,351	2,86	716	47

Azkenik, emaitza hauekin ere Design Expert erabiliz modelo bat sortu da erauzketen efizientzia azaltzeko erabilitako aldagaien arabera. 16. taulan ikus daitekeen bezala modelo lineala da egokiena emaitza hauentzat ere. Modelo hau hiru-dimentsioko grafiko moduan jarri daiteke 14. irudian egin den bezala.

16. taula: Espektrofotometro bidez lortutako emaitzak azaltzeko modeloa.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	46.66	1	2.24	41.67	51.66	
A-Temperatura	7.42	1	2.86	1.06	13.79	1.0000
B-Denbora	8.10	1	2.86	1.73	14.46	1.0000



14. irudia: Espektrofotometro bidez lortutako emaitzak azaltzeko modeloaren irudikapena.

14. irudian ikusten denez modelo hau ere lineala da, hau da, plano bat osatzen du, eta temperatura eta denborarekiko zuzenki proportzionala da erantzuna.

Irudi digitalen analisi bidez eta espektrofotometro bidez lortutako modeloen zehaztasunak ezberdinak diren arren koherenteak dira eta ondorio garbi batzuk atera daitezke: Aztertutako tartean behintzat, erauzketaren efizientzia zuzenki proportzionala da bai erabilitako temperaturarekiko baita denborarekiko ere.

Beraz, denbora gehiagoz eta temperatura altuagoz erauzketak eginda kontzentrazio altuagoak lortuko lirakeen arren, baldintza praktikoengatik ezinezkoa da 100 °C-tik gorako temperaturekin eta 10 minutu baino gehiagoz egitea erauzketak, ondorioz, hauek izan dira erauzketa guztiak egiteko baldintzak.

4.1.2. Diluzioen Optimizazioa

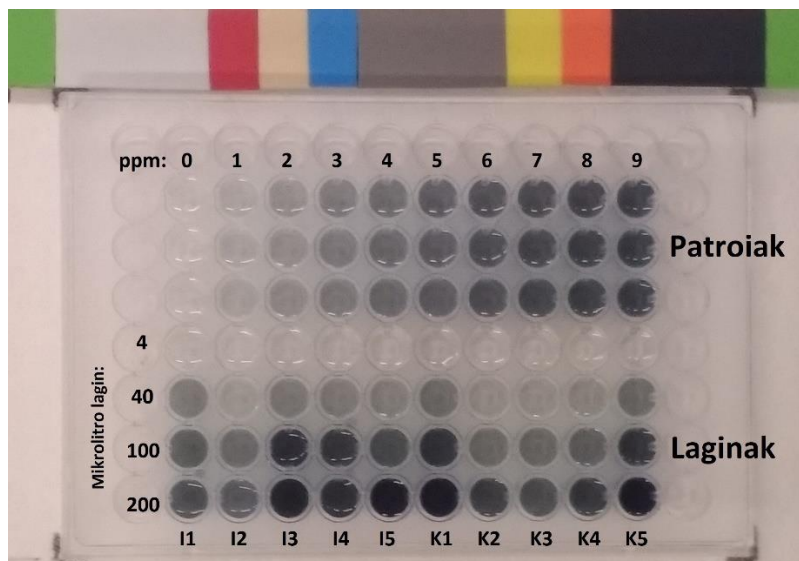
Neurtu nahi diren laginen polifenol kontzentrazio totalak irudi digitalen analisi bidezko determinazio metodoaren tarte linealaren erdi aldean, edo barruan behintzat, egon daitezen beharrezkoa da diluzio faktore egoki bat aurkitzea lagin bakoitzarentzat.

Lagin guztien kontzentrazioak ezezagunak direnez, diluzio proba ezberdinak egin dira eta hauei Folin-Ciocalteu metodoa aplikatu zaie. Horretarako mikroplaka bat prestatu da, 0,00; 1,02; 2,04; 3,06; 4,08; 5,10; 6,12; 7,14 eta 8,16 mg/L azido galikoko patroiz disoluzioak dituen eta 17. taulan adierazten diren laginen diluzioak eta dagozkien erreaktiboak. Kontuan hartu behar da lagin hauei jada 1/25 diluzioa egin zaiela erauzketaren ondoren.

17. taula: Diluzio faktore egokia aurkitzeko erabilitako kontzentrazio ezberdineko disoluzioak.

Lagina	Gehitutako bolumena (µL)	F-C erreaktiboa (µL)	Na ₂ CO ₃ %7,5 (µL)	Ura (µL)
I1-R5	4	20	64	312
	40			276
	100			216
	200			116

Prestatutako mikroplakari 2 orduren ondoren argazkia aterata (15. irudia) begi-bistaz aukeratu dira diluzio faktore egokienak laginentzat.



15. irudia: Patroi eta lagin disoluzioak prestatutako mikroplakaren argazkia.

Kontuan hartu behar da erauzketaren eraginkortasuna ez dela beti berdina, ezta laginak ere, beraz alferrikakoa litzateke lagin hauen diluzio koefiziente optimo zehatza aurkitzea, beste laginentzako (nahiz eta antzekoak izan) ez bailirateke berdinak izango.

Beraz, begi-bistaz ikus daitekeenez lagin batzuentzat 40/400 faktorea (1/250 diluzio guztiak kontuan hartuz gero) kalibratuaren tarte linealaren erdialdetik hurbilago dagoen bitartean, beste batzuentzat 100/400 faktorea (1/100 diluzio guztiak kontuan hartuta) hurbilago dago. Hau honela lagin guztientzat 60/400 (6/1000) diluzio faktorea hartu da egokitzen, eta kasuan kasu moldaketak egin.

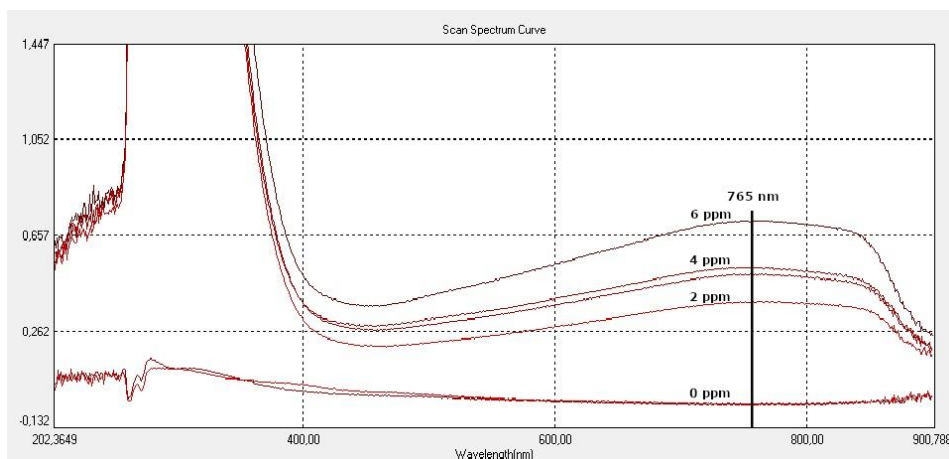
4.2. Absorbantziaren Optimizazioa

4.2.1. Espektrofotometria

Espektrofotometro bat erabiltzerakoan beharrezkoa da jakitea determinatu nahi den analitoak zein uhin-luzeratan duen absorbantzia maximoa, uhin-luzera horretan egindako neurketek sentikortasun hobea izango dutenez determinazioaren emaitzak hobeak izango baitira. Eta irudi digitalen analisia balioztatzeko erabili den metodoa hau denez komenigarria da ahalik eta neurketa zehatzenak egitea.

Uhin-luzera zehatz hau zein den jakiteko kontzentrazio ezberdineko disoluzioen UV-Vis espektro osoa neurtu da. Horretarako 0,00; 2,06; 4,12 eta 6,18 mg/L azido galikoko

disoluzioei Folin-Ciocalteu erreakzioa aplikatu zaie 10 mL-ko matrize aforatuetan eta 1 cm-ko kubeta batean sartu ondoren lehen adierazitako espektrofotometroa erabiliz 200 nm-tik 900 nm-tara, 1 nm-ko jauziekin, disoluzioen absorbantzia neurtu da 16. irudiko espektroak lortuz.



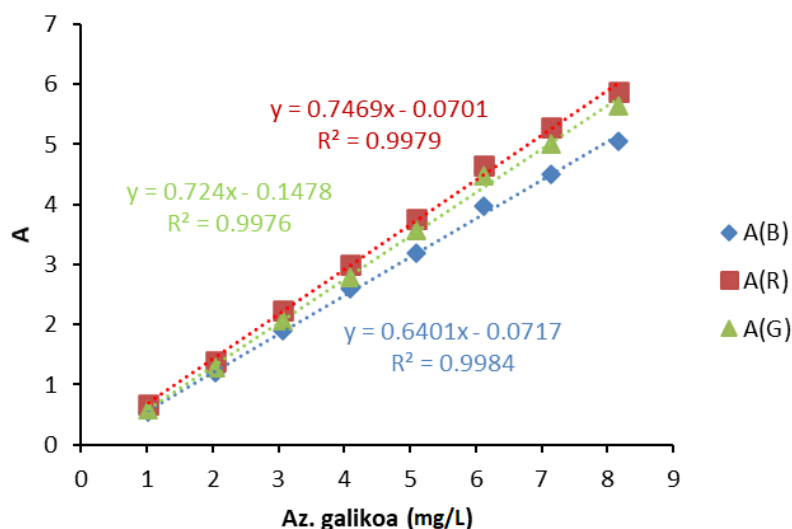
16. irudia: Kontzentrazio ezberdineko disoluzioen UV-Vis espektro osoak.

Ikus daitekeenez, kurba guztien maximoa 765 nm-tan dago, beraz, uhin-luzera horretan egingo dira neurketa guztiak espektrofotometroarekin.

4.2.2. Irudi Digitalen Analisia

Espektrofotometroan egin den bezala, irudi digitalen analisiarekin ere absorbantzia maximoa erakusten duen kanala aukeratu behar da, sentikortasun hobeak metodoa hobe egiten duelako.

Metodo honekin analisiak egiteko kanal onena zein den (R, G edo B, HSV sistema baztertu baita) jakiteko, 0,00; 1,02; 2,04; 3,06; 4,08; 5,10; 6,12; 7,14 eta 8,16 mg/L azido galikoko disoluzioak prestatu eta neurtu dira, kasu honetan, ordea, absorbantzia maximoa kontuan hartzeaz gain, tarte lineala eta linealtasuna ere kontuan hartu beharreko parametroak dira, metodo espektrofotometrikoarekin ez bezala irudi digitalen analisi bidez lortzen diren absorbantzia balioak ez baitira hain ondo ezagutzen eta espero gabeko portaerak izan ditzakete kanal ezberdinek. Horregatik, disoluzio solteak neurtu eta irudikatu beharrean disoluzioen argazkia MADDIrekin prozesatu eta kolore kanal bakoitzarentzat zuzen bat irudikatu da (17. irudia).



17. irudia: Patroi disoluzioen hiru kanaletako absorbantziaren irudikapena.

17. irudian erraza da begi-bistaz ikustea zein kanal den malda handieneko zuzena ematen duena, hau da, absorbantzia balio handiagoak ematen dituena kontzentrazio berdineko patroientzat: R (red) kanala.

Hala nola, absorbantzia balioei erreparatu beharrean balio kuantitatibo bat lortze aldera patroi bakoitzean kanal bakoitzak duen absorbantziaren ekarpena kalkulatu da absorbantzia totalaren ehuneko moduan 18. taulan, baita hauen batezbestekoak ere, desbideratze estandar txikiak dituztenak, hau da, espero bezala eta espektrofotometroan gertatzen den bezala, kontzentrazioak absorbantzia proportzionalki aldatzen du uhin-luzera guztietan.

18. taula: Patroi disoluzioen kanalen absorbantzia erlatiboak.

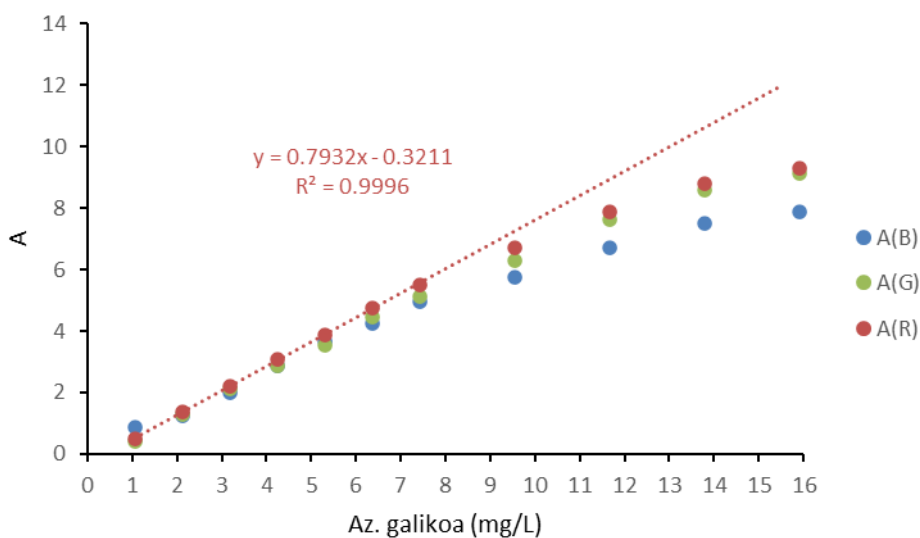
Az. galiko (mg/L)	A _R	%	A _G	%	A _B	%
1,02	0,67	37,09	0,59	32,60	0,55	30,31
2,04	1,38	35,78	1,27	33,09	1,20	31,13
3,06	2,24	36,17	2,06	33,28	1,89	30,55
4,08	3,01	35,81	2,79	33,29	2,59	30,90
5,10	3,75	35,74	3,56	33,95	3,18	30,30
6,12	4,66	35,55	4,48	34,19	3,96	30,26
7,14	5,29	35,72	5,01	33,83	4,51	30,45
8,16	5,88	35,49	5,64	34,04	5,05	30,47
Batezbeste:		35,92		33,53		30,55

Gogoratu 9. irudia, absorbantzia balio hauek eta irudiko tontor bakoitzaren azalera proportzionalak dira, beraz, ehuneko handiena duen kanala izango da tontorraren azalera handiena duena, eta beraz, egokiena irudi digitalen analisia aplikatzerako orduan. Kasu honetan disoluzioak urdin ilun, ia beltz kolorekoak direnez, absorbantzia hiru kanaletan nahiko handia da, eta ez dago izugarrizko ezberdintasunik, hiru kanaletako edozein erabil litekeelarik. Halere, R kanalean absorbantzia zertxobait handiagoa denez hau aukeratu da metodo hau burutzeko. Espero bezala, eta espektrofotometroan jarraitzen den printzipio berarekin, uhin-luzera optimoa ikusten den kolorearekiko osagarria da. Gainera 10. irudia berriz begiratzuz ikus daiteke kasu honetan kolore osagarria (optimoa) laranja izango litzatekeen arren kanal hau ez dagoenez, eta hurbilena gorria denez, hau dela egokiena.

