



METODOS ANALÍTICOS CON IMÁGENES DIGITALES.

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

LORENA GÓMEZ ANSÓN

DIRECTOR: ÁNGEL LOPEZ MOLINERO

Convocatoria de Junio de 2016

Abstract

A method for sulphites determination has been developed. It based on digital images and reflected RGB colors produced in the chromogenic reaction with nitroprusside, or Boedeker's reaction.

Reaction factors such as: surfactants, reactive micro-particles of nitroprusside-zinc and different amines. The amines that have been studied are: hexamethylenetetramine which was applied as an alternative to Pyridine. On the other hand, amines such as: putrescine, cadaverine and histamine, have demonstrated differences in its chromatic behavior. Thereby the histamine favors the coloration, whereas the putrescine and the cadaverine are less sensitive and more similar to each other.

Instrumental factors were studied. Between them: the reaction support, the class and the colour of the illumination, conditions for the digital image capture with open or closed systems with controlled stray light.

The colour variance and its distribution between the fundamental factors such as: analyte, camera and method; has been evaluated.

The best analytical performance is achieved with white light and the reflected component G, which reduces the detection limit from 6.0 to 3.0 mg/l.

It has also studied the quantitative determination method using a multiple linear regression, MLR, based on RGB reflected colours with red, green and blue illuminations.

The method was applied to the control of sulphites in a commercial white wine. The determination has been validated against an official reference method. The statics comparison of results shows that no systematic errors. Also recovery values of spiked sample additions were 98%.

Key words:

Digital Image Colorimetry, RGB colours, Sulphite, Boedeker, Micro-particles, Wine Control.

Resumen

Se ha desarrollado un método para la determinación de sulfitos mediante la captura de imágenes digitales y lectura de colores RGB reflejados producidos en la reacción cromogénica con nitroprusiato, o reacción de Boedeker.

Se estudia la influencia de factores de reacción como: tensoactivos, preparación de micro-partículas reactivas de nitroprusiato-zinc y diferentes aminas. Las aminas estudiadas han sido: la hexametilentetramina que se aplica como reactivo alternativo a la Piridina. Por otra parte aminas como, putrescina, cadaverina e histamina, han demostrado una diferente influencia en la cromaticidad. Así, la histamina favorece significativamente la coloración, mientras que la putrescina y la cadaverina son menos sensibles y más similares entre ellas.

Se han evaluado factores instrumentales como: el soporte donde se desarrolla la reacción y el tipo y color de iluminación 'w-rgb' de la imagen digital, además de la influencia de la captura de la imagen en un sistema abierto o cerrado con luz parásita controlada.

Se caracteriza la varianza cromática y su distribución en los factores fundamentales: analito, cámara y método.

Las mejores prestaciones analíticas se consiguen con iluminación blanca, y colores reflejados R- G, lo que reduce el Límite de detección de 6.0 a 3.0 mg/l. Se ha estudiado la aplicación de un método de regresión múltiple, MLR, basado en la lectura de los colores RGB con iluminaciones roja, verde y azul.

El método se ha aplicado al control de sulfitos en vino blanco comercial. La determinación se ha validado frente a un método de referencia oficial. La comparación estadística de resultados demuestra que no hay errores sistemáticos. Así mismo los valores de recuperación de una muestra aditivada, son del 98%.

Palabras clave:

Colorimetría imagen digital, RGB, Sulfitos, Boedeker, Micro-partículas, Control de vino.

Índice

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN: COLORIMETRÍA DE IMÁGENES DIGITALES.....1
2. SULFITOS.....3
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO.....6

CAPITULO II: EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTACIÓN.....6
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS.....8
 - 2.1 Preparación de disoluciones
 - 2.2 Procedimientos experimentales
 - 2.3 La muestra

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SISTEMA CROMOGENICO.....10
 - 1.1- Características básicas.
 - 1.2- Influencia de aminas
 - 1.3- Orden de adición de reactivos
 - 1.4- Reactividad con micro-partículas: 'mps'
 - 1.5- Caracterización de micro-partículas
 - 1.6- Influencia de tensoactivos
2. INFLUENCIA DE FACTORES INSTRUMENTALES.....15
 - 2.1 Cámara, web-cam y móvil
 - 2.2 Formato de la imagen digital: jpg y raw
 - 2.3 Número de pixeles
 - 2.4 Análisis factorial
 - 2.5 Iluminación
3. CARACTERIZACIÓN QUIMIOMETRICA.....19
 - 3.1 Varianza cromática
 - 3.2 Fuentes de la varianza cromática
4. PRESTACIONES ANALÍTICAS Y CALIBRACIÓN.....20
 - 4.1 Rango lineal y prestaciones analíticas para iluminación blanca
 - 4.2 Calibración por regresión lineal múltiple- MLR-
5. APLICACIÓN DEL MÉTODO. DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN VINO.....23
 - 5.1 Determinación de sulfitos en vino
 - 5.2 Tratamiento de la muestra
 - 5.3 Resultados
 - 5.4 Validación
 - 5.4.1 Método oficial
 - 5.4.2 Ensayos de recuperación.

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA.....24

Capítulo I. Introducción y objetivos

1.-INTRODUCCIÓN: COLORIMETRÍA DE IMÁGENES DIGITALES.

El desarrollo de nuevos métodos analíticos basados en imágenes digitales, en particular la Colorimetría de Imágenes Digitales¹, DIC, mediante el uso de: cámaras digitales², 'smart-phones'³, 'i-pad-tablets', 'web-cam'⁴ o incluso 'escáneres'⁵, es un campo de gran impacto analítico. Se trata de metodología con procedimientos de medida en condiciones 'casuales' lo que junto a la inmediata lectura de los datos cromáticos, permite dar respuestas ajustadas a situaciones de alta demanda de control analítico. Los métodos usan detectores de radiación del tipo CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor), o CCD (Charge Coupled Device), que proporcionan medidas de colores básicos, Rojo, Verde y Azul, RGB, de modo rápido y en 'miles de puntos'.

En su aplicación analítica se pueden diferenciar dos tipos de DIC:

- Basados en colores intrínsecos: cuando los mismos reactivos o productos experimentan un cambio de color.
- Procesos con compuestos cromogénicos externos que reaccionan con los analitos para producir un color o un cambio de color.

Se han publicado métodos para la detección y medida rápida de diferentes analitos en muy diversos campos. Así se citan algunos ejemplos como: iones y metabolitos en fluidos biológicos, antisépticos-povidona yodada-, Fe(III) y Cloro en agua, Ni en meteoritos, o colorantes en alimentos^{6,7}. Se ha aplicado en monitorización continua y automática de reactivos en tiempo real, control de procesos industriales de electrodeposición, en pruebas de campo semi-cuantitativas de compuestos opiáceos ilícitos o anfetaminas. También se ha aplicado en métodos de emisión atómica, DIB-FES, lo que ha permitido determinar principios activos de productos farmacéuticos de modo indirecto, a través de la emisión de metales alcalinos y alcalinotérreos⁸.

Los principios de la determinación analítica cuantitativa mediante imágenes digitales, son:

- Captura de una imagen digital.
- Lectura de la intensidad de la luz reflejada en los colores básicos RGB.
- Relación con la concentración del analito de interés.

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

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

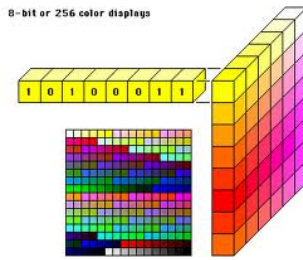


Figura 1: Codificación de un canal de color mediante un sensor de 8 bits



Figura 2: Imagen de una composición aditiva de colores básicos

Los valores RGB medidos son dependientes de muchos factores, entre ellos: la fuente del iluminante, la reflectancia de los objetos y los efectos de interpretación de la cámara. Este complejo modelo introduce algún grado de error y diferencias cuando se comparan diferentes capturas-imágenes.

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

1.1.- La colorimetría tricromática

El principio de la colorimetría tricromática establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios convenientemente elegidos. En el sistema de coloración definido por la CIE (1931) se toman como colores primarios: los obtenidos a longitudes de onda: 435,8nm (azul), el 546,1nm (verde) y el 700nm (rojo).

Los sistemas de medida de color en las cámaras digitales se basan en el uso de una máscara o filtro-mosaico de colores que se sitúa sobre el sensor, CCD-CMOS. Los filtros transmiten la luz de un solo color primario: R, G o B.

El típico filtro es el conocido como mosaico-máscara de Bayer y que se presenta en la **Figura 3**. Como se puede ver, el filtro está formado por una distribución y disposición sistemática de filtros verdes (50% del total), rojos (25%) y azules (25%).

Así a cada pixel-fotodiodo del sensor le llega la luz correspondiente a un color primario. Posteriormente se deduce matemáticamente la luminosidad, en cada pixel, a partir de la luminosidad que aportan 4 pixeles diferentes próximos. Es decir, la señal cromática de una cámara, es dependiente de la configuración de la máscara y los algoritmos-procesos de interpolación de los colores individuales.

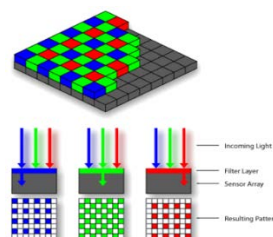


Figura 3: Mosaico típico de Bayer utilizado en las cámaras digitales, en el cuál se muestra la predominancia de los puntos verdes.

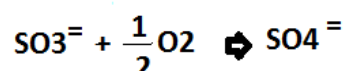
1.2.- Empleo de la colorimetría RGB en investigaciones precedentes

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

2.-SULFITOS: SO₃⁼

2.1.- Propiedades químicas

Los aniones sulfito tienen un carácter reductor: E° -0.936 V para SO₄⁼/SO₃⁼. De modo que la oxidación de sulfito a sulfato es una reacción que se produce por el oxígeno del aire:



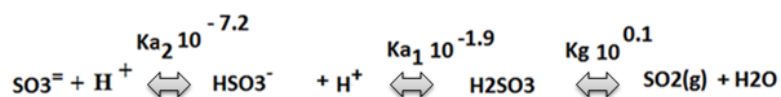
Sin embargo, su cinética es lenta. La acción catalizadora de iones metálicos, como Cu(II), Co(II), Fe(III), Ce(IV) y otras especies orgánicas favorecen la oxidación. Por el contrario, compuestos como alcohol-etanol o glicerina la inhiben.