4.3. Irudi Digitalen Analisi Bidezko Metodoaren Balidazioa

4.3.1. Tarte Lineala

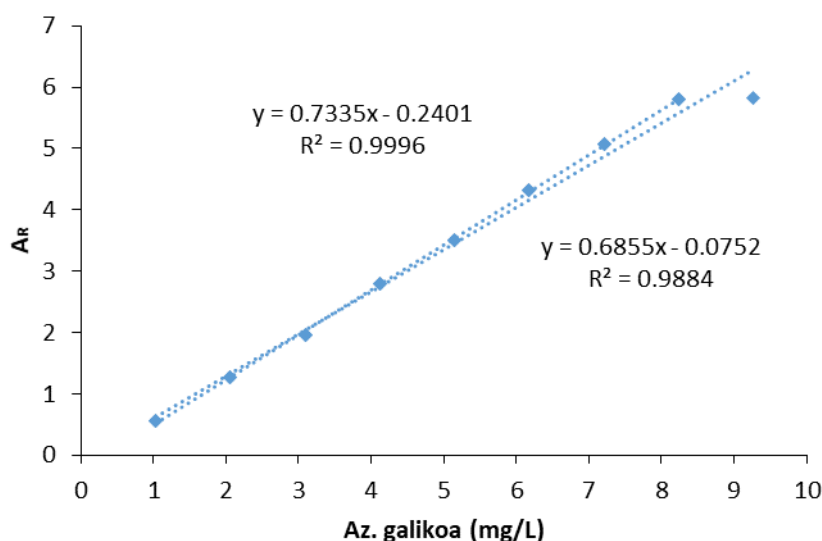
Metodo hau erabiliz aztertu daitekeen azido galiko kontzentrazioen tarte determinatzeko 0,00; 1,06; 2,12; 3,18; 4,24; 5,30; 6,36; 7,42; 9,54; 11,66; 13,78 eta 15,90 mg/L azido galikoko patroi disoluzioak prestatu dira, tarte lineala izan litekeela susmatzen den kontzentrazioen ingurukoak, eta argazkia atera ondoren MADDIrekin prozesatu dira. Azkenik, hiru kanaletako absorbantziak (ziurtatzeko linealtasunaren jokaera ez dela kanalarekin aldatzen) irudikatu dira kontzentrazioen aurrean 18. irudian.



18. irudia: Patroi disoluzioen kanal guztien absorbantzien irudikapena hauen kontzentrazioekiko.

18. irudia begi-bistaz aztertuz ikus daitekeenez kanal guztietan tarte lineala antzekoa izango dela, eta Folin-Ciocalteu erreakzioaren irudi digital bidezko analisiarentzat kanal egokiena R dela, honekin egin da lan. Gainera, ikus daiteke Linealtasuna mantentzen dela 7-8 mg/L inguruko patroiarte, ondoren, ordea, kontzentrazio altuagoko patroiak lerro zuzenetik gero eta gehiago urruntzen dira.

Beraz, behin emaitza hauek ikusita tarte lineala hobeto mugatzeko asmoz 0,00; 1,03; 2,06; 3,09; 4,12; 5,15; 6,18; 7,21; 8,24 eta 9,27 mg/L azido galikoko patroia disoluzioak prestatu eta absorbantziak neurtu dira argazkia MADDIrekin prozesatuz, tarte lineala izan litekeena hurbilgotik aztertzeko, eta absorbantzia hauek kontzentrazioarekiko irudikatuz lortu da 19. irudia.



19. irudia: Patroi disoluzioen absorbantzien irudikapena hauen kontzentrazioekiko.

Irudikapen honetan ikus daitekeena da lehen bezala 8 mg/L-rainoko patroia disoluzioen absorbantziak zuzenki proportzionalak direla kontzentrazioarekiko, 9 mg/L-koa, ordea, lerro zuzenetik urrundu egiten dela. 19. irudiko ekuazioak kontuan hartuz, 9 mg/L-ko patroia kontuan hartzen ez duen erregresioaren koefizientea 0,9996koa den bitartean (oso ona), kontuan hartzen duenarena 0,9884koa da, ez hain onargarria.

Hau honela, lan honetan onargarritzat hartu den tarte lineala 0-8 mg/L azido galiko baliokide duten disoluzioek osatzen dutena da.

4.3.2. Detekzio eta kuantifikazio mugak

Sarreran azaldu bezala, metodo baten detekzio eta kuantifikazio mugak neurtzeko bi modu nagusi daude: Erregresio zuzenaren desbideratsetik eta lagin zuri ezberdinen seinaleen arteko desbideratsetik.

Zuzenaren desbideratzetik

Erregresio zuzen bat eta honen desbideratzea lortzeko zuzen bat osatuko duten disoluzioak prestatu eta neurtu dira mikroplaka batean MADDI erabiliz, 0,00; 1,03; 2,06; 3,09; 4,12; 5,15; 6,18; 7,21 eta 8,24 mg/L azido galikoko patroï disoluzioak hain zuzen ere. Ondoren hauen absorbantziak kontzentrazioekiko irudikatuz eta Excel-en datuen analisia erabiliz puntu hauek zuzen batera doitzuz, 19. taulan adierazten diren zuzen honen ezaugarriak lortu dira.

19. taula: Patroï disoluzioekin lortutako zuzenaren parametroak.

Parametroa	Balioa
m	0,7335
b	-0,401
R ²	0,9996
S _r	0,039

Metodo honekin detekzio eta kuantifikazio mugak neurtzeko sarreran azaldutako definizioak (4 eta 5. ekuazioak) baliatu dira. Ekuazio hauek zuzen honen parametroei aplikatuz gero honako balioak lortuz:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_r}{m} = \frac{3 \cdot 0,039}{0,7335} = 0,16 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_r}{m} = \frac{10 \cdot 0,039}{0,7335} = 0,53 \text{ mg/L}$$

Zurien desbideratzetik

Lagin zurien desbideratzea lortzeko 6 lagin zuri prestatu dira eta mikroplakan sakabanatuta kokatu. Honela prestatu dira disoluzioak: 20 µL Folin-Ciocalteu erreaktibo, 64 µL Na₂CO₃ (% 7,5) disoluziotik eta 316 µL ur 400 µL-ra iritsi arte. Ondoren, mikroplaka honen argazkia MADDIrekin prozesatuz hauen absorbantzia seinaleak lortu dira, 20. taulan adierazita daudenak, hauen batezbesteko eta desbideratze estandarraz gain.

20. taula: Patroi zurien absorbantzia balioak.

Erreplika	A_R
1	0,00
2	-0,02
3	-0,04
4	-0,04
5	-0,02
6	0,11
\bar{A}_R	0,00
s	0,06

Metodo honekin detekzio eta kuantifikazio limiteak kalkulatzeko definizioak (4. ekuazioa) aplikatuz ondorengo balioak lortu dira:

$$y_{LOD} = \bar{y} + 3 \cdot s = 0,000 + 3 \cdot 0,055 = 0,16$$

$$y_{LOQ} = \bar{y} + 10 \cdot s = 0,000 + 10 \cdot 0,055 = 0,55$$

Ondoren, kalibratu baten ekuazioa ($A_R = 0,772 \cdot C + 0,088$) baliatuz, seinalearen balioak kontzentrazio seinale bihurtu dira (5. ekuazioa):

$$y_{LOD} = 0,16 \quad \rightarrow \quad LOD = 0,10 \text{ mg/L}$$

$$y_{LOQ} = 0,55 \quad \rightarrow \quad LOQ = 0,33 \text{ mg/L}$$

Balio hauetatik ondorioztatu daitekeena da nahiz eta patroi disoluzio zurien desbideratzetik lortutako detekzio eta kuantifikazio mugak baxuagoak diren, zuzenaren erregresioaren desbideratzetik lortutako detekzio eta kuantifikazioa mugak ere ez direla askoz altuagoak. Beraz, esan daiteke Folin-Ciocalteu metodoaren irudi digital bidezko analisiak kontzentrazio erlatiboki baxuak detektatzeko eta baita kuantifikatzeko ere balio duela.

4.3.3. Prezisioa

Irudi digitalen analisi bidezko metodoaren errepikakortasuna eta erreproduzigarritasuna neurtzeko 21. taulan agertzen diren disoluzioak baliatu dira, sarreran Folin-Ciocalteu erreakzioarentzat azaldutako prozedura jarraituz prestatuta. Kasu honetan, azido galikoa ez ezik, azido tanikoa duten patroi disoluzioak ere erabili

dira, honela froga hauek lagin errealekin (polifenol mota ezberdinak dituzten disoluzioekin) ere berdin jokatu dutela ziurtatzeko.

21. taula: MADDren prezisioa neurtzeko erabilitako disoluzioak.

	Kontzentrazioa (mg/L)	μL Stock (100 mg/L)	μL F-C erreaktibo	μL Na_2CO_3 (% 7,5)	μL Ur bidestilatu
	0	0	20	64	316
Azido galikoa	3	12			304
	10	40			276
	Azido tanikoa	3			12
	10	40			376

Froga hauentzat ez da beharrezkoa kontzentrazio balio esperimentalak lortzea absorbantziarekiko proportzionalak direnez hauen errepikakortasuna ere hala izango baita, beraz, seinalearen balioarekin bakarrik egin dira azterketa hauek.

Errepikakortasuna

Metodoaren errepikakortasuna neurtzeko, sarreran azaldu bezala, ahalik eta baldintza antzekoetan neurtutako lagin ezberdinak behar dira. Honetarako, disoluzio berberak erabiliz eta egun berean, 6 mikropilaka prestatu dira 21. taulan adierazi diren 5 disoluzioekin bakoitza.

Ondoren, mikropilaka bakoitzari argazki bat atera zaio, guztira 6 argazki lortuz, eta argazki hauek MADDrekin prozesatu dira, disoluzio bakoitzaren absorbantzia balioak lortuz, 22. taulan ageri direnak. Kontuan hartu beharra dago zuriaren seinale balioak ez direla absorbantziaren baliokideak, R kanalaren balio gordinak baizik (logaritmorik aplikatu gabe), halere, helburu honetarako baliagarriak dira, berdin-berdin alderatu baitaitezke elkarren artean.

22. taula: Errepikakortasuna ikusteko neurtutako disoluzioen absorbantziak.

Absorbantzia	1. eguna						RSD _r (%)
	1	2	3	4	5	6	
Zuria	192,64	192,77	190,98	195,92	195,50	197,58	1,28
Galiko 3 mg/L	1,60	1,57	1,56	1,66	1,57	1,50	3,27
Taniko 3 mg/L	1,41	1,37	1,38	1,37	1,37	1,33	1,73
Galiko 10 mg/L	3,93	3,90	3,89	4,11	3,98	3,89	2,14
Taniko 10 mg/L	3,38	3,30	3,16	3,39	3,45	3,08	4,39
Batezbeste:							2,56

Erreproduzigarritasuna

Metodoaren erreproduzigarritasuna neurtzeko, berriz, analisi berdinak baldintza ezberdinetan egin behar dira. Beste laborategi edo teknikari baten faltan, 6 mikroplaka prestatu dira berriz ere 21. taulako 5 disoluzioekin bakoitza, baina oraingoan ez dira egun berean eta disoluzio berberekin prestatu. Eguneko 2 mikroplaka prestatu dira, sodio karbonato disoluzio berriekin.

Azkenik, lehen azaldu bezala, mikroplaka bakoitzari argazki bat atera zaio, guztira 6 argazki lortuz, eta azkenik argazki hauek MADDrekin prozesatu dira, absorbantzia balioak lortuz. 23. taulan dauden emaitza hauek aurreko atalean azaldutako salbuespen berdina jarraitzen dute.

Prestatutako disoluzioei MADDI metodoa aplikatu ondoren 23. taulan agertzen diren absorbantzia balioak lortu dira, egun bakoitzeko 2 mikroplaka eta mikroplaka bakoitzeko 5 disoluzio.

23. taula: Erreproduzigarritasuna ikusteko neurtutako disoluzioen absorbantziak.

Erreproduzigarritasuna	Absorbantzia		1. eguna		3. eguna		5. eguna		RSD _R (%)
	1	2	1	2	1	2	1	2	
Zuria	192,64	192,77	190,23	199,19	194,42	198,38			1,80
Galiko 3 mg/L	2,26	2,25	2,34	2,34	2,32	2,31			1,70
Taniko 3 mg/L	2,24	2,23	2,30	2,29	2,27	2,27			1,15
Galiko 10 mg/L	2,48	2,47	2,88	2,85	2,82	2,75			6,88
Taniko 10 mg/L	2,42	2,42	2,59	2,58	2,47	2,44			3,09
							Batezbeste:		2,92

Ikus daitekeenez, prestatutako disoluzio ezberdin ia guztien desbideratze estandar erlatiboak (RSD) % 5aren azpitik daude. Eta batezbesteko desbideratze estandar erlatiboak, bai errepikakortasunarenak (RSD_r) bai erreproduzigarritasunarenak (RSD_R), hau da, egun berean prestatutako mikroplakenak eta egun ezberdinetan prestatutakoenak, % 3aren inguruan dabilta.

Kontuan izan behar da, nahiz eta argiaren zuzenketa bat aplikatu zaien absorbantzia balio hauei, irudi digitalen deskonposizio bidez egiten den mikroplaka analisi hauen baldintzak asko aldatu daitezkeela, eta honek azken emaitzetan izugarritzko eragina izan dezakeela. Argi-baldintza ezberdinen eragina ez ezik (nahiz eta zuzenketa aplikatu eragina ez baita guztiz desagertzen) erreakzio kolorimetroko hau burutzeko baldintzak ere aldatu baitaitezke: disoluzioen kontzentrazioak, bolumenen zehaztasunak...

Hau guztia errore esperimentalaren barruan sartzen da, eta hau da prezisioak neurtzen duena: zenbaterainokoa den errore hau. Gainera, auresandako RSD_r -a % 11koa da mg/L magnitudeko emaitzentzat, eta auresandako RSD_R -a % 16koa.^[20] Errepikakortasunak eta erreproduzigarritasunak % 2,56 eta % 2,92ko emaitzak izateak hurrenez hurren, metodo honen prezisioa ez onargarria bakarrik, baizik eta oso ona izatea egiten du.

4.3.4. Zehaztasuna

Irudi digitalen analisi bidezko determinazioen zehaztasuna frogatzeko metodo estandar batekin alderatu dira lortutako emaitzak, metodo espektrofotometrikoarekin hain zuzen ere. Horretarako hainbat prozedura jarraituz analizatu dira laginak: MADDI erabiltzen duten hiru prozedura eta espektrofotometroa darabilen bat.

Hasteko, laginen disoluzioak prestatu dira, ondoren hauei Folin-Ciocalteu erreakzioa aplikatzeko. Lagin batzuk solidoak direnez bertatik polifenolak erauzteko aurretratatendu bat egin zaie, aurretik erauzketaren optimizazioan azaldu dena (5 minutuz, 0,2 L uretan, 100°C-tan eta irabiatuz), eta azkenik lagin hauetatik 1 mL hartu eta 10 mL ko matrizeetan isuri da, ur bidestilatuarekin marraraino betez. Matrize hauetatik abiatuz egingo dira hurrengo prozedurak, hau da, gehitu den lagin bolumena disoluzio hauetatik hartutako da.

Patroi independenteak eta MADDI erabiliz

Metodo honen barruan bi prozedura ezberdin jarraitu dira: lagin eta patroiien Folin-Ciocalteu erreakzioak mikroplakako putzuetan prestatzea (MADDI 1) eta matrize aforatuetan prestatzea (MADDI 3).

- MADDI 1:

Disoluzioak mikroplakan prestatzeko 24. taulan agertzen diren erreaktibo eta bolumenak gehitu dira putzuetara. Hauez gain, 0,00; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00 eta 8,00 mg/L azido galikoko patrioiak prestatu dira mikroplakan, kalibratua sortzeko.

24.taula: Mikroplaketako laginak prestatzeko errektibo eta bolumenak.

Lagina	μL lagin	μL F-C errektibo	μL Na ₂ CO ₃ (% 7,5)	μL Ur bidestilatu	Diluzio faktorea
I1	60	20	64	256	6/400
I2	60			256	6/400
I3	30			286	3/400
I4	60			256	6/400
I5	30			286	3/400
K1	60			256	6/400
K2	60			256	6/400
K3	60			256	6/400
K4	60			256	6/400
K5	60			256	6/400

Ondoren, mikroplaka honi mugikorrarekin argazkia atera eta MADDIrekin lagin eta patroi disoluzioen absorbantziak lortu dira, azkenik datu hauei dagokien tratamendua emateko. Honela $A_R = 0,7719 \cdot C + 0,0884$ ($R^2 = 0,9967$) ekuazioa duen kalibratua lortu da.