Desde el punto de vista analítico, la estabilización de disoluciones de sulfito se logra mediante la adición de EDTA, que acompleja los iones catalizadores. También las mezclas agua-glicerina estabilizan las disoluciones¹⁴.

Por otra parte la reacción anterior es interesante desde el punto de vista analítico ya que permite determinar el oxígeno de modo indirecto. Se ha descrito la determinación de oxígeno en agua mediante la medida del exceso de sulfitos que queda¹⁵ en disolución.

Otra característica ligada a los sulfitos es la existencia de diferentes especies de S(IV) que se relacionan a través de 'equilibrios' en disoluciones acuosas. En estos es muy importante la influencia del pH del medio => en la figura se presentan los equilibrios entre especies:

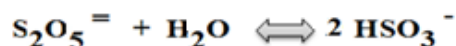
Los sulfitos, en medio ácido, se desplazan a bisulfito y luego a ácido sulfuroso. Y este finalmente a anhídrido sulfuroso. Siendo ésta, la especie favorecida en medio ácido¹⁶:



Es decir:



Otras reacciones importantes son las ligadas a la hidrólisis de la especie 'metabisulfito' que es ampliamente usada como conservante en alimentos:



Como se pone de manifiesto el sulfito y metabisulfito, en medio ácido, dan lugar a anhídrido sulfuroso, SO₂. Este compuesto tiene propiedades como agente antioxidante, antimicrobiano, e inhibidor de procesos enzimáticos o antioxidásico. Esta acción es conocida desde hace mucho tiempo y ha venido a ser usado habitualmente en la producción y conservación de vino, mostos y alimentos.

La solubilidad de los sulfitos puede ser comparable a la de los sulfatos. Como ejemplo, los sulfitos alcalinos son solubles en agua. Sin embargo, las sales alcalino-térreas son poco solubles. El CaSO_3 tiene una solubilidad de 0.0043 g/100 ml mientras que para CaSO_4 es 0.24 g/100 ml.

Los sulfitos y las especies ligadas como conservantes de alimentos, tienen la denominación: E 220-228. La página web-servidor de unizar¹⁷ es una referencia sobre conservantes en alimentos. Desde el punto de vista de legislación la directiva UE 1130/2011¹⁸, armoniza las leyes europeas sobre los aditivos alimentarios y los contenidos máximos autorizados.

2.2.-Métodos de determinación.

Procedimientos para la detección colorimétrica de sulfitos están basados en la decoloración del Verde de Malaquita, derivado del trifenilmetano, y en la reacción de Boedeker. Con el primer reactivo, los sulfitos decoloran sus disoluciones verdes en medio neutro. La reacción es sensible con un Límite de detección, LD, en torno a 1 mg/l, ppm¹⁶. Los Sulfuros son interferencia.

La reacción de Boedeker se produce entre sulfitos y nitroprusiato sódico, a pH ligeramente alcalino para dar una coloración roja. Tiene un límite de detección pD 4.3 ($10^{-4.3}$ mol/l, 6.3 mg/l) y bajo nivel de interferencias. Los sulfuros producen una coloración violeta. Posteriormente ampliamos esta reacción.

El uso de reactivos con enlaces di-sulfuro es aplicado para producir test rápidos de identificación y determinación semi-cuantitativa. Como el 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), reactivo de "Ellman's" o DTNB y el 4,4'-ditiodipiridina, 4-PDS¹⁹. En estos casos los sulfitos producen la rotura del enlace di-sulfuro para dar tioles con espectros de absorción sensibles.

Procedimientos recientes han sido publicados. Así Hasan²⁰ propone la formación del complejo $\text{SO}_3\text{-Cbs}$, entre sulfitos y el reactivo Diaqua-Cobester, que se determina mide por la absorción a varias lambdas: 313, 349, 425 y 525 nm. Presenta rangos lineales entre 0.05-25 mg/l, según la lambda.

2.3.-La reacción de Boedeker.

Los sulfitos reaccionan con nitroprusiato: pentaciano nitrosil ferrato (III), para dar una coloración rojiza. En presencia de Zn(II), Cd(II), Ni(II), Ag(I) o alcalino-térreos aumenta la sensibilidad y se produce un precipitado rojo²¹. El precipitado reacciona con aminas para incrementar su sensibilidad. Lo que se ha justificado por la formación de un par iónico menos soluble pero más coloreado. Las reacciones se describen a continuación:

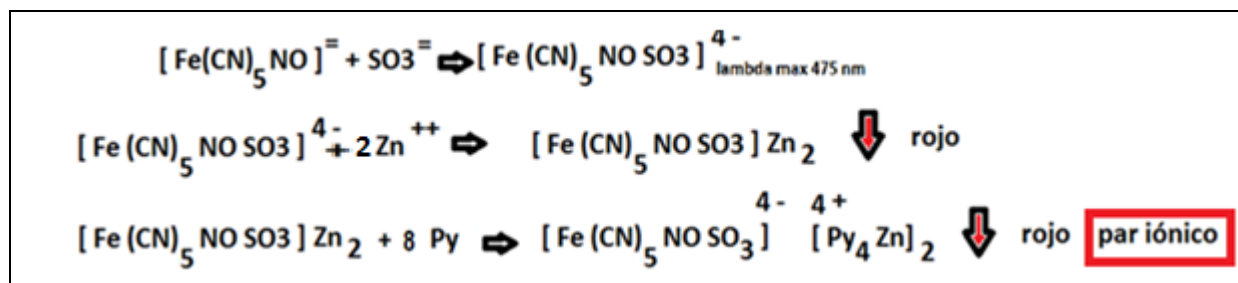


Figura 4: Reacción de Boedeker

2.4.-Métodos rápidos y test comerciales

En ámbitos como la alimentación, medio-ambiente o clínico, existe una fuerte demanda de determinaciones analíticas rápidas y de eficiencia. Los métodos llamados 'listos para usar': "ready for use" y métodos de campo se orientan a satisfacer estos objetivos.

En la tabla se ofrecen las características analíticas de métodos-kits comerciales, de gran aplicación para determinaciones de sulfitos en alimentos como vino, mosto, etc:

Casa comercial	Características del método	Prestaciones analíticas: Tipo de detección: Cualitativa o semi-cuantitativa Rango de aplicación: SO ₃ ²⁻ , mg/l
Merck	Test Volumétrico: Oxidación con yodato: <u>Primera etapa:</u> IO ₃ ⁻ + 8 I ⁻ + 6 H ⁺ → 3 I ₃ ⁻ + 3 H ₂ O <u>Segunda etapa:</u> I ₃ ⁻ + SO ₃ ²⁻ → SO ₄ ²⁻ + I ⁻ Indicador: almidón → Aparece color azul, cuando el yodo no se consume en la etapa 2. Por el exceso de I ₃ ⁻	0.5-50 0.3-32
Hanna	Similar procedimiento	0-200
Merck	Test Colorimetric-spectrophotometric: con DTNB- Elman reactivo. ⇒ Color amarillo, lambda absorción 412 nm	1-60 0.8-48
Biosystem	Similar al de Merck: DTNB: ditionitrobenzico:	
Índigo –R-instruments	Test-strip: basado en la reacción de Boedeker <u>método 1-</u> Zn ²⁺ + [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ → Zn ₂ [Fe(CN) ₆] ↓ blanco Zn ₂ [Fe(CN) ₆] + [Fe(CN) ₅ NO] ⁻ + SO ₃ ²⁻ → Zn ₂ [Fe(CN) ₆] + [Fe(CN) ₅ NOSO ₃]Zn ₂ ↓ rojo <u>método 2</u> Zn ²⁺ + [Fe(CN) ₅ NO] ⁻ → Zn [Fe(CN) ₅ NO] ↓ rosa Zn[Fe(CN) ₅ NO] + NH ₄ OH → Zn[Fe(CN) ₅ NONH ₃] ↓ blanco + H ₂ O ↓ blanco Zn[Fe(CN) ₅ NONH ₃] + SO ₃ ²⁻ → [Fe(CN) ₅ NOSO ₃]Zn ₂ ↓ rojo + NH ₃	Detección cualitativa

La función de 'screening' de este tipo de métodos ha sido reconocida por la ISO y los fabricantes más importantes de productos químicos. Destacamos un artículo de comparación crítica de distintos productos comerciales²².

Podemos decir que los métodos desarrollados mediante DIC caen dentro de este tipo de metodología rápida.

2.5.- Análisis aplicado.

Se ha aplicado el método DIC desarrollado a la determinación de sulfito en vino y en conservas vegetales.

La determinación de sulfito, y sulfuroso SO₂, en vinos, es de especial interés. La bibliografía distingue dos tipos de sulfuroso en vino: el libre y el combinado. En este último se incluyen los compuestos de adición de los sulfitos sobre grupos carbonilos.

Su determinación se lleva a cabo mediante:

- i- Método Paul²³, método oficial para sulfuroso libre en vino. Se caracteriza por una destilación con arrastre de SO₂ borboteando con corriente de aire o N₂, sobre vino a temperatura ambiente y acidificado con ácido fosfórico. El destilado se recoge sobre disolución de H₂O₂ y determinación del ácido sulfúrico generado, mediante valoración ácido base con NaOH 0.01 M.

- ii- Método Paul para sulfito combinado: Se lleva a cabo destilando la disolución de vino que queda del paso anterior y calentando ligeramente. La suma de las dos mediciones da el contenido total. Y los dos métodos los hemos usado como referencia para validar el nuevo método propuesto.
- iii- Método normalizado Monier-Williams²⁴, UNE y AOAC. Similar a los anteriores pero con ácido clorhídrico y destilación /arrastre con N₂.

Además de la aplicación a vino, también se han realizado pruebas para la determinación de SO₂ en conservas de: alcaparras y guindillas.