Laginekin lortutako absorbantzia balioak eta kalibratuaren ekuazioa erabiliz 25. taulako polifenol totalen kontzentrazioak lortu dira (azido galiko baliokideak), azkenik diluzio faktorea aplikatu zaie disoluzio originalen kontzentrazioak lortzeko, eta lagin solidoen kasuan kontzentrazio hauek erabilitako laginen pisuarekiko estandarizatu dira.

25. taula: Lagin errealei egindako neurketak mikroplakan prestatutako patroi independenteak erabiliz.

Lagina	A _R	C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
I1	1,85	2,28	152	22
I2	1,74	2,14	143	20
I3	2,70	3,38	450	51
I4	3,93	4,97	331	41
I5	2,54	3,18	424	56
K1	4,46	5,67	378	
K2	2,31	2,88	192	
K3	5,34	6,80	453	
K4	3,49	4,41	294	
K5	5,88	7,50	500	

- MADDI3:

Jarraitu den beste prozedurarako, laginak eta patrioiak matrazeetan prestatzeko, 26. taulako errektibo eta bolumenak gehitu dira hurrenez hurren 10 mL-ko matraze aforatuetan, Folin-Ciocalteu errektioari dagozkion pausuak jarraituz. Hauez gain, 0,00; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00 eta 8,00 mg/L azido galikoko patrioiak ere prestatu dira prozedura honekin kalibratua lortzeko.

26.taula: Matrazeetako laginak prestatzeko errektibo eta bolumenak.

Lagina	mL lagin	mL F-C errektibo	$\mu\text{L Na}_2\text{CO}_3$ (% 7,5)	Ur bidestilatua	Diluzio faktorea
I1	2	0,5	1,6	10 mL arte	1/50
I2	2				1/50
I3	2				1/50
I4	2				1/50
I5	1				1/50
K1	2				1/50
K2	4				1/25
K3	2				1/50
K4	2				1/50
K5	2				1/50

Ondoren, matrazeetako disoluzio hauetatik 400 μL hartu eta mikroplaka batean isuri dira, mikroplaka honi mugikorrarekin argazkia atera eta MADDIrekin lagin eta patrioi disoluzioen absorbantziak lortu, eta azkenik datu hauei dagokien tratamendua egin zaie. I3, I5 eta K5en kasuan, ordea, kontzentrazioa handiegia denez tarte linealean sartzeko, 200 μL disoluzio gehitu dira mikroplakara, eta ondoren beste 200 μL ur bidestilatu gehitu. Beraz, hauen diluzio faktorea 1/100 izango da.

Lortu den kalibratuaren ekuazioa ondorengoa da: $A_R = 0,7719 \cdot C + 0,0884$; $R^2 = 0,9967$. Lehen bezala, laginen absorbantziak eta kalibratuaren ekuazioa erabiliz 27. taulako polifenol totalen kontzentrazioak lortu dira (azido galiko baliokideak), azkenik diluzio faktorea aplikatu zaie disoluzio originalen kontzentrazioak lortzeko, eta lagin solidoen kasuan kontzentrazio hauek erabilitako laginen pisuarekiko estandarizatu dira.

27. taula: Lagin errealei egindako neurketak matrazeetan prestatutako patroi independenteak erabiliz.

Lagina	A _R	C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
I1	3,14	4,41	220	31
I2	2,06	3,10	155	21
I3	5,21	6,92	692	79
I4	5,92	7,77	389	48
I5	5,52	7,29	729	96
K1	6,95	9,02	451	
K2	5,30	7,02	176	
K3	8,65	11,07	554	
K4	6,90	8,96	448	
K5	5,60	7,38	738	

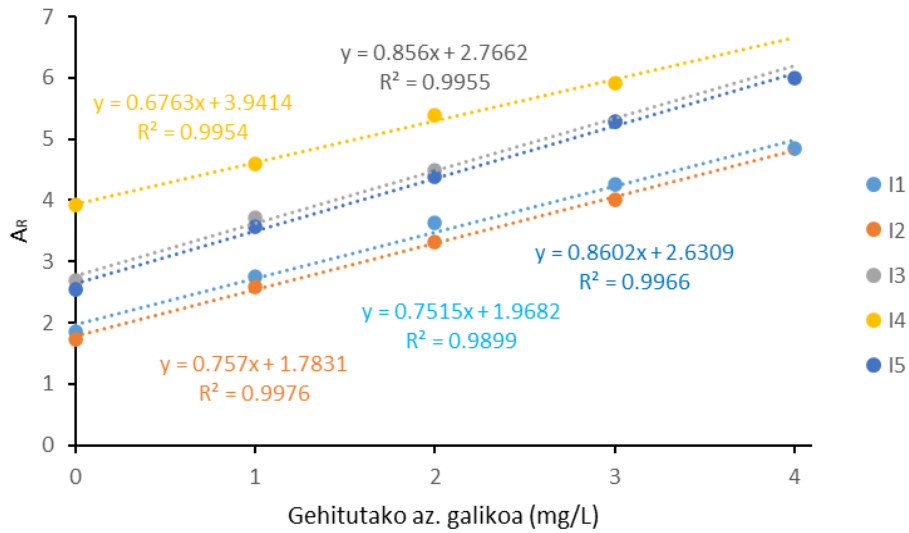
Patroi gehikuntza eta MADDI erabiliz (MADDI 2)

Metodo hau erabiltzeko lagin bakoitzarentzat 28. taulan agertzen diren erreaktibo eta bolumenak erabiliz prestatu dira Folin-Ciocalteu erreakzioak. Lagin batzuk kontzentrazio altuagoa dutenez (I3 eta I5), hauekin 28. taulako prozedura berdina jarraitu da baina 30 µL lagin bakarrik gehituta, beraz, hauentzat diluzio faktorea 3/400 izango da.

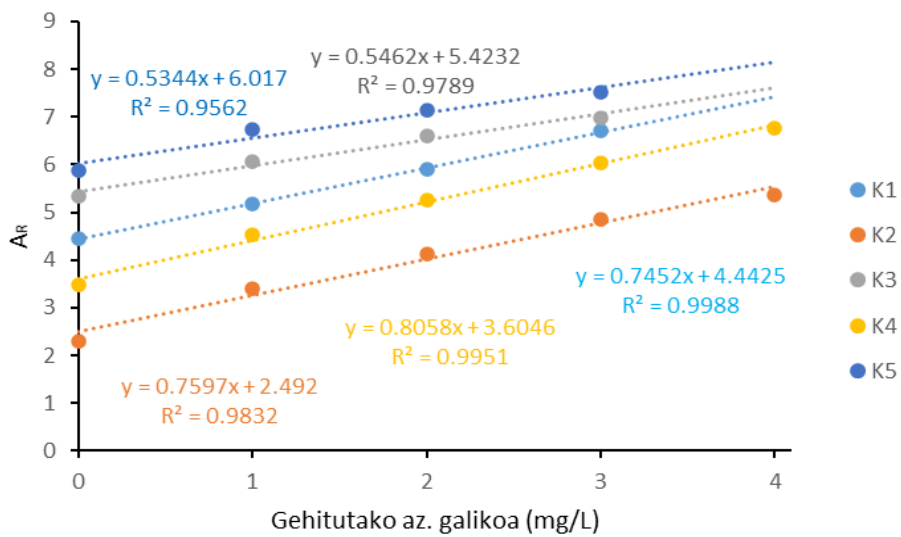
28. taula: Laginen kontzentrazioa patroi gehikuntzarekin determinatzeko prestatutako disoluzioak.

µL Lagin	µL Stock (100 mg/L)	µL F-C erreaktibo	µL Na ₂ CO ₃ (% 7,5)	µL Ur bideestilatu	Diluzio faktorea
60	0	20	64	256	6/400
60	4			252	
60	8			248	
60	12			244	
60	16			240	

Azkenik, disoluzio hauek sartzeko behar izan diren 3 mikroplakei argazki bana atera eta MADDIrekin disoluzio guztien absorbantziak lortu dira eta gehitu zaien azido galiko kontzentrazioaren aurrean irudikatuta 20. (lagin solidoak) eta 21. (lagin likidoak) irudiak lortu dira.



20. irudia: Patroi gehikuntzarekin lortutako zuzenak lagin solidoentzat.



21. irudia: Patroi gehikuntzarekin lortutako zuzenak lagin likidoentzat.

Erregresio hauen ekuazioak baliatuz, erabilitako laginen kontzentrazioak lortu dira, hauei diluzio faktorea aplikatu zaie, eta berriz ere lagin solidoak erabilitako laginen pisuarekiko estandarizatu dira, MADDI 2 deitu zaien emaitza hauek 29. taulan ikus daitezke.

29. taula: Lagin errealei egindako neurketak matrazeetan prestatutako patroi independenteak erabiliz.

Lagina	Zuzena		C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
	m	b			
I1	0,7515	1,9682	2,62	175	25
I2	0,7570	1,7831	2,36	157	21
I3	0,8560	2,7662	3,23	431	49
I4	0,6763	3,9414	5,83	389	48
I5	0,8602	2,6309	3,06	408	54
K1	0,7452	4,4425	5,96	397	
K2	0,7597	2,4920	3,28	219	
K3	0,5462	5,4232	9,93	662	
K4	0,8058	3,6046	4,47	298	
K5	0,5344	6,0170	11,26	751	

Patroi independenteak eta espektrofotometroa erabiliz

Prozedura hau lehen azaldutakoaren oso antzekoa da, neurketa hauek egiteko MADDI 3 prozedurarekin prestatutako disoluzio berberak erabili dira, bai laginenak bai patroiarenak, prozedura hauen arteko errorea minimizatzeko asmoz.

Disoluzio hauek 1 cm-ko kubetan sartu eta espektrofotometroan, 765 nm-tan absorbantzia neurtu zaie (3 aldiz, batezbestekoa eginez).

Patroi disoluzioekin lortutako kalibrazio ekuazioa ondorengoa da: $A = 0,0984 \cdot C - 0,04331$; $R^2 = 0,998$. Ondoren, laginen absorbantziak neurtuta, kalibratua aplikatuz hauen polifenol total kontzentrazioa lortu da, azido galiko baliokidetan. Emaiza hauei diluzio faktorea aplikatu ondoren eta lagin solidoak erabilitako laginaren pisuarekiko estandarizatu ondoren 30. taulako emaitzak lortu dira. Emaiza multzo honi Fotometro deituko zaio aurrerago.

30. taula: Lagin errealei egindako neurketak matrazeetan prestatutako patroi independenteak erabiliz.

Lagina	A (765 nm)	C ₁ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/g)
I1	0,4665	5,18	259	37
I2	0,2465	2,94	147	20
I3	1,3065	13,72	686	78
I4	0,7338	7,89	395	49
I5	1,2913	13,56	678	89
K1	0,8148	8,72	436	
K2	0,5748	6,28	157	
K3	0,9925	10,52	526	
K4	0,8110	8,68	434	
K5	1,2680	13,32	666	

Alderaketa

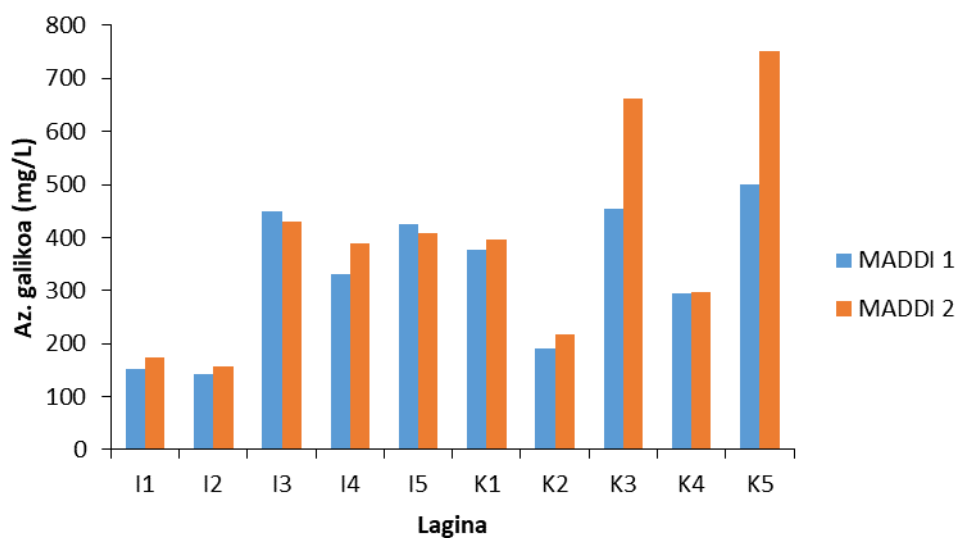
Eraitza hauek guztiak eskura izanda:

- MADDI 1: Patroi independenteak eta irudi digitalen analisia erabiliz determinatutako, mikropakan prestatutako disoluzioen kontzentrazioak.
- MADDI 2: Patroi gehikuntza eta irudi digitalen analisia erabiliz determinatutako, mikropakan prestatutako disoluzioen kontzentrazioak.
- MADDI 3: Patroi independenteak eta irudi digitalen analisia erabiliz determinatutako, matrazeetan prestatutako disoluzioen kontzentrazioak.
- Fotometroa: Patroi independenteak eta espektrofotometroa erabiliz determinatutako, matrazeetan prestatutako disoluzioen kontzentrazioak.

Ondorioak ateratzeko elkarren artean alderatu beharra dago. Hauek dira intereseko informazio gehien eman ditzaketen alderaketak (datuen analisi guztiak % 95eko konfiantza mailarekin egin dira):

- MADDI 1 eta MADDI 2

22. irudian MADDI 1 eta MADDI 2 prozedurekin lortutako emaitzak ageri dira lagin bakoitzarentzat, binaka multzokatuta.



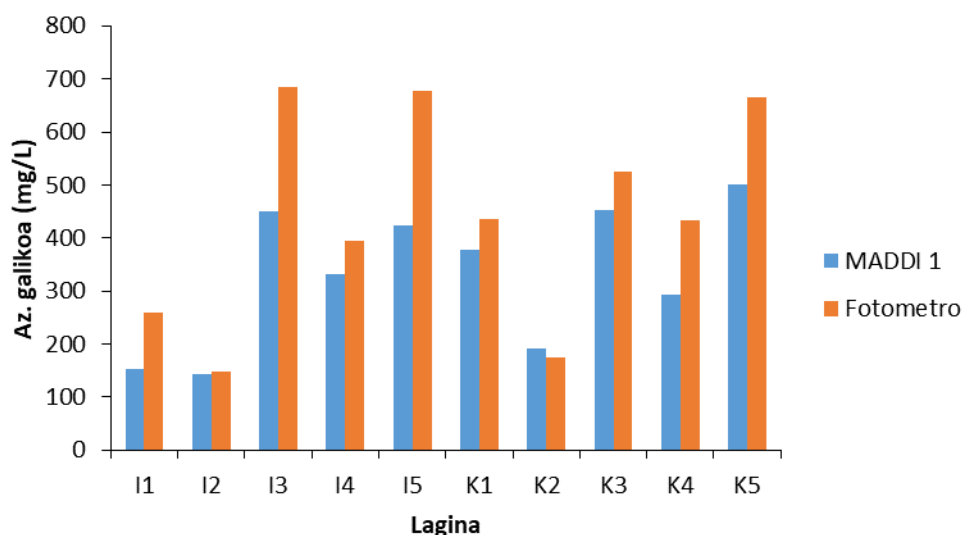
22. irudia: MADDI 1 eta MADDI 2 emaitza multzoen arteko alderaketa grafikoa.

Begi-bistaz ikus daitekeen arren emaitza hauek oso antzekoak direla froga estatistikoen beharra dago hau ziurtasunez ikusteko. Horretarako bikotekako laginentzako t froga erabili da, ondorengo balioak lortuz: $t_{\text{kalkulatua}} = 1,91 < t_{\text{kritikoa}} = 2,26$.