3.- OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

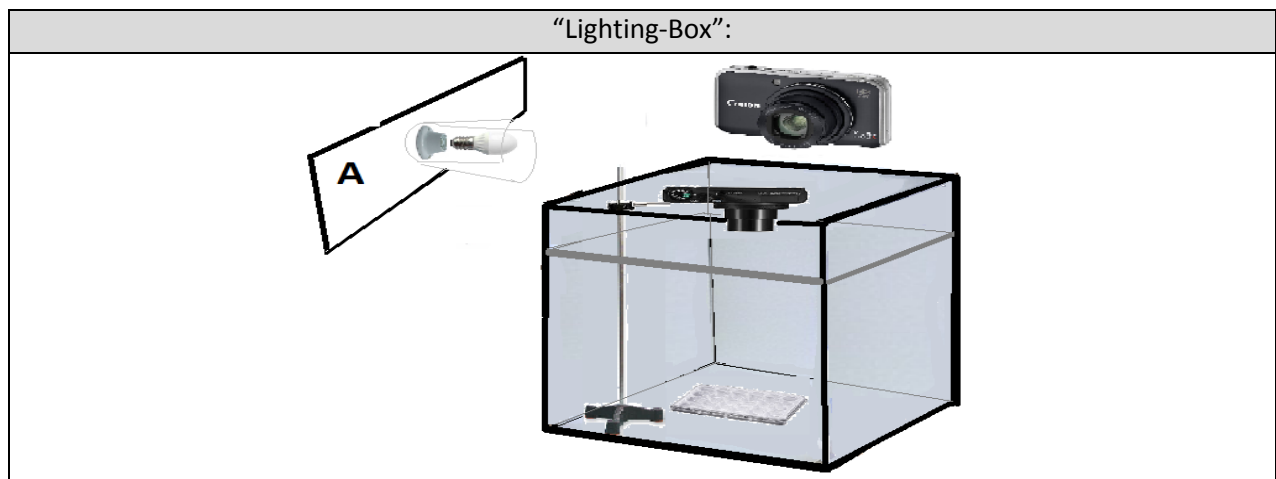
- ✓ Implementar la reacción de Boedeker como método digital con cámara fotográfica.
- ✓ Caracterizar el perfil cromático-RGB- a partir de la lectura de imágenes digitales.
- ✓ Determinar la varianza cromática y la sensibilidad analítica del sistema teniendo en cuenta condiciones como:
 - Tipo de aminas
 - Formación de micro-partículas del reactivo.
 - Medios ordenados con tensoactivos.
- ✓ Evaluar las prestaciones analíticas :
 - Según la iluminación
 - Con variables únicas: R-G-B
 - Con métodos de calibración multivariante
- ✓ Aplicación el método en el control de calidad de vino

Capítulo II. Experimental

1.-INSTRUMENTACION

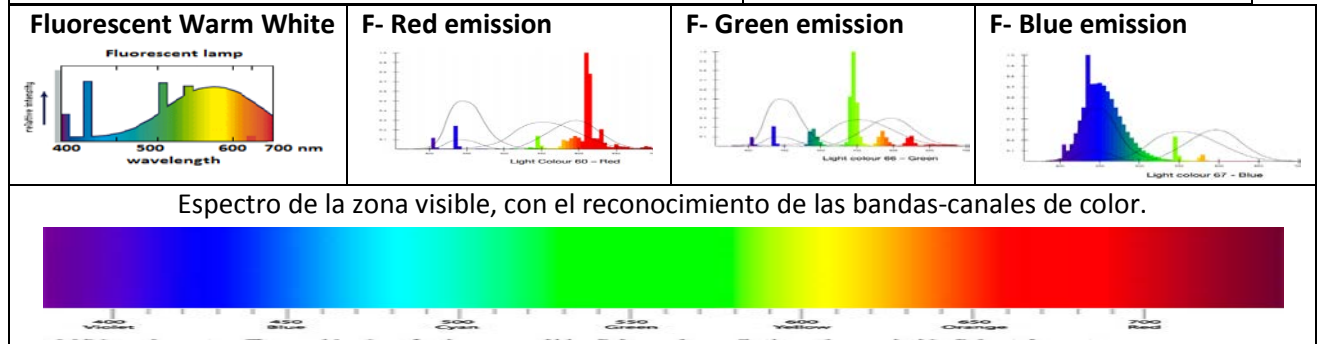
1.1-Cámaras digitales

Cámara digital CANON: Compacta: Power Shot SX230 HS	
Resolución	12,1 megapíxeles(12.1x 10 ⁶ pixeles)
Sensor `CMOS´: 1 /2.3 pulgadas = 6.17x4.55 mm Área pixel= (6.17x4.55)x10 ⁶ /12.1x10 ⁶ = 2.32 μm ² Procesador: DIGIC 4 iSAPs	
Cámara réflex NIKON: D100	
Resolución	6 megapíxeles
<ul style="list-style-type: none"> ○ Conversor analógico-digital de 12 bits. ○ ISO 200-1600. Velocidad 30-1/4000 sec. ○ Lente con focal equivalente a 36-105mm. ○ Tarjeta CompactFlash de 256 MB. ○ Formatos: JPEG, TIF y RAW. 	
Y: Web-Cam USB 2.0 de ASUS, y 'smart-phone' bq AQUARIS, E4	



Cubetas y soportes de reacción	
Placas de cultivo celular, 24 pocillos, PS-poli estireno-Transparentes,	
Placas de ensayo: test plate	
Cubetas espectrofotometricas de plexiglas	

Iluminantes: Fluorescentes y Lámparas LED	
Fluorescentes: Osram: diversos colores LED: EGLO:RGB E27 : regulable a 16 colores	Características LED: 7.5 watt, 470 lumen



1.2.- Otra instrumentación

Espectrómetro de IR: ALPHA FT-IR Bruker	
Microscopia electrónica de barrido: SEM: Microscopio JEOL JSM 6400	
	<p>Genera imágenes de electrones secundarios y retrodispersados acelerados con tensiones desde 0.2-40 Kv. Permite observaciones de hasta 3.5 nm de resolución.</p>

1.3. - Materiales de laboratorio

1. Micropipetas Pipet-Lite 'RAININ' 5-50 µl, 20-200 µl, 100 µl – 1 ml y 0,5-5 ml.
2. Matraces aforados de 50, 100 y 250ml.

2.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

2.1.- Preparación de disoluciones:

Todos los reactivos fueron de grado analítico. El agua desionizada fue obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore Elix 70. Sus características son dadas en la **Tabla 1**.

Resistencia	>5MΩ·cm (typically 10-15MΩ·cm)
Conductividad	<0,2µS/cm (typically 0,067-0,10µS/cm)
TOC Típica	<30ppb
Recuento bacteriano	<10cfu/ml

Tabla 1: Características del sistema de purificación y del agua desionizada

- Disolución de nitroprusiato sódico: SNP- Panreac: Nitro ferrocianuro sódico, dihidratado $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Núm. CAS 15078-28-1, Peso molecular 297.95 g/mol. Se disuelven 0.25g con agua desionizada y se llevan a volumen de 25ml.
- Disolución de nitrato de zinc: Panreac: Se disuelven 1.25 g de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ con agua desionizada y se diluye a 25ml, también con agua desionizada.
- Disolución patrón de sulfitos: 1000 mg/l: se pesa 0.07 g de Na_2SO_3 . Panreac y se disuelve y diluye a 50 ml en matraz aforado. Se estabiliza con adición de 0.18g de $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Disolución de NaOH: Panreac: Se disuelven 0.2 g de NaOH en 25mL de agua desionizada.
- Disolución de Hexametilentetramina: Hexamina: Hex : $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ -Probus: Se pesan 4.00 g y se disuelven en 10mL de agua desionizada. Extremada solubilidad en agua: 2.46×10^3 mg/ml
- Disolución combinada de Hexamina+NaOH: Se pesan 5.3g de Hexamina y 0.03g de NaOH se disuelven en un volumen de 20ml. Se centrifuga durante 15min a 3500 rpm. Se retira la parte sobrenadante.
- Suspensión de micro-partículas de nitroprusiato y zinc: $\text{snp-zn}'\text{mps}'$: Se pesa 1.00g de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ y se disuelven en 25ml de agua desionizada. Se enfrían a temperatura entre $5\text{y}10^\circ\text{C}$ con baño de agua y se mantiene en agitación vigorosa.
Por otro lado se pesan 0.25g de $\text{Na}_2 [\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 10ml de agua desionizada. Esta disolución se vierte gota a gota sobre la disolución anterior de nitrato de zinc. Una vez terminada la adición se acidifica con HCl 0.01M hasta un pH de 3. Y se mantiene en agitación constante.
- Tensoactivo neutro Tritón X 100: Polyethylene glycoltert-octylphenyl ether: Sigma: 60 mg/l: de modo similar a lo anterior se vierten 600µl del tensoactivo en 100ml de agua desionizada.
- Tensoactivo neutro Brij: Polyethylene glycol dodecyl ether: Sigma: 60 mg/l: se diluyen 600µL en 100ml de agua desionizada.
- Disoluciones más diluidas se preparan a partir de las anteriores de referencia y por dilución conveniente, de modo previo al uso.

2.2- Procedimientos experimentales

2.2.1- Experiencia tipo: rango dinámico

Sobre los pocillos de la placa de ensayo de 5 ml, se adicionan con micropipetas los volúmenes de las disoluciones patrón, de modo que se obtienen las concentraciones de la **Tabla 2**. Volumen total del ensayo: 3ml.

Disol	SNP, mol/L	Zn(II) mol/L	NaOH, mol/L	Hx, mol/L	EDTA, mol/L	water, µL	vol tot, µL	SO ₃ , mg/L
bl	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	0.00	2050	3000	0
2	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.69E-05	2045	3000	1.63
3	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	3.38E-05	2040	3000	3.25
4	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	6.76E-05	2030	3000	6.50
5	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.01E-04	2020	3000	9.75
6	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	2.37E-04	1980	3000	22.76
7	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	3.38E-04	1950	3000	32.51
8	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	4.40E-04	1920	3000	42.26
9	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	5.41E-04	1890	3000	52.01
10	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	7.78E-04	1820	3000	74.77
11	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	8.79E-04	1790	3000	84.52
12	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	9.81E-04	1760	3000	94.27
13	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.12E-03	1720	3000	107.28
14	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.22E-03	1690	3000	117.03
15	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.32E-03	1660	3000	126.78
16	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.42E-03	1630	3000	136.53
17	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.56E-03	1590	3000	149.54
18	3.66E-03	1.54E-02	5.00E-03	3.15E-01	1.66E-03	1560	3000	159.29

Tabla 2: Condiciones de la experiencia tipo de rango dinámico

2.2.2.- Captura de imágenes

Dentro de la 'lighting-box' se sitúa la placa de pocillos de ensayo. Se utilizan fondos blancos, iluminación indirecta y artificial, de diferentes colores, según el experimento. La cámara se utiliza en "modo automático" y sin flash. Antes de tomar las imágenes, se pre-enfoca con referencia en el fondo blanco, para sistematizar los "balances de colores automáticos".

2.2.3.- Lectura de colores

Las imágenes en formato ".jpg" se transfieren al ordenador mediante Microsoft Photo Editor. En cada imagen se miden las intensidades RGB mediante un programa desarrollado por nosotros, y para Matlab. La lectura final se obtiene como media de 1500 píxeles en 'regiones de interés: ROI', a lo largo de cada pocillo. El tratamiento matemático de los datos se realiza posteriormente mediante Matlab y/o Microsoft Excel. En la **Tabla 3** se ofrecen las características más significativas del proceso.

Volcado de imágenes	MicroSoft Windows 8, con Microsoft Photo Editor
Medida colores	'programa': lectura color', en MatLab 2011b
Archivos: Matriz de datos RGB:	Patrones: cada pocillo: ' 1500 puntos' x 3 intensidad(RGB) Muestras: cada pocillo: ' 1500 puntos' x 3 intensidad(RGB).

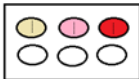
Tratamiento de los datos	Mediante Excel 2010
'ROI' tipo lectura de colores RGB	'líneas de lectura' : 

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

2.3.-La Muestra



Valssira: IGP Vino Bajo Aragón. Bodega N^a Sra. del Olivar SCL, Lécera (Zaragoza).

Vino Blanco Macabeo

- **Muestra de ensayo:** El análisis de vino se realiza sobre muestra directa sin tratamiento.
- **Muestra de vino fortificada:** sobre 40ml de muestra de vino, se adicionan 0.0075g de Na₂(SO₃). Y además 0.02g de EDTA para su estabilización.

Capítulo III. Resultados y discusión

1.- SISTEMA CROMOGÉNICO.

1.1.- Características básicas:

Los sulfitos según el procedimiento de Boedeker, reaccionan con nitroprusiato sódico y Zn(II) en medio alcalino, para producir una coloración roja. La coloración de este complejo se intensifica en presencia de aminas.

En la **Figura 5** se ofrece la imagen del experimento tipo descrito en la **tabla 2**, anterior, y que corresponde a un amplio rango dinámico de SO₃⁻: blanco, 1.63 -159.29 mg/l.

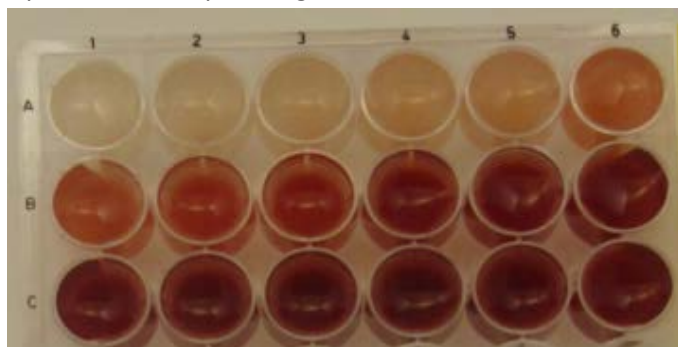


Figura 5: Imagen digital de la reacción de Boedeker en las condiciones de la Tabla 2.

Las características del sistema RGB, tras la medida de la imagen digital se ven en la **Figura 6**.

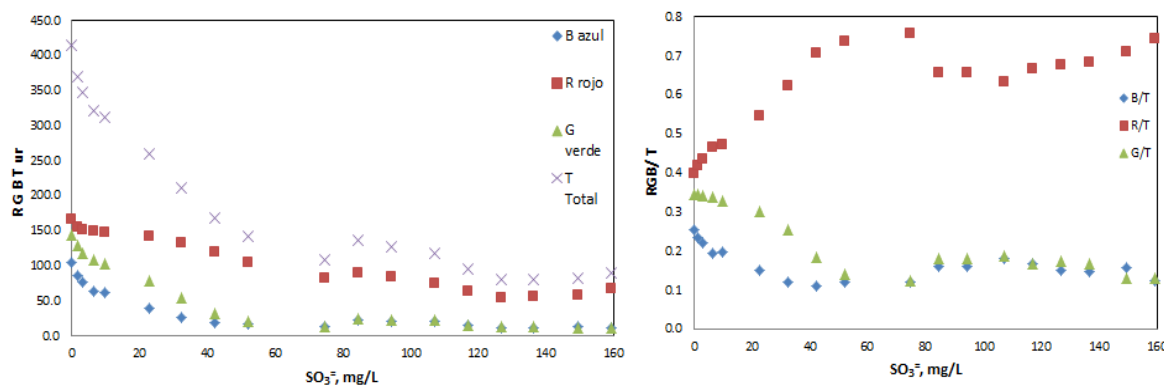


Figura 6: Rango dinámico de sulfitos y valores de la intensidad cromática.

En la misma se destacan las tendencias de los colores absolutos y los relativos, al aumentar la concentración de sulfitos. De modo que:

- Las tres componentes RGB presentan comportamiento lineal y decreciente. Y se pueden diferenciar dos rangos: el primero hasta, aproximadamente, 50 mg/l y el segundo hasta 130 mg/l.
- La pendiente más pronunciada se da sobre el color verde (G).
- En valores relativos: el color rojo aumenta hasta un máximo-límite y luego tiende a permanecer constante. El comportamiento de los colores verde y azul muestra una disminución inicial y luego tienden a permanecer constantes.

1.2.-Influencia de aminas

Se estudia la influencia del tipo de aminas sobre el desarrollo de color de la reacción. Se ha experimentado con: Piridina (Py), Hexamina (Hex), Trietanolamina, por un lado, y Cadaverina (Cad), Putrescina (Put), e Histamina (His), por otro.

Los resultados han mostrado intensificación de las coloraciones significativas con todas las aminas excepto la trietanolamina.

La Py es habitualmente usada en este ensayo pero encontramos que tiende a dispersar el precipitado y da lugar a una coloración no homogénea con medidas de mayor irreproducibilidad.

La hexamina se ha estudiado como alternativa a la Py. Su solubilidad es muy superior en medio acuoso y se favorece la estabilidad del pH y homogeneidad del precipitado.

El resto de aminas se ha orientado a un estudio de tipo cualitativo, de modo que se ha evaluado el comportamiento cromático diferencial entre aminas.

En las siguientes tablas y figuras se presenta el estudio de la influencia de la concentración de la Hexamina sobre la determinación de sulfitos.

Rangos estudiados: Sulfitos: 12-82-140 mg/l, Hex: Valores de 10-20-30 mg/l se han estudiado inicialmente pero solo se ofrecen los resultados más significativos correspondientes al rango: 40-45-50 mg/ml.

Disol	SNP, mol/l	NaOH, mol/L	Conc Zn, mol/l	SO ₃ ⁼ , mg/L	EDTA, mol/l	water, uL	vol tot, ul	Hx, mg/mL
A-1	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	12	1.13E-04	1080	3000	40.1
2	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	82	7.91E-04	900	3000	40.1
3	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	140	1.36E-03	750	3000	40.1
B-1	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	12	1.13E-04	1040	3000	45.7
2	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	82	7.91E-04	860	3000	45.7
3	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	140	1.36E-03	710	3000	45.7
C-1	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	12	1.13E-04	1000	3000	51.2
2	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	82	7.91E-04	820	3000	51.2
3	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	140	1.36E-03	670	3000	51.2
D-1	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	12	1.13E-04	1000	3000	-
2	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	82	7.91E-04	820	3000	-
3	1.06E-02	6.65E-03	5.40E-02	140	1.36E-03	670	3000	-

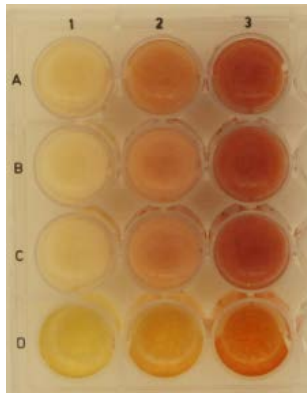
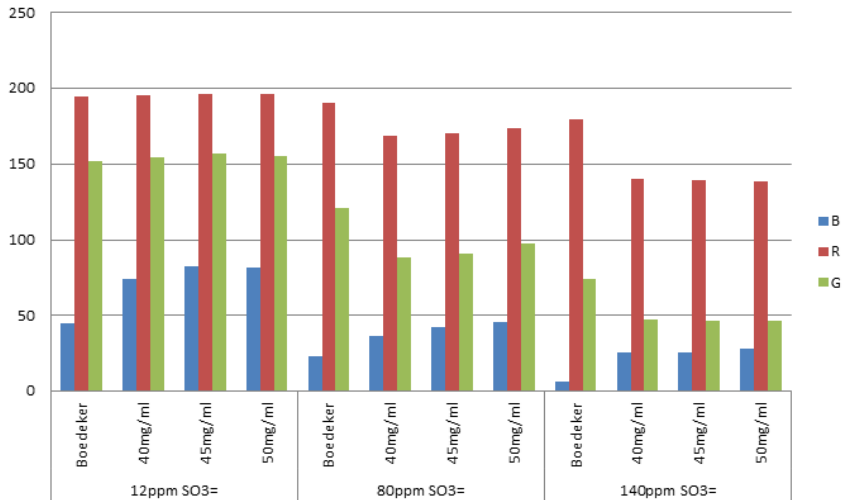