Hemendik ondorioztatu daitekeena da, nahiz eta patroi independenteekin edo patroi gehikuntzarekin egin laginen analisia lortutako emaitzak estatistikoki berdinak direla, beraz, matrize efektua ez dela adierazgarria MADDI metodoarekin lagin hauentzat. Halere, kontuan hartu behar da K3 eta K5 laginek besteek baino ezberdintasun handiagoa dutela, hau ordea, ezin da esan guztiz matrize efektuaren eragina dela, beste errore batzuk egotea ere posible delako.

- MADDI 1 eta fotometroa

Lehen egin bezala, 23. irudian MADDI 1 eta fotometroaren prozedurekin lortutako emaitzak ageri dira lagin bakoitzarentzat, binaka multzokatuta.



23. irudia: MADDI 1 eta fotometroaren emaitza multzoen arteko alderaketa grafikoa.

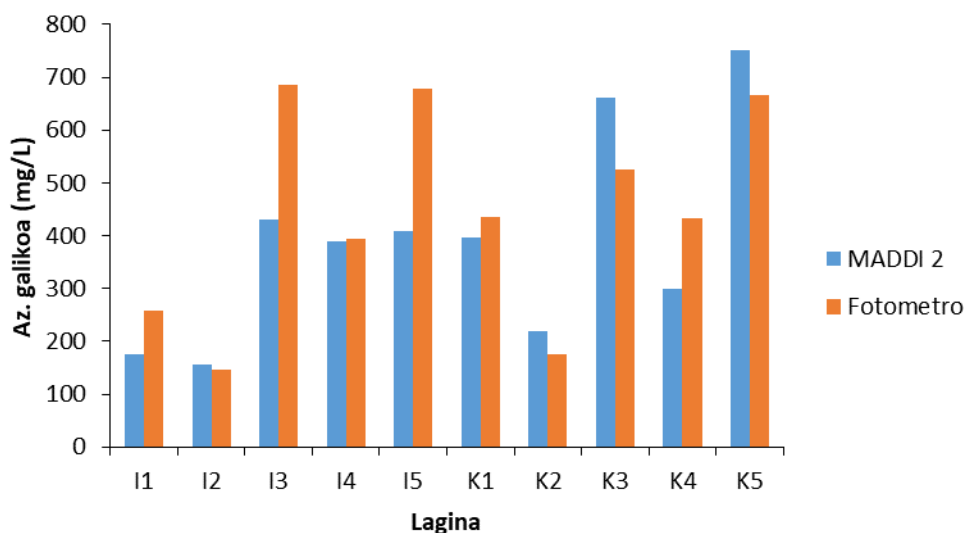
Oraingoan ez dan hain erraza begi-bistaz ikustea emaitza hauek berdinak diren ala ez, berriz ere bikotekako laginentzako t froga aplikatuz ondorengo balioak lortu dira:

$$t_{\text{kalkulatua}} = 3,79 > t_{\text{kritikoa}} = 2,26.$$

t kalkulatu estatistikoa baino izugarri handiagoa ez den arren estatistikoki emaitza ezberdinak dira. Honek ez du esan nahi MADDI metodoa baliagarria ez denik, bi analisi metodo hauetan laginak prestatzeko prozedura ezberdina baita, honek ezberdintasun edo errore handiak ekar ditzake emaitza hauetan ikusi den bezala. Beraz, metodoaren baliagarritasuna benetan ikusteko ondorengo alderaketei begiratu beharko zaie.

- MADDI 2 eta fotometroa

Berriz ere, 24. irudian MADDI 2 eta fotometroaren prozedurekin lortutako emaitzak ageri dira lagin bakoitzarentzat, binaka multzokatuta.



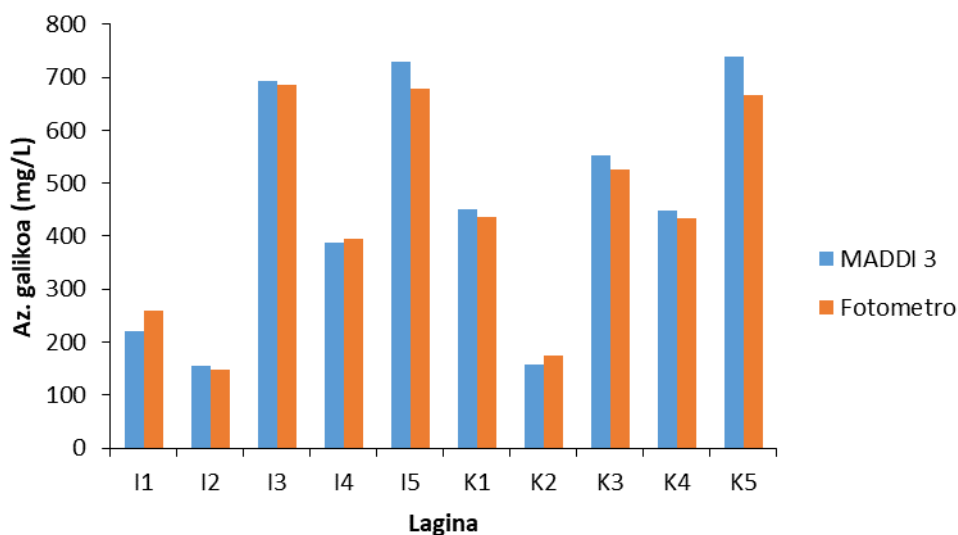
24. irudia: MADDI 2 eta fotometroaren emaitza multzoen arteko alderaketa grafikoa.

Lehen ondorioztatu den bezala, MADDI 1 eta MADDI 2 emaitzak oso antzekoak dira, horregatik lehengo alderaketa eta oraingoa ere antzekoak dira, halere ez dira guztiz berdinak, eta t froga egiterakoan ondorengo emaitzak lortu dira: $t_{\text{kalkulatua}} = 1,20 < t_{\text{kritikoa}} = 2,26$.

MADDI 1 emaitzak ez bezala MADDI 2 eta fotometroaren prozedurekin analizatutako laginen emaitzak estatistikoki berdinak dira. Lehen esan arren MADDI 1 eta MADDI 2 berdinak zirela, badago ezberdintasuna emaitzen artean, eta ikus daitekeenez ezberdintasun horrek MADDI 2 emaitzak fotometroaren emaitzetara hurbiltzen ditu. Hau da, patroi gehikuntzarekin lortutako emaitzak eta espektrofotometroarekin lortutakoak estatistikoki berdinak dira, nahiz eta begibistaz ezberdintasunak ikusgarriak izan. Horregatik, metodoaren baliagarritasuna zehazki zein den ikusteko azken alderaketa bat egin beharko da.

- MADDI 3 eta fotometroa

Azkenik, 25. irudian MADDI 3 eta fotometroaren prozedurekin lortutako emaitzak ageri dira lagin bakoitzarentzat, binaka multzokatuta.



25. irudia: MADDI 3 eta Fotometro emaitza multzoen arteko alderaketa grafikoa.

Aurreko alderaketetan ez bezala, honetan begi-bistaz ikus daiteke MADDI 3 eta fotometroaren emaitzak askoz ere antzekoagoak direla aurreko guztiak baino, halere, hau ziurtatzeko berriz ere t froga egin da, emaitza hauek lortuz: $t_{\text{kalkulatua}} = 1,29 < t_{\text{kritikoa}} = 2,26$.

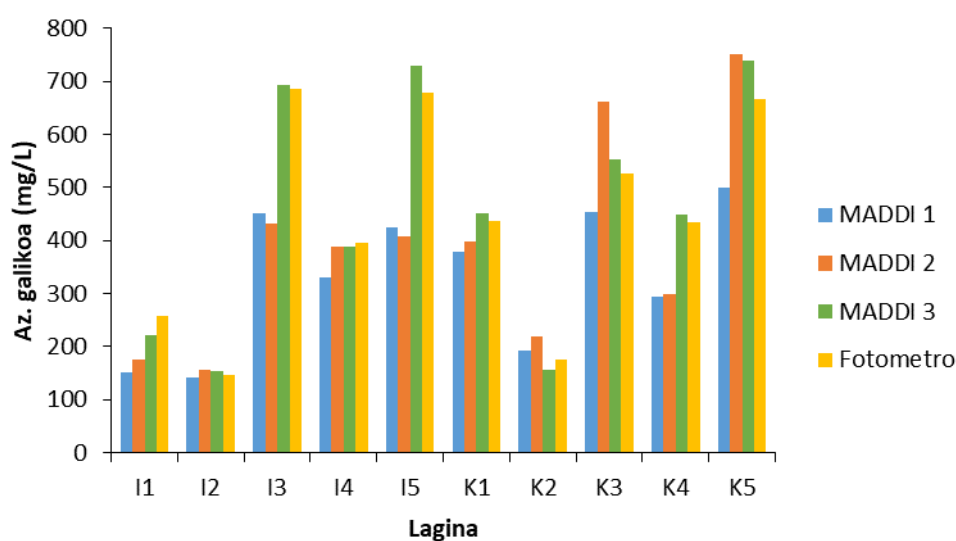
Emaitza multzo hauek estatistikoki berdinak dira, eta aurreko emaitzak baino antzekoagoak, honek badu arrazoi bat: beste prozeduretan laginak berdinak diren arren, erreakzioaren prestaketa ez da berdina, eta honek beste errore batzuk dakartza. Bi prozedura hauetan, ordea, laginak ez ezik, prestatu eta neurtutako disoluzioak berberak izan dira. Honek erakusten duena da, baldintza berdinetan prestatzen diren laginentzat MADDI metodoa metodo espektrofotometrikoa bezain egokia dela analisi hauek egiteko.

Azkenik, emaitza guzti hauen ikuspegi global bat izate aldera 31. taulan bateratu dira emaitza guztiak. Suposatuz metodo espektrofotometrikoarekin lortutako emaitzak direla errealak, beste prozedurekin lortutako emaitzen errore erlatiboak kalkulatu dira hauekin alderatuz, baita hauen batezbestekoak eta desbideratze estandarrak ere.

31. taula: Prozedura guztiekin lortutako emaitzak eta hauen errore erlatiboak metodo espektrofotometrikoarekin lortutako emaitzekiko.

Lagina	Fotometro	MADDI 1		MADDI 2		MADDI 3	
	C ₀ (mg/L)	C ₀ (mg/L)	RE (%)	C ₀ (mg/L)	RE (%)	C ₀ (mg/L)	RE (%)
I1	259	152	70,2	175	48,3	220	17,5
I2	147	143	3,3	157	6,3	155	5,0
I3	686	450	52,3	431	59,2	692	0,9
I4	395	331	19,1	389	1,6	389	1,6
I5	678	424	59,8	408	66,3	729	7,0
K1	436	378	15,4	397	9,7	451	3,4
K2	176	192	8,5	219	19,7	157	11,8
K3	526	453	16,1	662	20,5	554	5,0
K4	434	294	47,6	298	45,5	448	3,2
K5	666	500	33,3	751	11,2	738	9,8
RE (%)			32,5		28,8		6,5

Gainera, emaitza hauek grafiko berean irudikatu dira, 26. irudia lortuz eta datu hauei guztiei batera analisi estatistikoa aplikatu zaie.



26. irudia: Emaitza multzo guztien arteko alderaketa grafikoa.

Metodoen alderagarritasuna ikusteko "faktore baten bariantzaren analisia" egin da, irudi digitalen analisia darabilten metodoentzat bakarrik (MADDI 1, 2 eta 3), emaitza hauek lortuz: $F_{\text{kalkulatua}} = 1,04 < F_{\text{kritikoa}} = 3,35$. Kasu honetan, kalkulaturako F -a kritikoa baino txikiagoaenez, diferentzia adierazgarririk ez dagoela esan daiteke.

Metodo guztiak konparatuz (MADDI 1, 2, 3 eta fotometroa), aldiz, emaitza hauek lortu dira: $F_{\text{kalkulatua}} = 0,83 < F_{\text{kritikoa}} = 2,87$. Bi kasuetan emaitzak alderagarriak dira, beraz, esan daiteke metodo guztiak estatistikoki berdinak direla.

Hemendik ondorioztatu daitekeena da errorea ez duela metodoak berak eragiten baizik eta laginen prestaketa prozesuan dagoen ezberdintasunak.

4.4. Laginen Analisia

Behin ikusita irudi digitalen analisi bidezko metodoa onargarria dela disoluzio baten polifenol eduki totala determinatzeko, sarreran aipatu diren laginei aplikatu zaie.

Huen polifenol totalen kontzentrazioa determinatzeko aurreko atalean metodoaren zehaztasuna kalkulatzeko erabilitako disoluzioak aprobetxatu dira, MADDI 3 prozedura erabiliz egin direnak hain zuzen ere, fotometroaren emaitzetara gehien hurbildu direnak direlako. Oraingoan, ordea, absorbantziak lortzeko errepliken batezbestekoa egin beharrean lagin bakoitzaren erreplika guztien ($n = 4$) absorbantziak lortu dira MADDIrekin eta guztien kontzentrazioak determinatu, 32. taulako batezbestekoak eta konfiantza tarteak kalkulatu ahal izateko.

32. taula: Laginen polifenol total kontzentrazioak azido galiko baliokidetan.

Lagina	Infusio mota	C_0 (mg/L)	C_0 (mg/g)
I1	Mugurdia	220 ± 14	31 ± 2
I2	Frutak	155 ± 18	21 ± 2
I3	Te beltza	693 ± 62	79 ± 7
I4	Te gorria	389 ± 20	48 ± 3
I5	Te berdea	730 ± 77	96 ± 10
K1	Te berdea	452 ± 46	
K2	Te beltza	176 ± 15	
K3	Te berdea	555 ± 42	
K4	Te berdea	449 ± 41	
K5	Te zuria	740 ± 77	

Kontuan hartu behar da te mota guztiak landare berdinetik datozela, baina prozesamendu ezberdina jarraitzen dute, eta honek zerikusia izan dezake hauen polifenol totalen edukian edo ahalmen antioxidatzailean.

Mugurdi eta fruta ezberdinez egindako infusioak ezin dira besteekin alderatu, lagin guztiz ezberdinak direlako. Bai ordea tearekin egindako infusio ezberdinak (balorazio

hau guztiz kualitatiboa denez suposatuko da infusioek duten kontzentrazioa antzeko lagin solido kantitatetik eratorri dela kasu guztietan).

Polifenolen kontzentrazioaren arabera ordenatzen baditugu honela gelditzen dira tetik eratorritako infusioak: K5 > I5 > I3 > K3 > K1 > K4 > I4 > K2. Ikus daitekeenez halako erlazio bat antzeman daiteke:

- K2 **te beltza** da: te hosto hauek bildu ondoren lehortu eta zuritu egiten dira, ondoren "mazerazioa" izeneko prozesu bat jasaten dute, egitura zelularrak hautsiz, entzimak askatuz eta hostoaren **oxidazio totala** emanez.^[21] I3 ere te beltza den arren ez da hainbesteko erlaziorik ikusten.
- I4 **te gorria** da: te hosto hauek ere bildu ondoren lehortu eta zuritu egiten dira, ondoren hartitzen uzten dira, kolore gorrixka hartzen dutelarik.^[21] Te hosto hauen **oxidazio maila handia** da.
- K5 **te zuria** da: te hosto gazteak bildu ondoren oxidazio mugatuko zuritzea jasaten dute, oxidazio hau berehala geldituz hostoak txigortuta.^[22] Te mota honen **oxidazio maila oso baxua** da.
- Gainontzeko **te berdeak**: Te hosto hauei bildu bezain laster oxidazioa ekiditeko prozesuren bat aplikatzen zaie: txigortzea edo lurrun bainua.^[23] Te mota honek izan dezakeen **oxidazio minimoa** du, eta hala ikusten da emaitzetan.