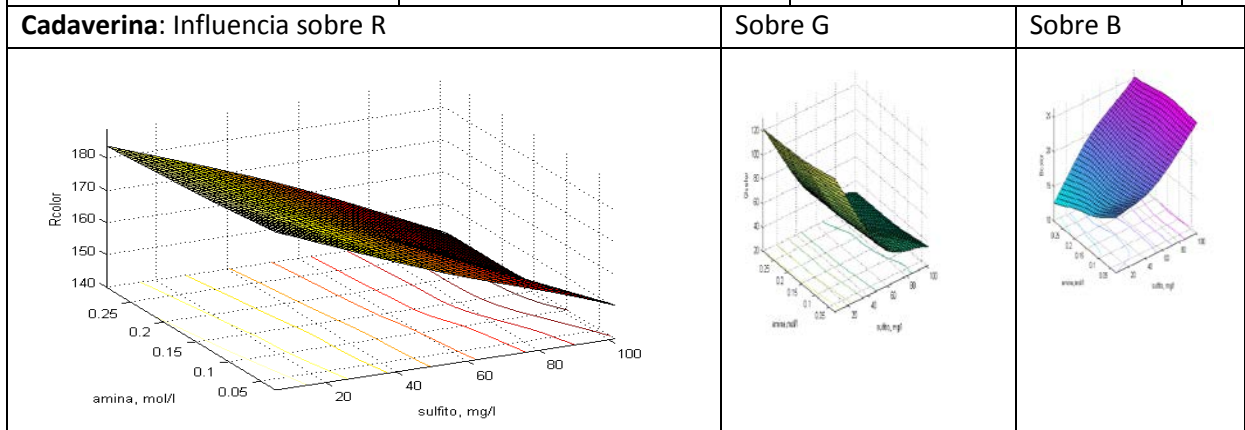
Figura 7:
 Imagen de la coloración producida por la Hex a tres valores de concentración de sulfitos. Los pocillos D-1,-2,-3 corresponden a Boedeker sin Hex.

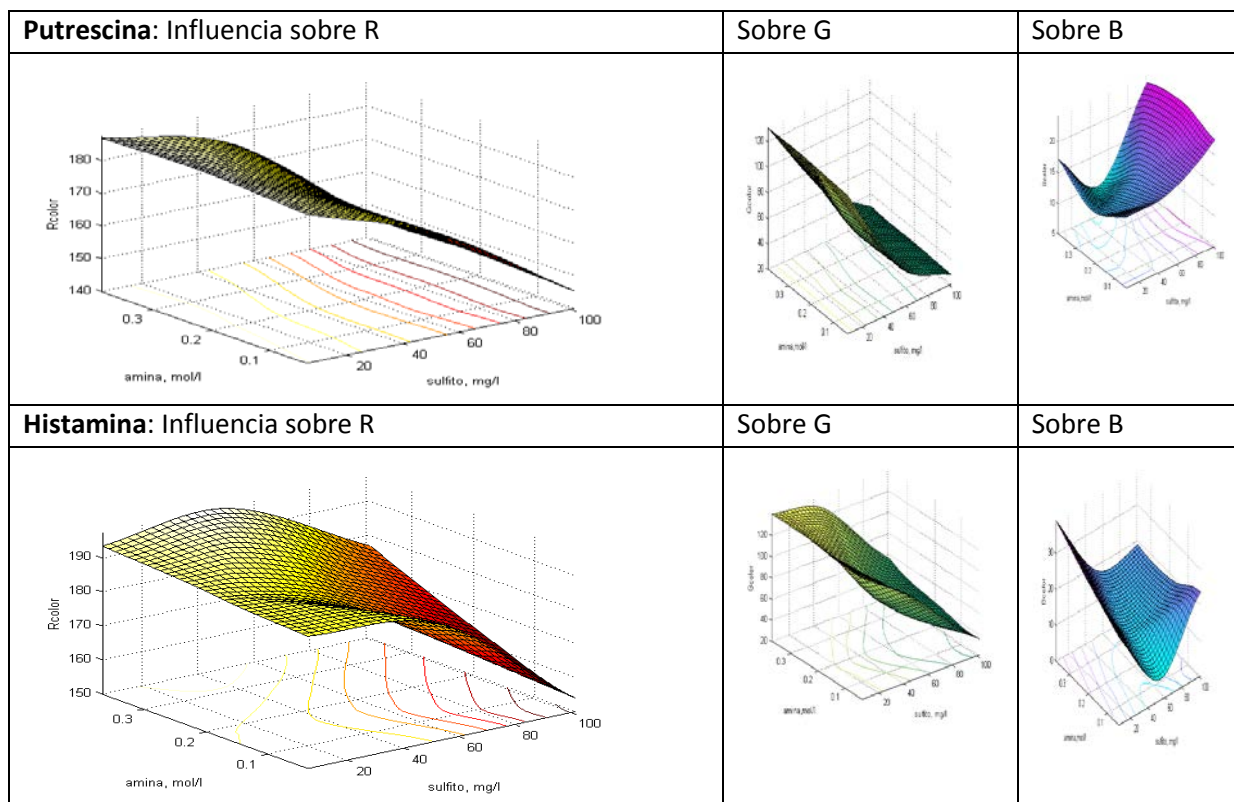


Los resultados muestran la influencia de la Hex en la reacción. Se observa como los colores cambian significativamente con la adición de la amina. Por otra parte se demuestra que en el rango estudiado el efecto de la Hex es muy similar. Por tanto, se elige **45mg/ml** de hexamina como valor 'robusto' y óptimo para los siguientes experimentos.

En las **tablas y figuras** siguientes se muestran los resultados sobre el resto de aminas.

Condiciones del experimento:		
Concentraciones de sulfitos: mg/l		
6.0, 50.0 y 100.0		
Concentraciones de aminas: mol/L		
Cadaverina: 0.029, 0.144, 0.288	Putrescina: 0.039 , 0.194, 0.388	Histamina: 0.037,0.184,0.368





Los resultados muestran una gran similitud entre Cadaverina y Putrescina pero una diferencia significativa frente a la Histamina. Esto está en concordancia con la estructura de las aminas.

1.3.-Orden de adición de reactivos

Se ha estudiado la influencia del orden de adición de los reactivos sobre la sensibilidad de la reacción de Boedeker. Los reactivos ensayados: nitroprusiato sódico (SNP), Nitrato de zinc (Zn), sosa (NaOH), sulfitos (SO_3^-) y hexamina (Hx), el orden de adición y los resultados sobre la pendiente de la regresión de una experiencia dinámica de SO_3^- se muestran en la **Tabla 4**.

Los valores RGB se miden sobre imagen digital en condiciones de iluminación blanca.

Orden de adición	Sensibilidad de la reacción																								
<ol style="list-style-type: none"> 1. SNP + SO_3^- + NaOH + Zn 2. SNP + NaOH + Zn + SO_3^- 3. SNP + SO_3^- + NaOH + Zn + Hx 4. SNP + NaOH + Zn + SO_3^- + Hx 5. SNP + NaOH + SO_3^- + Zn + Hx 	<p style="text-align: center;">Pendientes</p> <table border="1" style="display: none;"> <caption>Data for Pendientes chart</caption> <thead> <tr> <th>Orden de adición</th> <th>R (blue)</th> <th>G (red)</th> <th>B (green)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>-0.1</td> <td>-0.75</td> <td>-0.2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>-0.15</td> <td>-0.8</td> <td>-0.25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>-0.55</td> <td>-0.85</td> <td>-0.3</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>-0.5</td> <td>-0.9</td> <td>-0.45</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>-0.5</td> <td>-0.75</td> <td>-0.2</td> </tr> </tbody> </table>	Orden de adición	R (blue)	G (red)	B (green)	1	-0.1	-0.75	-0.2	2	-0.15	-0.8	-0.25	3	-0.55	-0.85	-0.3	4	-0.5	-0.9	-0.45	5	-0.5	-0.75	-0.2
Orden de adición	R (blue)	G (red)	B (green)																						
1	-0.1	-0.75	-0.2																						
2	-0.15	-0.8	-0.25																						
3	-0.55	-0.85	-0.3																						
4	-0.5	-0.9	-0.45																						
5	-0.5	-0.75	-0.2																						

Tabla 4

Influencia del orden de adición de reactivos sobre la pendiente de regresión obtenida para valores de: blanco, 9.0- 87.0- 140.0 mg/L de SO_3^- .

Los resultados demuestran una mayor sensibilidad según el cuarto orden de adición. Lo cual estaría de acuerdo en los modelos de la reacción.

1.4.- Reactividad con micro-partículas: 'mps'

Se conoce la influencia de la precipitación del SNP con Zn(II) sobre la sensibilidad de la reacción. En este apartado se ha estudiado su efecto sobre las medidas digitales. Así mismo se ha evaluado la

influencia de la obtención, de modo previo, de un precipitado entre SNP y Zn(II), con características de 'mps'.

En la **tabla 5** se dan los resultados sobre la sensibilidad de la reacción de Boedeker (RBoe) expresada por la pendiente de una experiencia de rango dinámico. Las condiciones para la medida digital de RGB son con iluminación blanca.

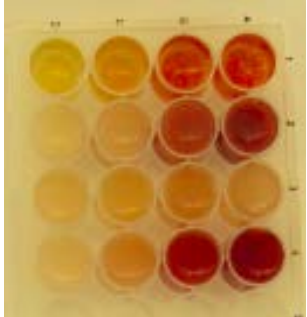
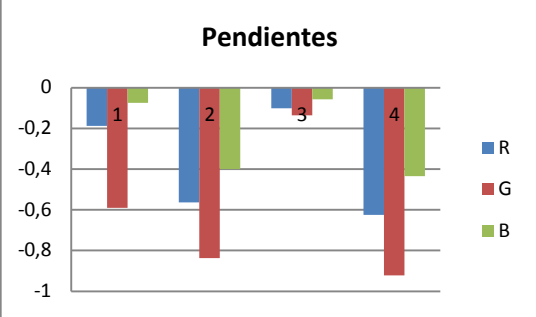
Tipo de experimento.	Imagen digital Rango dinámico de SO ₃ ²⁻ : blanco, 9.0-87.0-140.0 mg/l	Comparación con Diagrama de barras de las pendientes
1. RBoe sin Hx 2. RBoe + Hx 3. RBoe'mps' sin amina. 4. RBoe'mps' +Hx		

Tabla 5: condiciones y resultados de la influencia de micro-partículas

Se demuestra que las mayores pendientes se obtienen en el ensayo RBoe con amina-Hx y mediante el uso de 'mps'.

Se destaca también que las 'mps' sin Hx (3) no dan reacción y apenas desarrollan color.

El experimento pone de manifiesto que la sensibilidad del método aumenta con 'mps' y Hx.

1.5.- Caracterización de micro-partículas.

Se ha llevado a cabo un estudio de las partículas Zn-SNP mediante espectroscopia IR medio, y Microscopia de barrido Electrónico-SEM. Los resultados se muestran en el **anexo 1**.

El espectro IR, sobre pastilla de KBr, demuestra diferencias significativas entre el nitroprusiato y las micro-partículas. Y los datos concuerdan con resultados vistos en la bibliografía. De modo que se concluye que se ha obtenido un nuevo tipo de partícula.

En las imágenes de SEM, a dos valores de aumentos, se muestra la aparición de un número abundante de pequeñas partículas. Sus dimensiones estarían en el orden de las 400 nm. Y también se puede observar como su agrupación da clústers de mayor tamaño y estructura cúbica, hueca. Su lado mide en el orden de 5.5 μm.

Las micro-partículas se han podido precipitar mediante dos métodos: i- gota a gota con agitación mecánica y ii-gota a gota con agitación de ultra-sonidos. En ambos casos se apreciaba una gran similitud de resultados. Lo cual concuerda con lo visto en la bibliografía para partículas parecidas.

1.6.- Influencia de tensoactivos

Se ha estudiado la influencia de tensoactivos, como efecto de formación de micelas y ordenamiento de la reacción, sobre el desarrollo de la cromaticidad. Se han estudiado dos tensoactivos neutros: Tritón X-100 y Brij sobre la sensibilidad una experiencia de rango dinámico. Los resultados han mostrado influencia del Tritón X 100 pero apenas del Brij. Se muestran en la **tabla 6**.

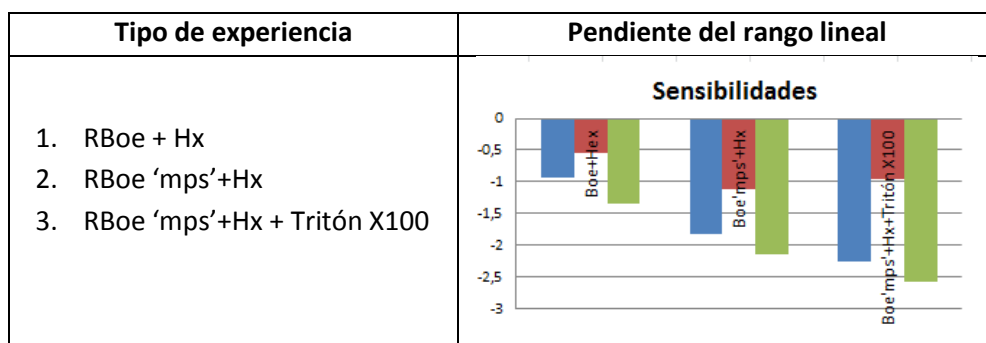


Tabla 6.
Comparación de Pendientes del rango lineal de la experiencia

Se demuestra que la sensibilidad de la pendiente de la zona lineal aumenta con el uso de Tritón X-100 respecto a las experiencias sin tensoactivo. Y además el rango lineal se ve expandido en relación a las otras.

2.-INFLUENCIA DE FACTORES INSTRUMENTALES

Se ha llevado a cabo un estudio de la influencia de:

- Las características de la **cámara**:
 - El número de pixeles.
 - Tipo de cámara y formato digital de la imagen:
 - Cámaras: compacta, web-cam, móvil y réflex, con formatos 'jpg' las tres primeras y 'raw' sin procesar, para la última.

2.1.-Cámaras, web-cam y móvil

Se ha estudiado la influencia del tipo de cámara sobre la varianza cromática que los dispositivos capturan. Los dispositivos son: cámara compacta, web-cam y móvil.

El número de pixeles es de 150 y el estudio se realiza con cubetas espectrofotométricas como soporte de la reacción.

La máxima cromaticidad sobre las tres componentes RGB se consigue con la web-cam, seguida de la cámara compacta y por último el móvil. Los datos se dan en la **tabla 7**.

Web-cam	Cámara	Móvil
Varianza total → 8930.39 <ul style="list-style-type: none"> • Analito → 98.76% • Cámara → 0.68% • Método → 0.55% 	Varianza total → 5799.26 <ul style="list-style-type: none"> • Analito → 97.78% • Cámara → 0.84% • Método → 1.39% 	Varianza total → 1724.49 <ul style="list-style-type: none"> • Analito → 97.12% • Cámara → 1.19% • Método → 1.68%
Tabla 7. Varianza cromática para un experimento de rango dinámico, y método RBoe, con distintos dispositivos.		

2.2.- Formato de la imagen digital: jpg y raw

Se hace un estudio con cámara réflex, y formato raw, y se compara con una cámara compacta Canon, y formato jpg.

Se calculan las sensibilidades RGB, la varianza total del sistema y la distribución de éstas, para una experiencia de rango dinámico con método RBoe. Los resultados se muestran gráficamente:

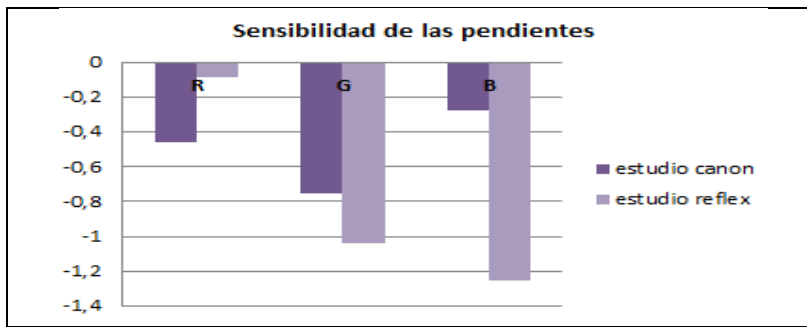


Figura 8
Pendientes de la regresión según la cámara y el color reflejado.

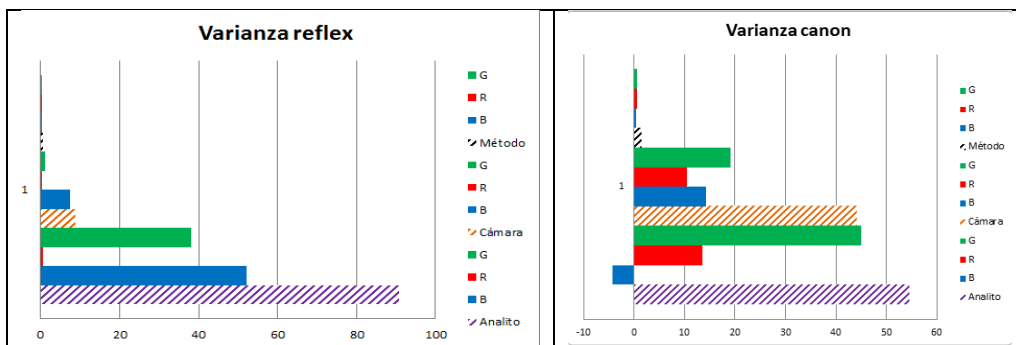


Figura 9
Comparación de la varianza cromática de las cámaras y de su distribución

El estudio de las pendientes demuestra que las componentes GB crecen considerablemente al pasar a la cámara réflex. Esta además tiene mayor número de píxeles. Mientras que la componente R disminuye.

La evaluación de la varianza cromática pone de manifiesto que la cámara réflex captura un mayor valor 7345.45 mientras que la varianza de la cámara canon es de 2337.52. Además la varianza en la cámara reflex corresponde prácticamente enteramente al analito.

2.3.-Número de píxeles

Se ha evaluado la influencia de la Región de interés, ROI, y el número de píxeles en la lectura de la medida cromática, sobre la varianza cromática. Los resultados se muestran en la **figura 10**.

Gráficamente se observa:

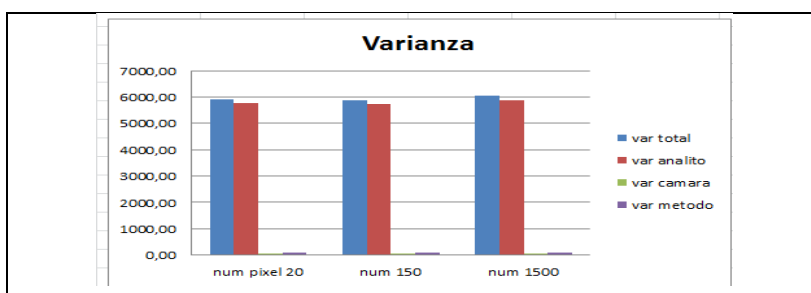


Figura 10:
Comparación de la varianza cromática según el número de píxeles en la medida del color digital.

El resultado muestra que aunque el número de píxeles se modifique abruptamente el cambio de la varianza es pequeño. No obstante las varianzas aumentan al aumentar los píxeles. Tras esto todos los estudios posteriores se realizan con n=1500.

2.4.- Análisis factorial.

Para estudiar la influencia de distintos factores sobre la cromaticidad se ha aplicado un modelo de análisis factorial sobre la varianza cromática.