Beraz, esan daiteke tearen prozesamenduak eta bertan jasaten duen oxidazioak eragina duela ondoren hauen infusioek izango duten ahalmen oxidatzailean eta polifenol totalen edukian. Halere, hainbeste te jatorri eta tratamendu ezberdinekin ezin da te mota bakoitzarentzat polifenol kontzentrazio tarte bat finkatu, banaka aztertu behar dira nahiz eta batzuk besteek baino batezbesteko altuagoa izan.^[22]

4.5. Irudi Digitalen Analisiaren Automatizazioa

Irudi digital batetik beharrezkoa den informazio guztia ateratzea eta hau bakarrik ateratzea ez da lan erraza, eskuz egin beharko balitz orduak hartuko lituzke irudi bakar batek.

Orain arte, irudietatik informazioa Matlab softwarearen laguntzaz erauzi da. Programa hau erabiltzeko beharrezkoa da kode bidezko programazioaren oinarri batzuk izatea eta hau ez da lan erraza ezagutzarik gabeko pertsonentzat.

Hau honela beharrezkoa da prozesu honen nolabaiteko automatizazioa, eta posible da kode lerro gutxi batzuekin beti irudi berdinak erabiliz (dimentsio eta posizio berberak) hauen analisia automatizatzea. Baina hau ez da intuitiboa, ez da erabil erraza, eta irudi mota aldatzen den bakoitzean kodea ere aldatu behar da, beraz, erabiltzaileak ezagutza hauek izan behar ditu.

Arazo hauek konpontzeko, lan honetan polifenolen eduki totala determinatzeko ez ezik mikroplakak erabiliz egiten den edozein irudi digitalen analisi mota prozesatzeko balio duen programa bat sortu nahi izan da. Interfazeduna eta erabilerraza, programazio ezagutzarik ez duten erabiltzaileentzat, eta gainera irudi mota ezberdinak arazorik gabe tratatuko dituen. MADDI programa Matlab ingurunean sortu da, baina behin hau instalatzeko fitxategia izanda, ez da beharrezkoa Matlab programa eskura izatea (baizik eta honen liburutegiak bakarrik) eta beraz, ez da lizentziarik behar.

Hala egin da, MADDI deitu zaion programa honek irudia eta erabiltzaileak eman beharreko beste hainbat *input* hartuta putzu bakoitzaren absorbantzia itzultzen du. MADDI programaren oinarriak II Eranskinean daude zabalago azalduta.

5. Ondorioak

Ondorio nagusi bezala esan daiteke lortu dela polifenolen eduki totala determinatzeko metodo berri bat garatzea. Metodo hau merkea, ingurugiroarekiko errespetagarriagoa, erabilerraza eta azkarra da, mikroplakak erabiliz 96 lagin batera analizatu daitezkeelako bakoitzetik lagin eta errektibo bolumen oso txikiak erabilia. Irudi digitalen analisisian oinarritutako metodo honek onargarria izateko beharrezkoak diren baldintzak betetzen ditu: tarte lineal ona dauka, detekzio eta kuantifikazio muga erlatiboki baxuak, prezisio uste baino hobea eta zehaztasun onargarria.

Bestalde, metodo hau infusioen polifenol eduki totala determinatzeko optimizatu da, lagin solidoen erauzketa prozesuarekin eta hauen diluzioekin egin den bezala, azkenik lagin erreal batzuen polifenol edukia arrakastarekin determinatuz.

Gainera, irudi digitalen analisiak duen arazo handienetako bat konpontzea lortu da, inguruko argiak eragindako errorea. Honetarako diseinatu den argiaren zuzenketa matematikoak argazkien arteko errorea maila onargarrietara eramaten baitu.

Azkenik, prozesu hau guztia automatizatzea lortu da, erabilerraza eta eskuragarria den programa bat sortuz, interfazeduna eta programazio ezagutzarik gabeko jendeak erabil dezakeena, metodo hau merkeago eta errazago bihurtuz. Ez polifenolen determinaziorako bakarrik baizik eta edozein oinarri kolorimetriko (espektro ikuskorrean) baliatzen duen determinazio metodoentzako balio duena.

5. Conclusions

As a main conclusion it could be said that the development of a new method for the determination of the total polyphenol content has been achieved. This is a cheap, eco-friendly, easy and fast method, because using microplates allows 96 dissolutions to be analysed at the same time using tiny volumes of sample and reactants. This method, based on the analysis of digital images, accomplishes the following characteristics: it has a good linear range, relatively low detection and quantification limits, a better precision than expected and an acceptable accuracy.

Also, this method has been optimized for the determination of total phenolic content of infusions, as it has been done with the extraction of those polyphenols from solid samples and their ideal dilution factors. And this has been used for the determination of the total phenolic content of some real samples successfully.

In addition, one of the biggest problems of the digital image analysis has been solved, the error caused by the changing environmental light. In order to do this a mathematical light correction has been designed that succeeds in minimizing the error between pictures to acceptable levels.

Finally, this whole process of digital image analysis has been automatized creating an available and easy to use program with an interface that will allow users with no programming knowledge to use it, making this method cheaper and easier. A program can be used not only for the determination polyphenol content, but for any method based on a colorimetric determination.

6. Bibliografia

1. S. P. Quideau, D. Deffieux, C. L. Douat-Casassus & L. Pouységu. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. Angewandte Chemie International Edition. 2011, 50 (3): 586-621.
2. E. Haslam & Y. Cai. *Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism*. Natural Product Reports. 1994, 11 (1): 41-66.
3. A. Scalbert & G. Williamson. *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition. 2000, 130: 2073S-85S.
4. A. Scalbert, I. T. Johnson & M. Saltmarsh. *Polyphenols: antioxidants and beyond*. American Journal of Clinical Nutrition. 2005, 8: 215S-7S.
5. Gow-C. Y., Pin-D. D. & Hui-L. T. *Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid*. Food Chemistry. 2002, 79: 307-313.
6. A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy & L. Jiménez. *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Critical Reviews on Food Science and Nutrition (in press).
7. PubChem: Gallic acid. Begiratua: 2020/06/22.
pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid
8. Pliny the Elder with J. Bostock & H. T. Riley, trans., *The Natural History of Pliny*. 1857, 6: 196.
9. L. D. Reynolds & N. G. Wilson. *Scribes and Scholars*. 3rd Ed. Oxford: 1991: 193-4.
10. J. W. Sturmer. *Pharmaceutical Toxicology*. The Pharmaceutical Era. 1899, 21: 472-4.
11. PubChem: Tannic acid. Begiratua: 2020/06/22.
pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tannic-acid

12. O. Folin & V. Ciocalteu. *On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins*. *Journal of Biological Chemistry*. 1927, 73: 627-650.
13. H. M. Solo-Gabriele. *A Chemical Stain for Identifying Arsenic-Treated Wood*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2007, 27 (3-4).
14. Dejian H., B. Ou & R. L. Prior. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53: 1841-1856.
15. D. C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis*. 9th ed. W. H. Freeman and Company.
16. S. Roy & S. K. Bandyopadhyay. *Face detection using a hybrid approach that combines HSV and RGB*. *International Journal of Computer Science and Mobile Computing*. 2013, 2 (3): 127-136.
17. M. Abderrahim, S. M. Arribas & L. Condezo-Hoyos. *A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods*. *Talanta*. 2016, 152: 82-89.
18. J. M. Green. *A Practical Guide to Analytical Method Validation*. *Analytical Chemistry*. 1996, 68: 305A.
19. V. L. Singleton, R. Orthofer & R. M. Lamuela-Raventós. *Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent*. *Methods in Enzymology*. 1999, 299: 152-178.
20. AOAC. *Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. 2016.
21. E. A. H. Roberts. *The Chemistry of Tea Manufacture*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1958, 9 (7): 381-390.
22. Cai-N. Z., Guo-Y. T., Shi-Y. C., Xiao-Y. X., Ren-Y. G., Qing L., Qian-Q. M., Ao S. & Hua-B. L. *Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas*. *Antioxidants*. 2019, 8: 215.
23. H. N. Graham. *Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry*. *Preventive Medicine*. 1992, 21 (3): 334-350.

I Eranskina: Argiaren zuzenketa

MADDI bidez lortutako absorbantzia balioei argiaren eragina kontuan hartuko duen zuzenketa bat aplikatzeko lehenik beharrezkoa da jakitea argiak nolako eragina duen balio hauetan.

Hau ezagutzeko argia kuantifikatuko duen adierazle bat behar da. MADDI metodoaren abantaila nagusienetarikoak soiltasuna eta erabilerraztasuna direnez luxometro bat edo antzeko instrumentazio gehigarria baliatzea ez da erabilgarria, duen kostu ekonomikoaz gain. Arrazoi honegatik argazkian bertan dagoen eta beti konstanteak diren puntuak erabili dira argiaren indikatzailetzat: kolore barrako koloreen RGB balioak.

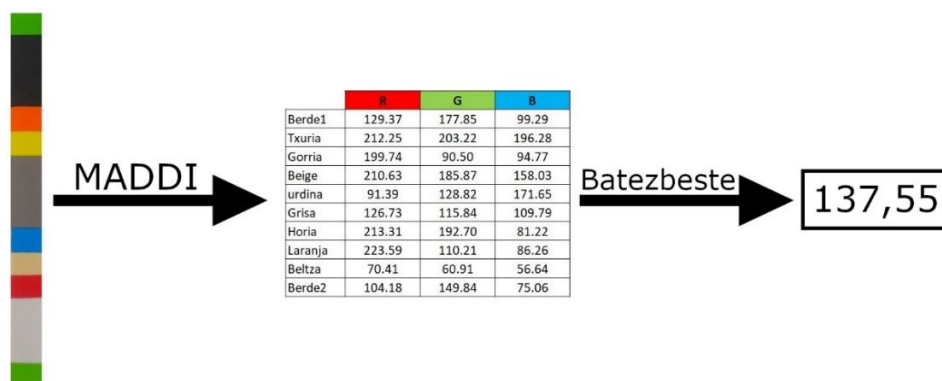
Kolore barra beti berdina da argazki guztietan, koloreak ez dira aldatzen, bai ordea hauen RGB balioak argazkiak dituen argi baldintzen arabera, beraz, hau aprobe txatu da argiaren indikatzaile moduan.

Kontuan hartu beharra dago mugikorretan dauden kamera digitalek bere zuzenketa algoritmo propioak dituztela aktibatuz gero. Hau ez litzateke komenigarria guk nahi dugun helbururako, hau da, argiaren eragin zuzena ikustea argazki batean, hori eraldatuko duen algoritmorik gabe. Beraz, kameraren ezarpenak eskuz finkatu dira I.1 taulan agertzen diren balioetara, aldatzen diren baldintza bakarrak inguruko argiarenak izan daitezzen.

I.1 taula: Erabilitako kameraren parametroak.

Parametroa	Balioa
ISO	200
Obturazio denbora	1/45 s
Zuri balantzea	Fluoreszente argia

Argazki bakoitzaren kolore barrako kolore bakoitzaren RGB balioak lortu dira (100 pixel-en batezbestekoa) eta 30 (10 kolore x 3 kanal) balio hauen batezbestekoa erabili da, I.1 irudian ikusten den bezala, argazki bakoitzak dituen argi baldintzak modu simple batean eta zenbaki-balio bakar batean kuantifikatzeko.

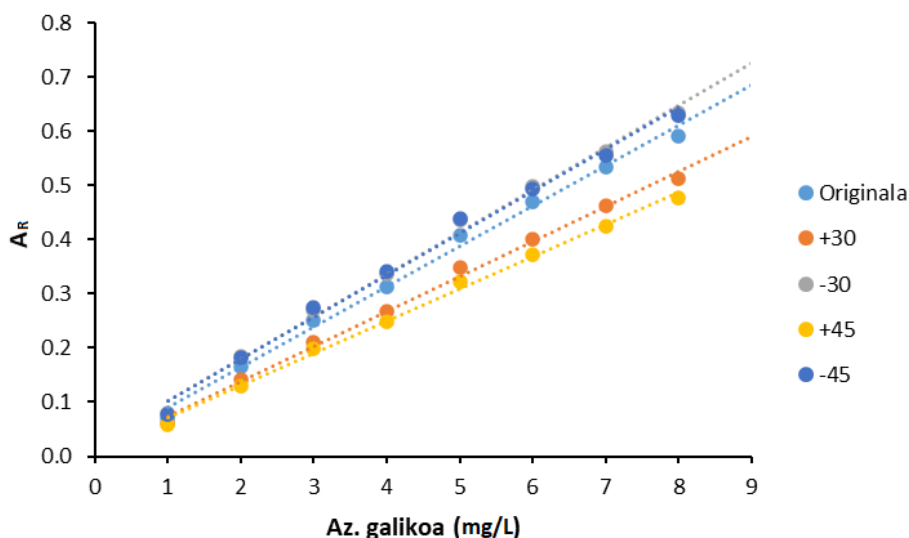


I.1 irudia: Z balioa lortzeko prozesua.

Hemendik aurrera batezbesteko honi Z (zuzenketa) balioa deituko zaio eta argazki bakoitzaren ezaugarria izango da. Z balioa eta argitasuna proportzionalak dira, zenbat eta argi gehiago orduan eta RGB balio altuagoak, beraz, Z balio altuagoa.

Behin balio hau definituta dagoela, ikusi beharra dago ze erlazio dagoen balio honen eta neurtutako disoluzioen absorbantzien artean. Horretarako, beharrezkoa da argi baldintza ezberdinetan neurtutako disoluzio berberen datuak izatea, eta errore esperimentalak baztertze aldera, froga gisa 0,00; 1,01; 2,02; 3,03; 4,04; 5,05; 6,06; 7,07 eta 8,08 mg/L azido galiko baliokideko patroizko disoluzioak dituen plaka baten argazkia hartu eta artifizialki, Windows-en Argazkiak aplikazioa erabiliz, argia aldatu zaio (ehunekotan), bost argazki lortuz: Originala, Originala+%30, Originala-%30, Originala+%45 eta Originala-%45.

Behin argazki hauek lortuta MADDIrekin prozesatu dira eta argazki bakoitzetik lortutako zuzenak irudikatu dira I.2 irudian, I.2 taulan daude zuzen hauen ekuazioak.



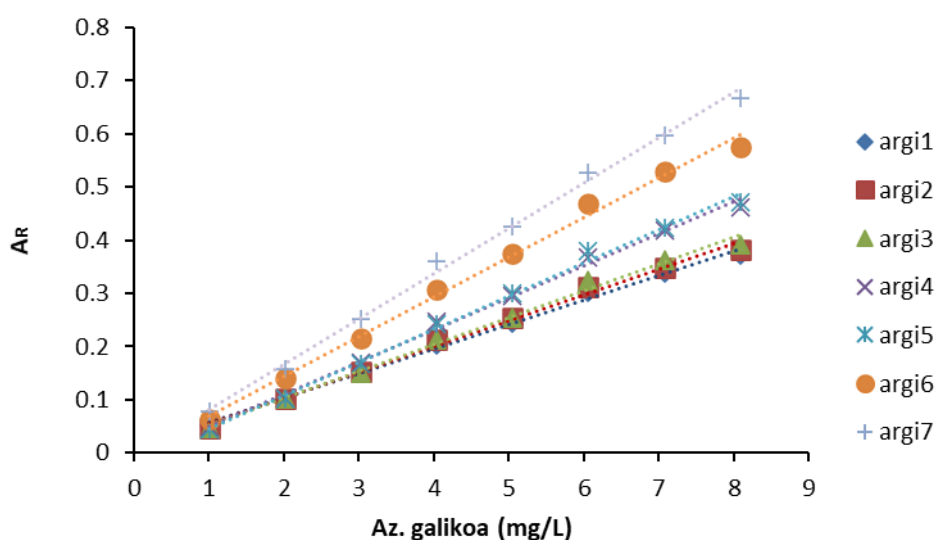
I.2 irudia: Argi ezberdin simulatuekin lortutako zuzenen irudikapena.

I.2 taula: Argi ezberdin simulatuekin lortutako zuzenen ekuazioak.

	m	b
+45	0,0595	0,0108
+30	0,0645	0,0103
normal	0,0742	0,0262
-30	0,0780	0,0239
-45	0,0772	0,0262
RSD (%)	11,66	42,13

I.2 taulan ikus daitekeenez malden arteko RSDa %12 inguruan dago, nahiz eta honen analisi estatistikorik ez egin begi bistakoa da ez dela onargarria.

Bestalde, ikusi beharra dago artifizialki sortutako argazki horietarako sortzen den modeloak benetan argi baldintza ezberdinetan atera diren argazkientzat balio duen. Horretarako mikropilak batean 0,00; 1,01; 2,02; 3,03; 4,04; 5,05; 6,06; 7,07 eta 8,08 mg/L azido galiko baliokideko patroi disoluzioak prestatu dira, zuzen bat eman beharko luketenak, horrela errazago ikus dadin argiak balio isolatuetan ez ezik zuzen batean duen eragina. Ondoren, mikropilak honi argi baldintza ezberdinetan argazkiak atera zaizkio, baldintza hauek nahita argitasun eta iluntasun mugetara eraman dira, eta baita tarteko baldintza batzuetan hartu ere, leku berean baina intentsitate ezberdineko argi iturriak erabiliz (lanpara fluoreszente kopuru ezberdinekin, led lanparak gehituz...). Eta argazki hauek prozesatu ondoren I.3 irudiko zuzenak lortu dira, I.3 taulako ekuazioetara doitzen direnak.



I.3 irudia: Leku ezberdinetako argazkiekin lortutako zuzenen irudikapena.

I.3 taula: Leku ezberdinetako argazkiekin lortutako zuzenen ekuazioak.

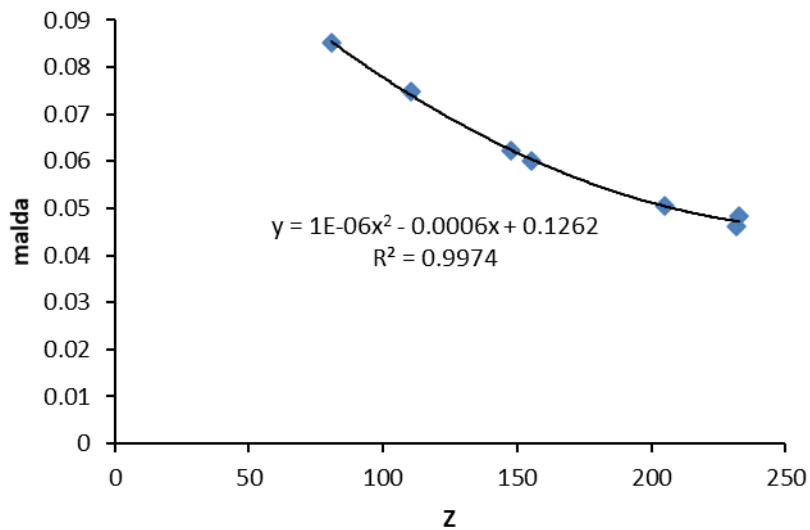
	m	b
argi1	0,0461	0,0115
argi2	0,0483	0,0067
argi3	0,0505	0,0012
argi4	0,0602	-0,0101
argi5	0,0622	-0,0169
argi6	0,0748	-0,0060
argi7	0,0851	-0,0036
RSD (%)	23,81	-397,68

I.3 taulan ikus daitekeenez malden arteko RSDa %24 inguruan dago, aurrekoa baino argi baldintza ezberdinagoak erabili direnez esperotakoa da handiagoa izatea, eta honek errore honen eragina esanguratsua dela gehiago nabarmentzen du.

Bi froga hauetatik lortu diren argazki hauetako zuen bakoitzetik, hau da, I.2 eta I.3 irudietan agertzen diren zuzenetatik atera daitezkeen ondorioak ondorengoak dira:

- Espero bezala argi baldintza ezberdinetan ateratako argazkiak ez dira alderagarriak, baten balioak beste batean erabiltzeak onargarria ez den errore bat ekarriko luke.
- Artifizialki aldatutako argiaren eragina eta naturalki aldatutakoarena berdina dira, halere datu errealak fidagarriagoak jo daitezkeenez bigarrenarekin jarraituko da lanean.
- Argiak disoluzioen balioetan duen eragina ez da berdina guztientzat, zenbat eta kontzentrazio altuagoa (kolore ilunagoa) argiaren eragina handiagoa da. Hau da, ez du zuzenen jatorri ordenatua aldatzen baizik eta malda. Beraz, egin beharko den zuzenketa ez da balioei argiaren indikatzaile bat gehitu edo kentzea, baizik eta bidertu edo zatitzea.

Ondorio hauek kualitatiboak dira ordea, zuzenketa egin nahi bada beharrezkoa da jakitea zein den Z balioa eta zuzenaren maldaren arteko erlazioa, beraz, hau ezagutzeko asmoz elkarren aurrean irudikatu dira.



I.4 irudia: Argi ezberdinekin lortutako maldak Z balioaren aurrean.

I.4 irudian ikus daitekeenez erlazioa ez da zuzenki proportzionala, baizik eta bigarren mailakoa. Honek adierazten duena da lortutako balioei zuzenketa bat aplikatzerakoan ez zaiola balio horri argiaren indikatzailea (Z balioa) zuzenean bidertu edo zatitu behar, baizik eta bigarren mailako erlazio hori kontuan hartuko duen eragiketa bat aplikatu behar dela.

Proba guzti hauetatik atera diren ondorioak kontuan hartuz I.1 ekuazioan agertzen den zuzenketa proposatu da.

$$A_{zuz} = A \cdot \sqrt{Z}$$

I.1 ekuazioa

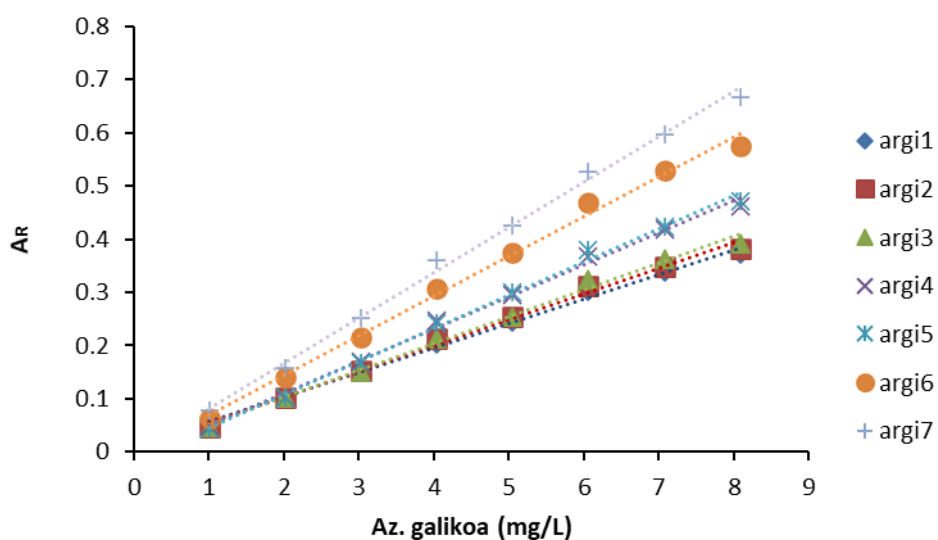
A: Absorbantzia; A_{zuz} : Absorbantzia zuzendua; Z: Argiaren indikatzailea

Halere, beste zuzenketa batzuk ere probatu dira, I.4 taulan adierazten direnak. Neurtutako disoluzio guztietatik lortutako datu guztiei zuzenketa bakoitza aplikatu ondoren lortu diren zuzenen maldak hartu dira zuzenketak alderatzeko. Argi-baldintza ezberdinetan lortutako argazkien maldak berdintzen baditu, modu berdinean berdinuko ditu disoluzio independenteen absorbantzia balioak, faktore biderkatzailea baita.

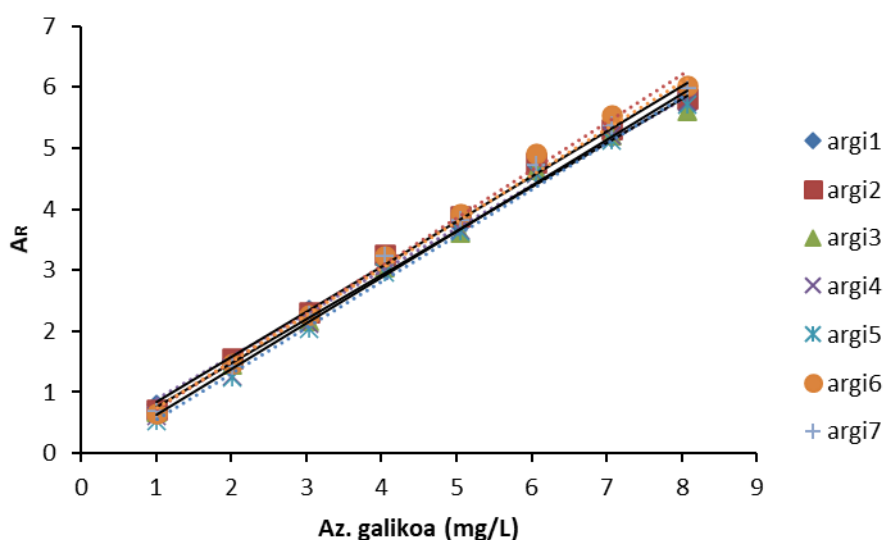
I.4 taula: Argazki ezberdinen zuzenen maldak zuzenketa ezberdinekin.

	m	m·Z	m·log(Z)	m/Z	m·√Z
argi1	0,0461	10,6839	0,1090	0,00020	0,7023
argi2	0,0483	11,2419	0,1143	0,00021	0,7376
argi3	0,0505	10,3559	0,1168	0,00025	0,7226
argi4	0,0602	9,3397	0,1319	0,00039	0,7504
argi5	0,0622	9,1712	0,1349	0,00042	0,7555
argi6	0,0748	8,2418	0,1528	0,00068	0,7849
argi7	0,0851	6,8719	0,1623	0,00105	0,7643
RSD (%)	23,81	16,07	15,28	68,39	3,67

I.4 taulan ikus daitekeen bezala, zuzenketa egokiena lehen proposatutakoa litzateke, malden RSDa % 23,81etik % 3,67ra murrizten duelako. Hau honela, lehen ateratako argazkietako zuzenei proposatutako zuzenketa aplikatu zaie. I.3 irudian ikus daitezke lehen lortutako zuzenak eta I.5ean, berriz, zuzendutakoak. Nabarmena da zuzenketarik gabeko kalibratuak ez direla alderagarriak, zuzendutakoak, berriz, ia ekuazio berdinak dituzte. I.5 taulan ikus daitezkeenak hain zuzen ere, malden arteko RSDa % 4 inguruan dago, lehengo % 24a baino askoz ere balio onargarriagoa.



I.3 irudia: Zuzenketa aplikatu aurretik lortutako zuzenen irudikapena.



I.5 irudia: Zuzenketa aplikatu ondoren lortutako zuzenen irudikapena.

I.5 taula: Zuzenketa aplikatu ondoren lortutako zuzenen ekuazioak.

	Zuzenduta	
	m	b
argi1	0,7023	0,1747
argi2	0,7376	0,1028
argi3	0,7226	0,0172
argi4	0,7504	-0,1257
argi5	0,7555	-0,2054
argi6	0,7849	-0,0633
argi7	0,7643	-0,0324
RSD (%)	3,67	-690,69

Azkenik, zuzenak ez ezik lagin independenteek izan dezaketen errorea ere zuzentzen duela ikusteko, aurreko probako hainbat disoluzioren datuak hartu dira eta independenteki irudikatu, zuzen batera doitu gabe, I.6 taulan ikus daitezkeen lortutako emaitzek adierazten dutenez, determinazioaren errorea onartezina izatetik onargarria izatera iritsi daiteke zuzenketarekin.

I.6 taula: Zuzenketaren froga lagin ezberdinekin.

	Az. galiko (mg/L)	RE (%)	
		Zuzendu gabe	Zuzenduta
Lagin 1	2,02	11,52	5,74
	4,04	19,75	10,85
	8,08	16,27	5,23
Lagin 2	2,02	15,60	5,27
	4,04	16,33	2,77
	8,08	20,39	5,77
Lagin 3	2,02	40,51	6,41
	4,04	41,59	3,35
	8,08	42,74	2,22
Batezbeste:		24,97	5,29

Beraz, esan daiteke eranskin honetan proposatzen den argiaren zuzenketak nahiko ondo konpontzen duela argiaren bariazioaren arazoa. Noski, oraindik ere errorea izango du errore esperimentalak ezin baita guztiz baztertu, eta argi-baldintza ezberdinetan lortutako argazkiak alderatzerakoan hori kontutan izan beharra dago. Hau da, metodo honek ez du inoiz espektrofotometro batean lortutako datuek edo kutxa itxi batean eta argi-iturri kontrolatuean ateratako argazkiek bezain errore txikia izango. Halere, irudi digitalen analisiak dituen abantailak mantentzea baimentzen du: soila, erabilerraza eta merkea.

II Eranskina: MADDI programa

Eranskin honetan irudi digitalen analisia automatizatzeko sortu den programaren funtzionamendua eta garapena azalduko dira. Programa hau erabili nahi izanez gero jarri kontaktuan sortzailearekin e-mail honen bidez: jezenarro001@ikasle.ehu.eus

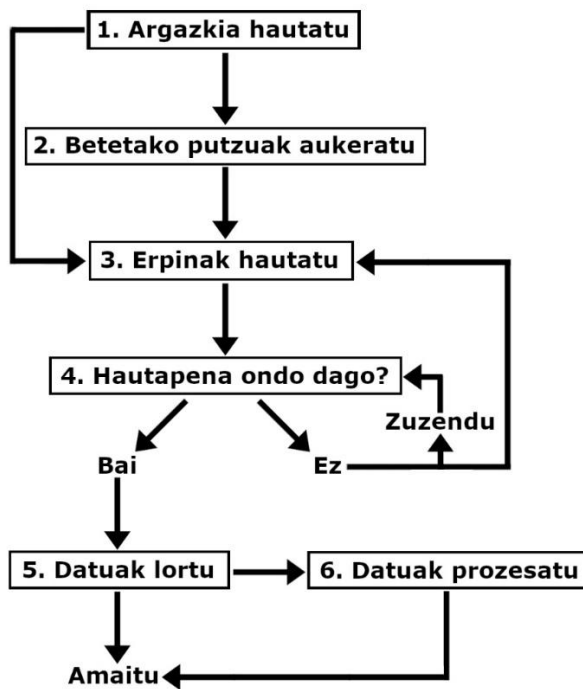


Datu kopurua handitu ahala hauek eskuz prozesatzeko denbora izugarri hazten da, beraz, beharrezkoa da irudi hauek prozesatzeko metodo automatizatu bat, eta horretarako sortu da MADDI (*Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images*) programa, irudi digitalen analisia automatizatzeko.

Hau garatzeko Matlab 2020a programa erabili da eta ondoren azalduko dena MADDI programaren 1.8 bertsioa da, hemendik aurrea MADDI soilik bezala adieraziko dena. Programaren zati teknikoena ez denez interesekoa honen funtzionamendua bakarrik azalduko da kodea erakutsi gabe:

Programak interfaze erabilerraza du, jarraibide eta argibideekin, aditua ez den pertsona batek erabil dezan, berriz ere irudi digitalen analisiaren abantailak mantentze aldera.

Ondorengo azalpenetan interfazearen funtzionamendua eta erabilpen gida azaltzeaz gain hau posible egiten duen automatizazio kodearen funtzionamendua ere azalduko da *letra etzanez*.