El estudio se realiza mediante un diseño de experimentos de: 8 variables a dos niveles, y una respuesta: varianza cromática. Es decir, se evalúa un modelo lineal de ajuste y los coeficientes de regresión. Se aplica un programa desarrollado por nosotros. Las variables de estudio son: op (pocillos en sistema abierto), cp (pocillos en sistema cerrado), oplat (placas de ensayo en sistema abierto), cplat (placas de ensayo en sistema cerrado), y las distintas iluminaciones 'w', 'r', 'g', 'b'.

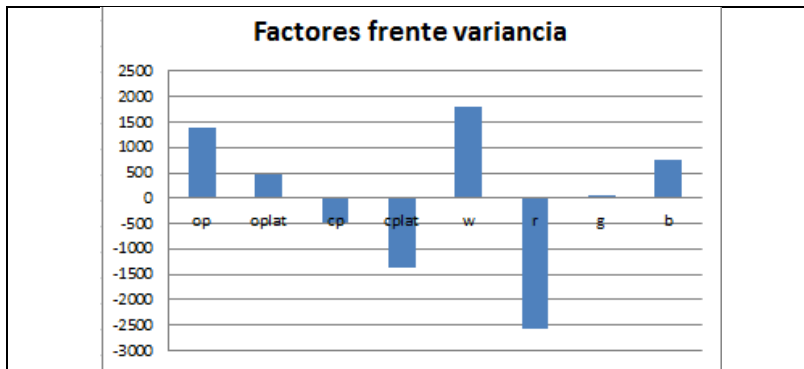


Figura 11:

Coeficientes de regresión para el análisis de los factores sobre la varianza cromática total, en un diseño de experimentos: 8 variables -2 niveles.

La varianza cromática permite evaluar la influencia de las distintas variables. Los resultados muestran como el uso de pocillos y la iluminación con luz blanca afectan positivamente a la varianza. Por otro lado el uso de iluminación roja, r, o el uso de placa de toques reducen la varianza.

Es importante destacar que la lectura en sistema abierto, 'op' favorece la varianza. Este resultado parece contraproducente pero es justificado por una mayor influencia de la radiación parasita.

2.5.- Iluminación.

Como complemento del estudio anterior, y dada la gran influencia de la iluminación se ha profundizado en esta variable. Se ha estudiado la influencia del tipo/color de iluminación en los valores de las intensidades de los colores 'rgb'. Por ello se lleva a cabo una misma experiencia pero iluminando con cuatro lámparas de distintos colores.

Se capturan las imágenes de una experiencia de rango dinámico (hasta 160mg/l de SO_3^-), en las condiciones de sistema cerrado, fondo blanco y modo automático sin flash con la cámara Canon.

Los resultados se presentan en la tabla y figuras siguientes. Se muestran los perfiles de cromaticidad y la influencia de los colores reflejados, RGB, reconocidos mediante un proceso de transformación a variables principales, o PC's.

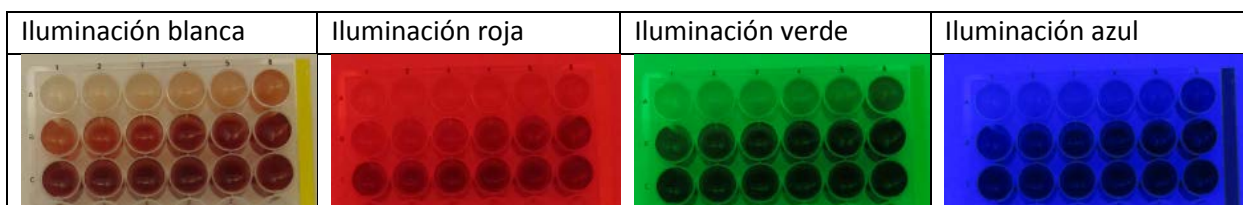


Figura 12. Rango dinámico de SO_3^- con diferentes iluminaciones 'w', 'r', 'g', 'b'.

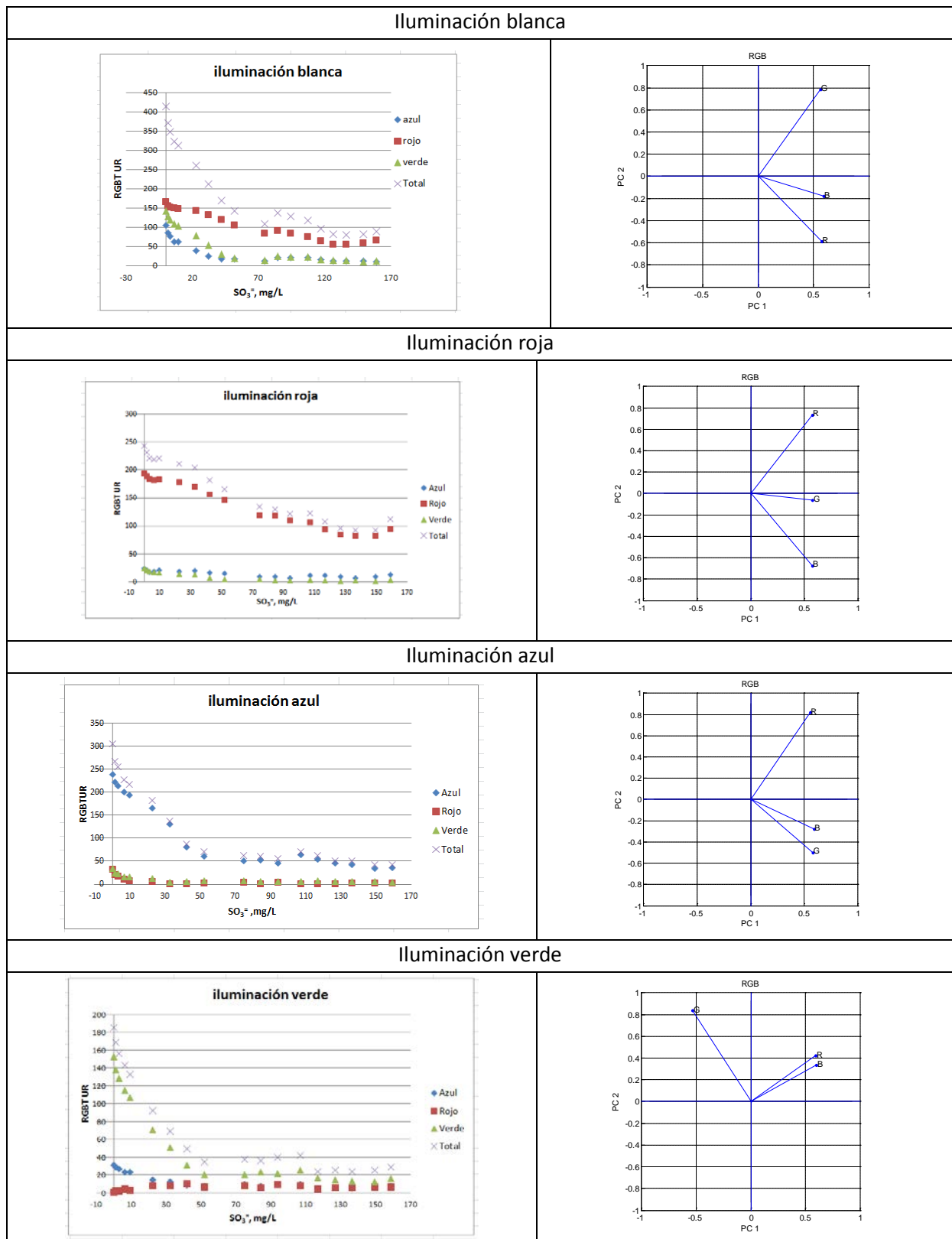


Tabla 8: Imágenes de las experiencias con diferentes iluminaciones. Representación PC's

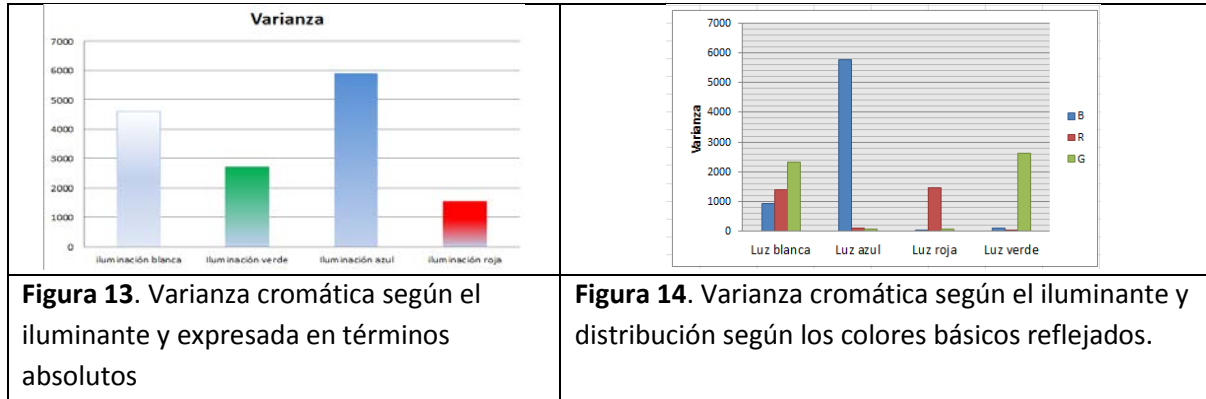
Los resultados mostrados permiten deducir las tendencias de las variables RGB y las influencias de la iluminación. Como idea general el iluminante favorece la reflexión en su color.

- Se pone de manifiesto en las gráficas de PC's que con luz blanca se distinguen los tres colores. Se ha podido demostrar que el color verde es el que más contribuye (53.33%)

- Con la iluminación verde se distinguen solo dos componentes, mientras que con iluminación roja y azul, se distinguen tres..

Según el estudio de componentes principales, las variables RGB, podrían reducirse a solo dos PC's, de modo que con solo dos de ellos se interpreta, prácticamente el 99.7-99.9% de la variación inicial de los datos, o cromaticidad del sistema.