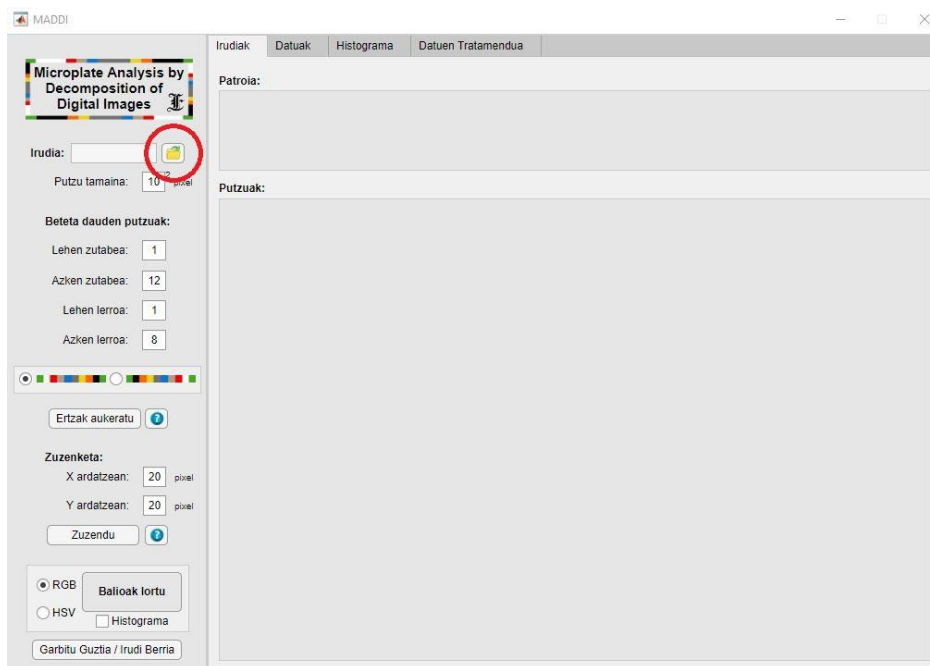


II.1 irudia: MADDI programaren funtzionamenduaren fluxu-diagrama.

II.1 irudian adierazten den bezala ondorengoak dira edozein argazkirekin jarraitu beharreko pausu orokorrak:

1) Argazkia hautatu

II.2 irudian erakusten den botoia erabiliz euskarriko artxiboetan zehar nabigatu daiteke prozesatu nahi den irudia aurkitu eta hautatzeko.



II.2 irudia: MADDI programa hutsa. Gorriz: irudia hautatzeko botoia.

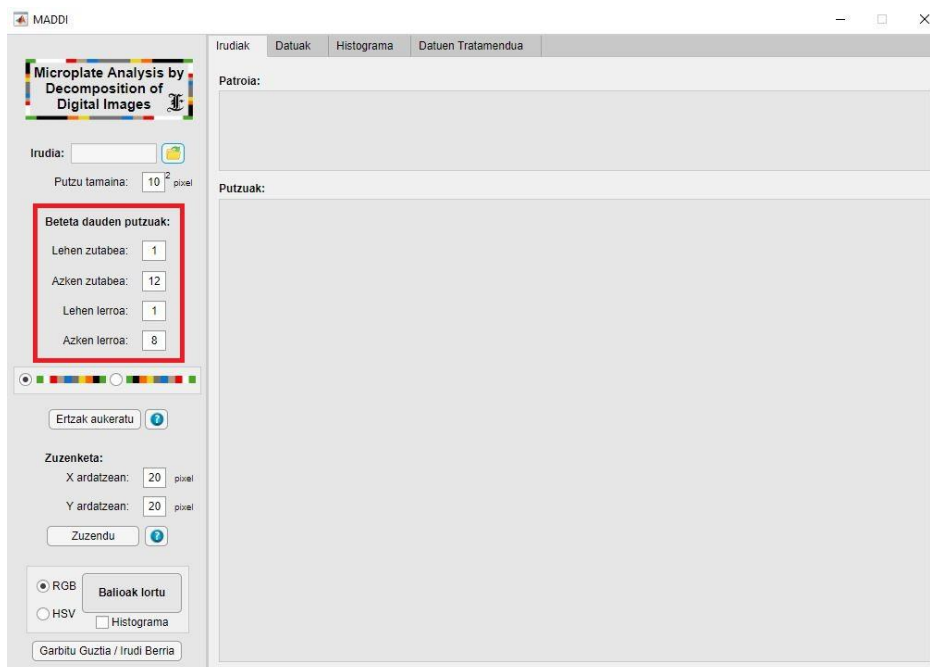
Beharrezkoa da irudia norabide eta norantza zuzenean egotea, hau da, mikroplakak eta kolore barrak ahalik eta horizontalen egon behar dute 3. pausurako, horretarako beharrezkoa da argazkia ateratzerakoan hauen ertzak eta argazkiaren ertza ahalik eta paraleloen egotea, edo bestela, beharrezkoa bada, ondoren irudia editatu eta biratzea MADDIrekin prozesatu aurretik.

Ondorengo pausuan azalduko den bezala MADDIK ez du irudia biratzeko gaitasuna, irudia plano kartesiar bat bezala tratatzen du, X eta Y ardatzak erabiliz.

2) Beteta dauden putzuak aukeratu

Programa irekitzen denean defektuz agertzen diren balioek mikroplakaren 96 putzuak dituzte hautatuta, ez bada kasua aldatu daitezke.

II.3 irudian agertzen diren parametroak aldatuz, 4. pausurako lortuko diren emaitzak aldatuko dira. Ohikoa da ez erabiltzea mikroplakako putzu guztiak, eta hutsak ere hartu daitezkeen arren 6. pausurako lagungarria da pausu hau ondo egitea eta beteta dauden putzuak bakarrik hartzea edo behintzat, ahalik eta gehien mugatzea.



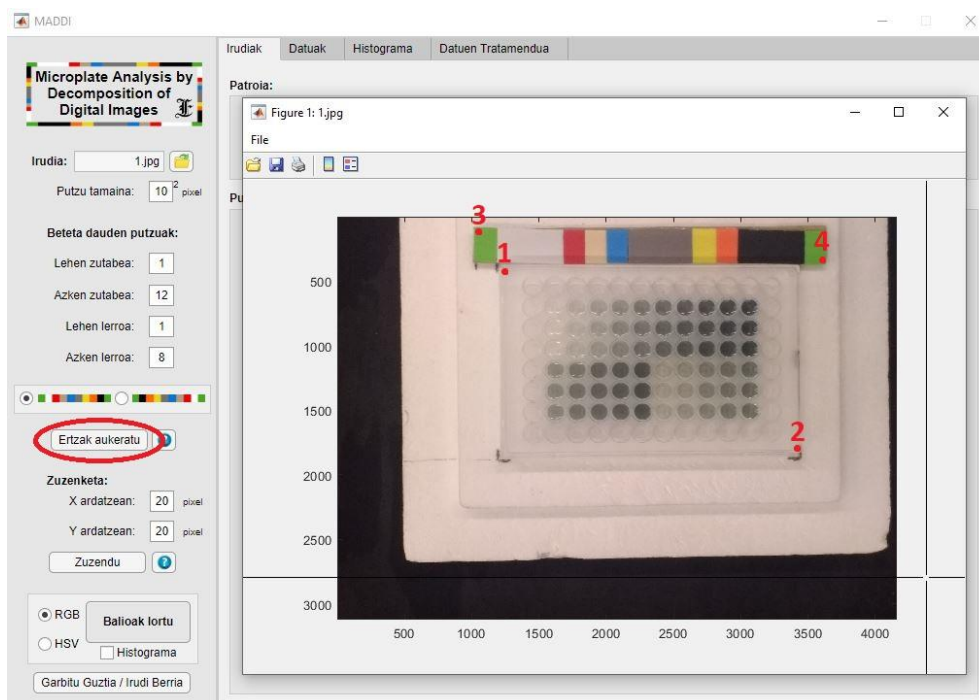
II.3 irudia: MADDI programa hutsa. Gorri: Betetako putzuak hautatzeko atala.

Programak berak adierazten duen bezala: betetako putzuren bat duen lehen zutabea eta azkenekoa, betetako putzuren bat duen lehen lerroa eta azkenekoa adierazi behar dira. Zutabeen zenbakiak mikroplakan bertan idatzita daude, zutabeak, ordea, letra bidez adierazita dauden arren zenbakiz adierazi behar dira (A=1, B=2, ...).

Programak algoritmo errekursibo bat darabil emandako input horietatik (betetako lehen eta azken zutabe eta lerroak) lehenik beteta dauden putzuak hautatzeko (hurbilketa bat) eta ondoren putzu bakoitzetik erabilgarria den informazioa lortzeko, beraz, prozesamendu denbora hobea izan dadin lagungarria da erabiliko ez den informazioa lortzen denbora ez galtzea, ahalik eta putzu gutxien hautatuz (betiere betetakoak barne).

3) Argazkia ireki eta elementuak lokalizatu

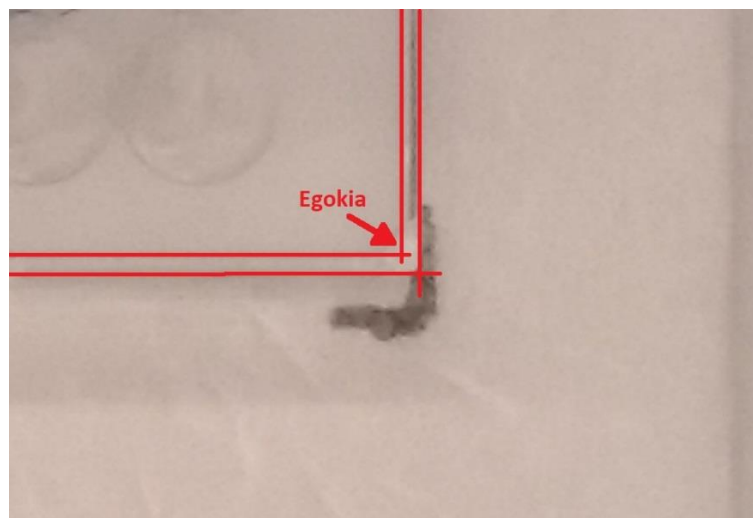
II.4 irudian agertzen den "Ertzak hautatu" botoia sakatzerakoan hautatuta dagoen irudia irekiko da leiho berri batean, leiho hau maximizatu egin daiteke irudia hobeto ikusteko eta ertzen hautapena zehatzagoa izateko. Ondoren, hauek dira saguarekin klikatuz hautatu beharreko puntuak, II.4 irudian adierazi direnak, hurrenez hurren:



II.4 irudia: MADDI programa irudia irekita.
Gorri: erpinak hautatzeko botoia eta hautatu beharreko erpinak zenbakituta.

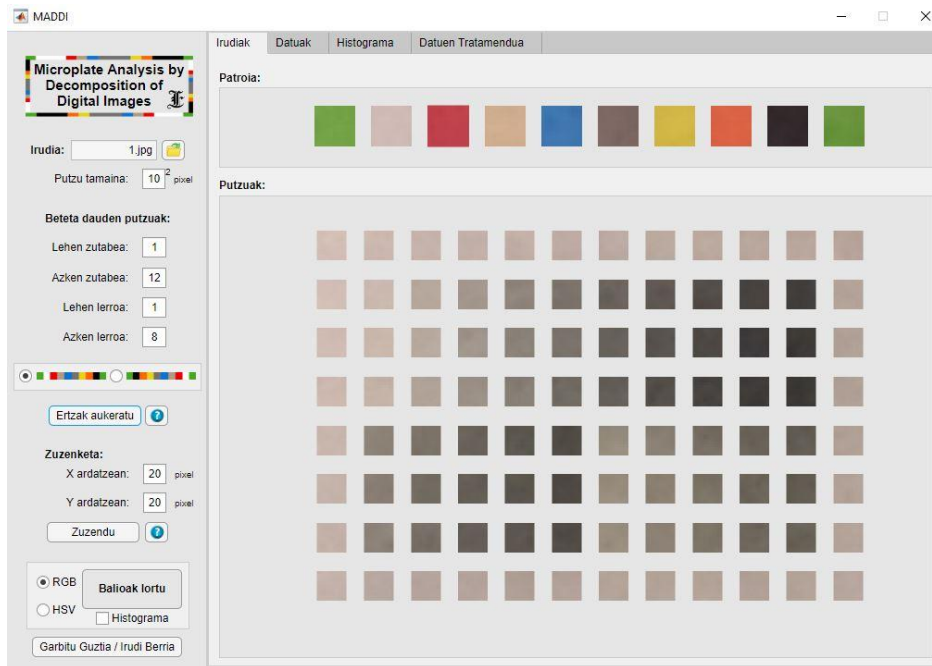
1. Mikroplakaren goiko ezkerreko erpina.
2. Mikroplakaren beheko eskuineko erpina.
3. Kolore-barraren goiko ezkerreko erpina.
4. Kolore-barraren beheko eskuineko erpina.

Mikroplakak bi erpin ditu ordea, II.5 irudian ikus daitezkeen bezala kameratik hurbilago bat eta urrunago bestea. MADDI programatua izan den moduagatik, hautapena optimoa izan dadin kameratik (eta putzuetatik) hurbilen dauden erpinak hautatu behar dira.



II.5 irudia: Mikroplaka baten bi erpinak.

Behin erpin hauek hautatu direnean programak interesekoak izan daitezkeen elementu guztien posizioak estrolatu ditzake. Honetarako, aurrez neurtu diren proportzioak memorian sartu zaizkio programari: putzu-putzu tartea/mikroplakaren dimentsioak, putzu-ertz tartea/mikroplakaren dimentsioak, kolore-kolore distantziak/kolore-barraren zabalera... Programak proportzio hauek baliatuz eta hautatutako erpinak erreferentzia puntutzat erabiliz, 96 putzuen eta 10 koloreen posizioak eta dimentsioak lortzen ditu, hauen irudiak (lehen adierazitako dimentsioetakoak) moztu eta erakutsi II.6 irudian ikusten den moduan.



Il.6 irudia: MADDI egindako hautapenak erakusten.

Aurreko pausuan adierazi bezala iruditik informazioa lortzeko prozesua algoritmo errekurtsibo batek bideratzen du, hainbat begizta erabiliz. Horretarako, lehen pausua irudi guztitik interesekoak diren pixelak bakarrik lortzea da:

Jada erabilgarriak diren putzuak bakarrik hautatu direnez hauek lokalizatu behar dira, hau da, bakoitzetik hartuko diren pixelen koordenatuak (Y, X) lortu behar dira. Horretarako egin da 3. pausua. Argazki bakoitza ezberdina den arren, erreferentzia batzuk konstanteak direnez (plakaren dimentsioak edo kolore-barrarenak) hauekiko erlatibizatu behar da irudia. Hau da, posible da plakak irudi batean 1000 pixeleko zabalera izatea eta beste batean 1500ekoa, baina plaka beti izango da 12 cm-koa. Horregatik, jakinez gero 12 cm zenbat pixel diren irudi bakoitzean, gainerako informazio guztia lortu daiteke, horretarako aurretik dimentsio errealak neurtu baitira:

- Plakaren zabalera
- Plakaren altuera
- Putzuen arteko tartea
- Putzu eta ertzen arteko tartea
- Kolore barraren luzera
- Kolore arteko tartea

Prozesu hau optimizatu egin da erabiltzaileak programari eman beharreko informazioa minimoa izan dadin, lehen azaldu diren 6 puntu horien hautaketa hain zuzen ere. Puntu horien koordenatuetatik gainerako informazio guztia estrapolatu daiteke, algoritmoak egiten duen bezalaxe: plakaren eta kolore barraren posizioa, putzu bakoitzaren posizioa eta kolore bakoitzaren posizioa irudian, pixelen (Y, X) koordenatu formatua erabiliz.

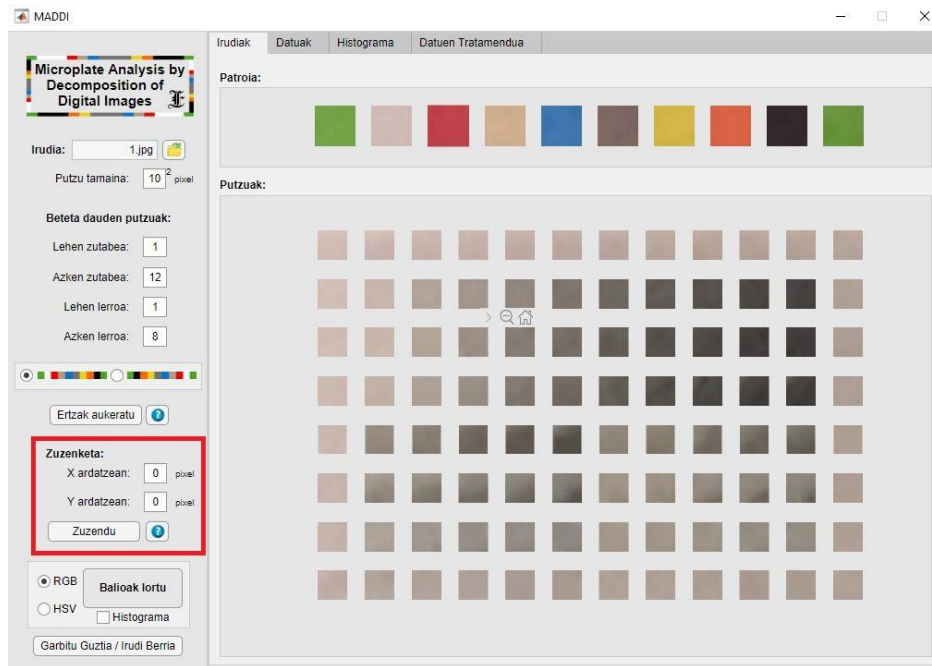
Input puntuen hautapena egokia izan den ala ez jakiteko, erabiltzaileak begi-bistaz balorazioa egite da modu erraz eta egokiena, 4. pausuan azalduko den bezala. Horretarako beharrezkoa da algoritmoak output bisual bat sortzea interfazean, hau da, hautatu diren putzuetatik hautatu diren dimentsioko zatiak (normalean 10x10 pixel) moztu eta irudi berri bat sortzea, pixel guztiak ezabatuz. Hau egiteko berriz ere begizta moduko kodea erabiltzen da, putzu bakoitzetik irudia moztu eta independenteki interfazean txertatzen duena.

4) Hautapena egiaztatu

Beharrezkoa da erabiltzaileak MADDik emandako pausuak gainbegiratzea, *input* kopuru txikia eta hauen izaera ez hain zehatza dela eta erroreak ohikoak izan baitaitezke.

II.6 irudian agertzen diren hautapen iruditxoetan beharrezkoa da kolore uniforme bat ikustea, kontuan hartu beharreko interferentzien artean daude distirak agertzea edo hautapena putzutik ateratzea, hauen eraginez ondorengo pausuan lortuko diren RGB balioen batezbestekoak aldatu baitaitezke eta metodoaren errorea asko handitu.

Hau aurreikusita dagoenez programak badu hau modu errazean zuzentzeko aukera, II.7 irudian agertzen den "Zuzenketa" atala erabiliz. Balio hauek aldatuz eta "Zuzendu" botoia sakatuz egindako hautapenak X eta Y ardatzetan zehar mugitu daitezke, proportzioak aldatu gabe, hau da, ezker-eskuin edo/eta gora-behera. Hautapen akatsa handia izan bada, ordea, posible da proportzioak gaizki lortu izana eta "Zuzenketa" atala erabiliz ezin zuzendu izatea, kasu horretan 3. pausua errepikatu beharko litzateke.

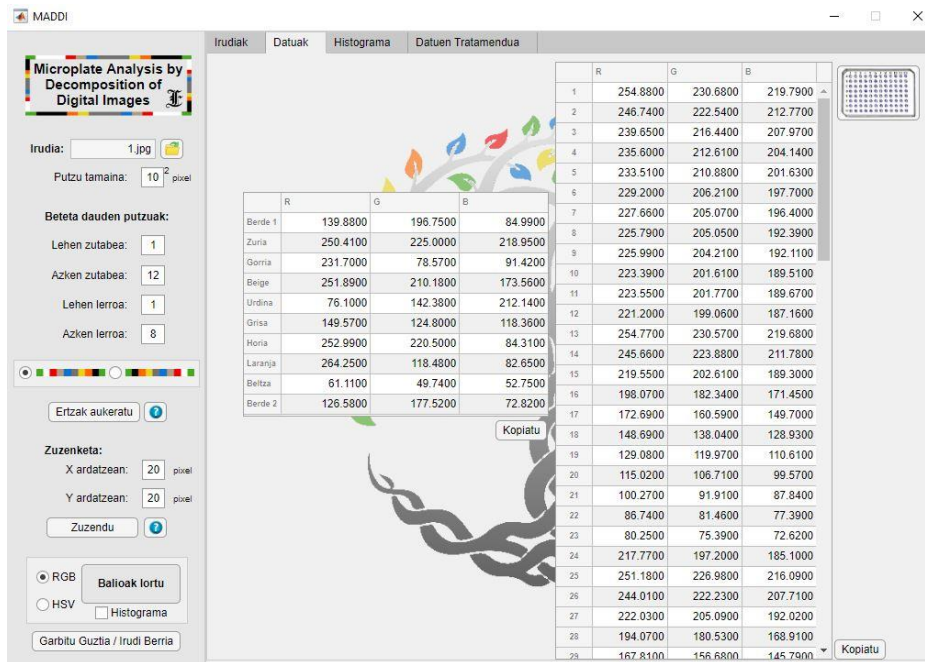


II.7 irudia: MADDI programa hautapenak erakusten. Gorriz: zuzenketa egiteko atala.

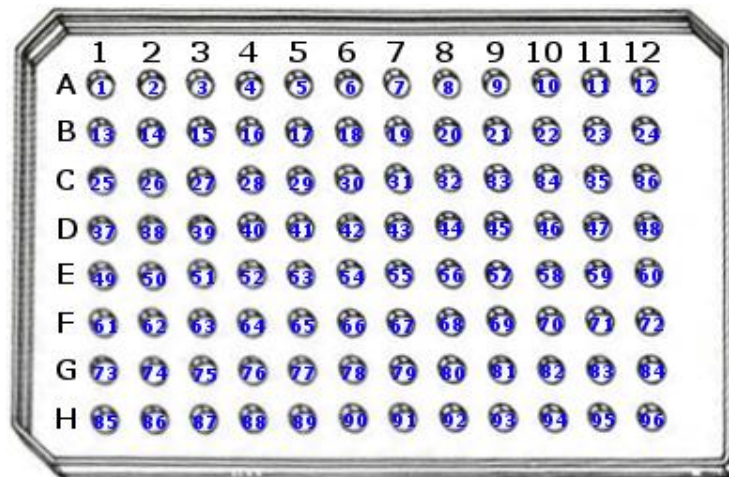
Pausu honek konputazionalki ez du erronka berririk suposatzen, zuzenketa erabiltzerakoan aurretik sortuta dagoen kodea berriz exekutatu da, prozesua errepikatuz.

5) Datuak lortu

Behin hautapenak ondo daudela ziurtatu ondoren hauen zenbaki-balioak lortu daitezke "Balioak lortu" botoiarekin: HSV balioak, RGB balioak edo/eta hauen histograma, erabiltzaileak behar duenaren arabera. Horretarako, hautatu diren putzu eta kolore bakoitzarentzat pixel bat baino gehiago daudenez (defektuz 100) MADDIk guzti hauen batezbestekoa egin eta bi taula erakusten ditu II.8 irudian agertzen den bezala, bat kolore-barrako kolore bakoitzaren batezbesteko RGB edo HSV balioak dituen eta bestea putzu bakoitzaren batezbesteko RGB edo HSV balioak dituen (hautatu ez diren putzuen kasuan balioak 0 izango dira). Azken balio hauek II.9 irudian ageri den sistemarekin zenbakituta daude, eta zenbakitze sistema hau 6. pausuan ere erabiliko da.



II.8 irudia: MADDI hautapenen kolore kanalen balioak erakusten.



II.9 irudia: Mikroplakako putzuak zenbakitzeko sistema.

Taula hauek kopiatu eta banan-banan eskuz prozesatu daitezke Excel erabiliz, edo bestela 6. pausura jo.

Intereseko pixel guztien koordinatuak izanik, hautatu diren zati horien informazioa erauzi eta antolatu behar da:

Interesetzen zaigun informazioa hautatutako zati bakoitzaren batezbesteko kolorea da, hau da, batezbesteko RGB edo HSV balioak, esan bezala hautapenak pixel bat

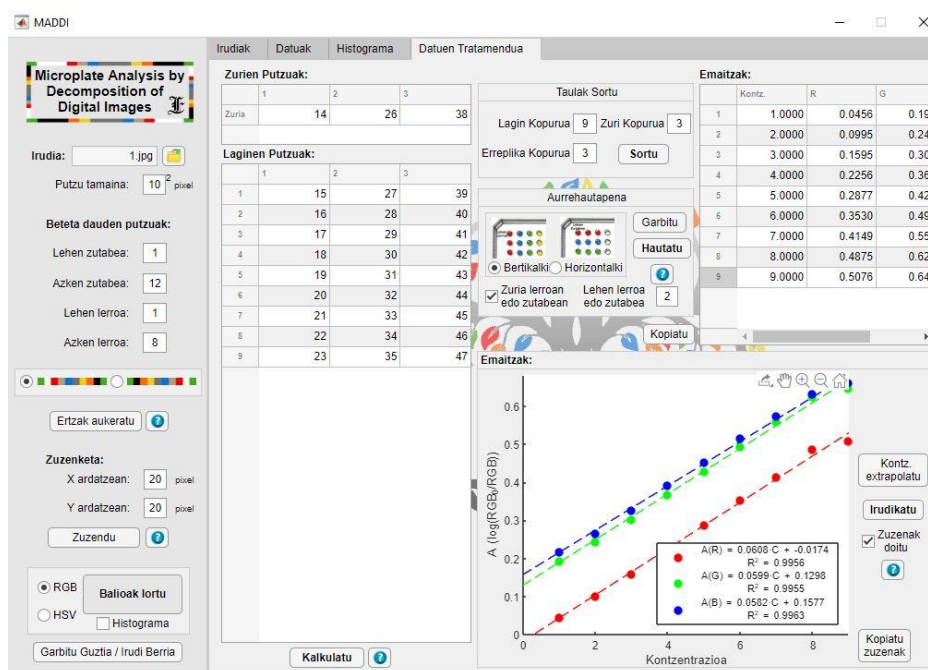
baino gehiago baititu (normalean 100), beraz, begizta batek hautapeneko pixel guztien balioak independenteki hartu, batezbestekoa kalkulatu eta emaitza matrize berri batean (bat putzuentzat eta bestea kolore barrarentzat) txertatzen du, prozesua kolore kanal eta hautapen guztiekin errepikatuz. Gauzak errazte aldera mikroplakari dagokion matrizea beti da dimentsio maximokoa, eta erabili ez diren putzuei dagozkien balioak nulutzat hartzen dira. Beraz, honelako bi matrizeekin amaitzen da prozesu hau: 96 putzu x 3 kanal eta 10 kolore x 3 kanal.

6) Datuak prozesatu (hautazkoa)

Datuak prozesatzea hauek lortzea bezain lan luzea eta astuna izan daitekeenez, eta ikusita ia beti patroiz batzuk errepikatzen direla mikroplaka guztiekin, pausu hau ere muga bateraino automatizatu da.

Ohikoa da lagin bakoitzaren erreplika bat baino gehiago egitea, eta erreplika hauek modu ordenatu batean jartzea, segida bat jarraituz: esaterako zutabe ezberdinetan lagin ezberdinak eta lerro ezberdinetan erreplika ezberdinak, elkarren parean.

Hau honela, II.10 irudian agertzen den interfazea erabiliz elkarren berdinak diren disoluzioak lokalizatu daitezke ondoren automatikoki batera prozesatzeko.



II.10 irudia: MADDI programan hautapenen kolore datuak prozesatzeko panela.

Lehenik, II.10 irudian agertzen den "Taulak Sortu" atalean bateragarriak diren (berdinak diren eta RGB balio berak izan beharko lituzketen) lagin eta zuri erreplika kopuruak hautatu behar dira, tratatu nahi den lagin kopuruarekin batera, eta dimentsio horiek dituen taula (matrize) bat sortuko da.

Ondoren, posible da taula hau eskuz betetzea, elkartu nahi diren putzuen zenbakiak II.9 irudian (5. pausuan) agertzen den bezala zenbakituta baitaude. Modu ordenatuan badaude putzuak, ordea, posible da II.10 irudiko "Aurrehautapena" ataleko algoritmoa baliatuz matrizea automatikoki betetzea.

Bestalde, posible da laginen errepliketako bat gaizki egotea edo prestatu ez izana, kasu honetan egingo den batezbestekotik kanpo utzi daiteke erreplika hau, matrizean honi dagokion posizioan 0 jarriz.

Matrize hau osatu ondoren eta putzu guztiak ongi zenbakituta eta kokatuta daudela ziurtatu ondoren, matrizearen azpian dagoen "Kalkulatu" botoia sakatuz MADDik lagin bakoitzaren errepliken RGB edo HSV balioen batezbestekoa egin ondoren, absorbantzia lortzeko beharrezkoa den logaritmoa aplikatuko die eta "Emaitzak" atalean erakutsiko ditu.

Tratatutako putzu hauetan laginak badaude hemen amaitzen da datuen tratamendua, taula hori kopia eta egin beharrezkoa egin daiteke. Tratatutako putzuak patroizuzen batenak badira, ordea, posible da lortutako absorbantziei kontzentrazioak esleitzea, matrizea eskuz betez edo lehenengo biak bete ondoren estrapolatzeko botoia erabiliz (horretarako beharrezkoa da kontzentrazioek progresio lineal bat jarraitzea). Bete ondoren, emaitza hauek irudikatu daitezke II.10 irudian ageri den grafikoan, absorbantzia vs. kontzentrazioa, baita zuzen bat esleitu ere. MADDik kolore kanal bakoitzarentzat zuzen bat irudikatuko du egokiena zein den ikusi ahal izateko.

Datuen prozesamendu aldetik ordenagailu batentzat oso erraza izan arren kalkulu hauek egitea, erabiltzailearekin interakzio handia eskatzen du, eta horregatik ez da hain erraza pausu hau automatizatzea. Azaldu bezala pausu honetan erabiltzaileak eman beharreko inputa (nahiz automatizazio algoritmoek lagunduta) oso handia da. Jada existitzen den datu matrizeko zein datu beste zein datuarekin konbinatu behar den adierazten da, eta konbinazio kopuru posiblea oso ordena handikoa da, beraz, erabiltzaileak kontuz erabili beharrezkoa, gainbegiratu, akatsak egitea erraza baita.

Azaldu den bezala pausu honen helburua absorbantziarekiko baliokideak diren datuak lortzea da RGB edo HSV balioetatik abiatuz, horretarako erabili beharreko ekuazioa aplikatzeko erraza da. Begizta kode bat erabiliz berriz ere erabiltzaileak adierazitako konbinazio guztiak egiten dira: adierazitako putzuen datuak lortu, batezbestekoa kalkulatu eta ekuazioa aplikatu, azkenik emaitzak matrize berri batera pasa eta matrize hori erabiltzaileari erakutsi.

Azken pausu bezala erabiltzaileak putzu konbinazio bakoitzari dagokion kontzentrazioa sartzen badu input moduan matrizean absorbantzia balio hauek zuzen batera doitu daitezke eta zuzen hau erabiltzaileari erakutsi, doitutako ekuazioaren parametroekin batera.