En las siguientes Figuras se compara la varianza cromática según la iluminación:



3. CARACTERIZACIÓN QUIMIOMÉTRICA

3.1.- Varianza cromática

La varianza cromática representa el espacio de color de un experimento de cromaticidad digital. Su cálculo se obtiene de la matriz de varianza-covarianza de los colores obtenidos en un experimento de rango dinámico RBoe, tipo. Además la reducción de las variables cromáticas mediante Análisis de Componentes Principales, permite reconocer las tendencias latentes-intrínsecas del sistema cromático, y también la significación de las variables, a través de su representación vectorial.

Los resultados se ofrecen en la **tabla 9**:

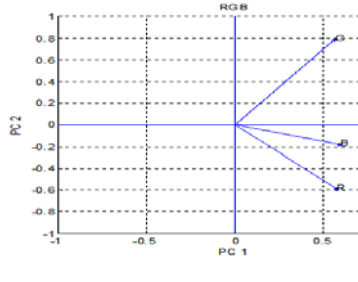
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Matriz varianza-covarianza</th> </tr> <tr> <th>B</th> <th>R</th> <th>G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>934.41</td> <td>1393.64</td> <td>2312.02</td> </tr> </tbody> </table>	Matriz varianza-covarianza			B	R	G	934.41	1393.64	2312.02	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">New component</th> <th rowspan="2">Eigenvalue</th> <th rowspan="2">% Explained variance</th> <th rowspan="2">% Acumulated Variance</th> <th colspan="3">Loadings of initial color variables</th> </tr> <tr> <th>B</th> <th>R</th> <th>G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PC 1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>2.83</td> <td>94.18</td> <td>94.18</td> <td>0.58</td> <td>0.59</td> <td>-0.57</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.16</td> <td>99.60</td> <td>99.60</td> <td>0.56</td> <td>0.79</td> <td>-0.24</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>100.00</td> <td>100.00</td> <td>0.59</td> <td>0.18</td> <td>0.79</td> </tr> </tbody> </table>	New component	Eigenvalue	% Explained variance	% Acumulated Variance	Loadings of initial color variables			B	R	G	PC 1							1	2.83	94.18	94.18	0.58	0.59	-0.57	2	0.16	99.60	99.60	0.56	0.79	-0.24	3	0.01	100.00	100.00	0.59	0.18	0.79	
Matriz varianza-covarianza																																																	
B	R	G																																															
934.41	1393.64	2312.02																																															
New component	Eigenvalue	% Explained variance	% Acumulated Variance	Loadings of initial color variables																																													
				B	R	G																																											
PC 1																																																	
1	2.83	94.18	94.18	0.58	0.59	-0.57																																											
2	0.16	99.60	99.60	0.56	0.79	-0.24																																											
3	0.01	100.00	100.00	0.59	0.18	0.79																																											

Tabla 9. Varianza cromática del experimento RBoe, y su reducción a PC's.

Los resultados obtenidos demuestran que:

- La matriz de covarianza-varianza, señala al color G como el de mayor varianza cromática del sistema, y por tanto, presenta una gran potencialidad en su sensibilidad analítica.
- La varianza del sistema se proyecta hasta el 99,6% en solo dos componentes principales, siendo el más significativo el PC1 con un 94.18%.
- El PC1 está correlacionado con las tres componentes, mientras que el PC2 está muy correlacionado G.

- Las tendencias-informaciones de los colores RGB son distintas con matices. Los colores B y G presentan una clara proximidad y por tanto una mayor similitud en su información. El componente T (Total), se muestra más influido por la información de G.

3.2.- Fuentes de la varianza cromática

La varianza cromática total en este experimento puede ser atribuida a tres fuentes principales:

- El analito que produce la variación de color, SO_3^- .
- La cámara o efecto instrumental.
- El método analítico.

Es decir:
$$S_{tot}^2 = S_{cámara}^2 + S_{método}^2 + S_{SO_3^-}^2 =$$

En la **Figura 15** se identifican los componentes de la varianza sobre la imagen de un experimento RBoe:

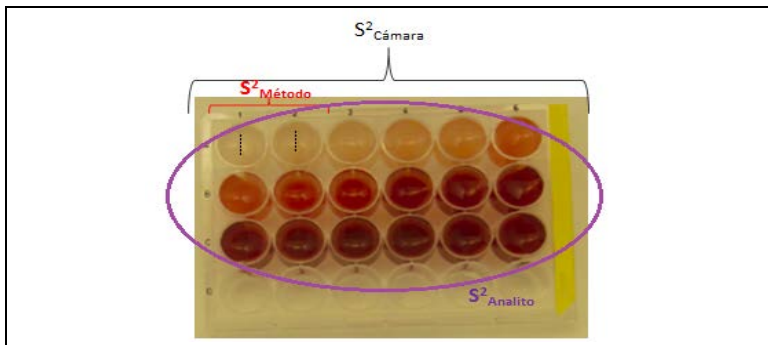


Figura15.

Experimento RBoe para un rango dinámico amplio. Con iluminación 'w'.

En la **figura 16** se ofrecen los resultados de la distribución de la varianza

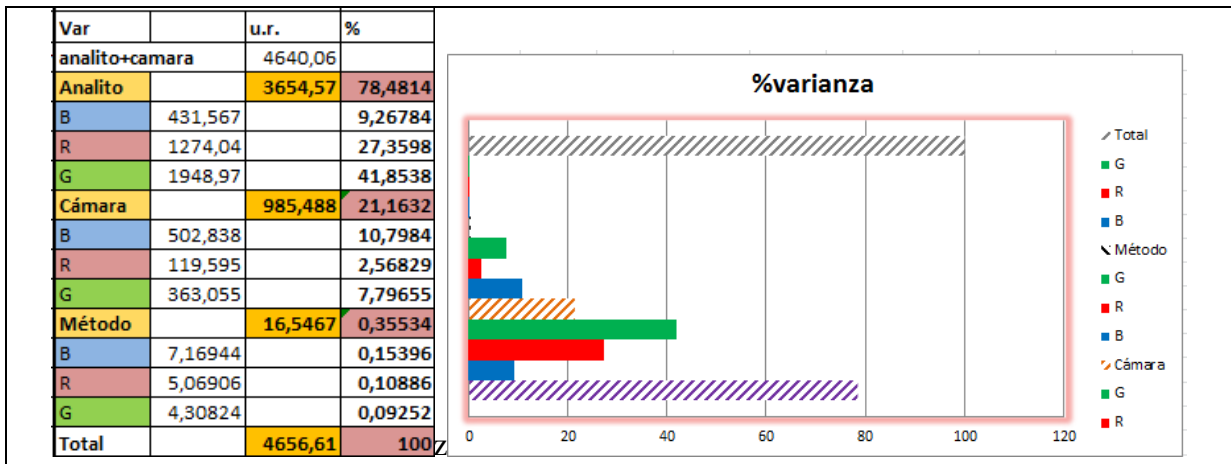


Figura 16. Diagrama de bloques de la participación de los componentes de la varianza cromática

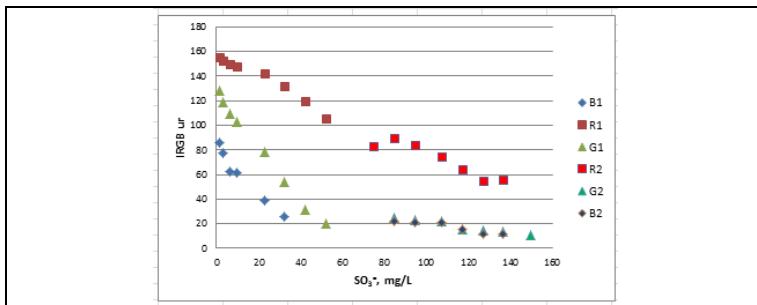
Es decir, según cálculos estadísticos se puede demostrar que el método DIC, incluso trabajando en condiciones muy simples en la captura y procesado de la imagen fotográfica, produce una varianza cromática significativa debida al analito: 78%. Y que en este sistema cromático es atribuida en su mayoría al color G. El resto de efectos influyen en menor medida.

4.- PRESTACIONES ANALÍTICAS Y CALIBRACIÓN

4.1.- Rango lineal y prestaciones analíticas para iluminación blanca.

Trabajando en las condiciones más favorables: cámara Canon, iluminación Blanca y captura en sistema cerrado-sin luz parásita, se ha caracterizado el rango lineal del sistema cromático. Los resultados se obtienen a partir de las experiencias de rango dinámico en las que se reduce

oportunamente el intervalo de ajuste. En la **Gráfica 1** se puede ver la tendencia que se resume en que los perfiles de los colores RGB disminuyen su luminosidad, siendo mucho más apreciable en el color G.



Gráfica 1. Rangos lineales para RGB con iluminación blanca (w)

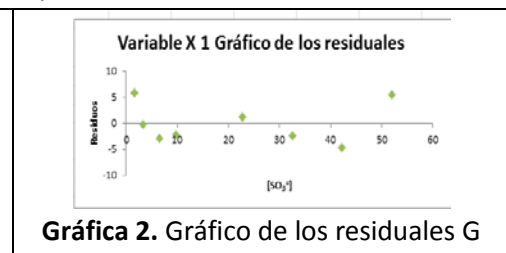
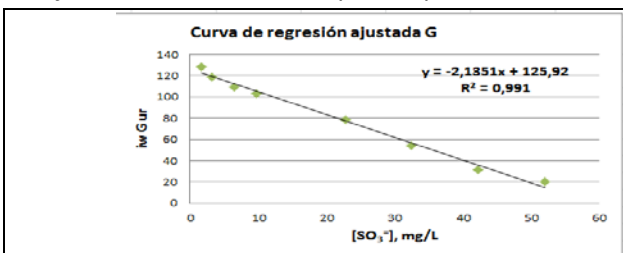
El ajuste detallado de las rectas y de los dos tramos lineales se muestra en la **tabla 10**.

Tramo lineal		Rango [SO ₃ ⁼]ppm	recta	R ²
Primero	R	1.6-52	y=-1.12x+154.63	0.991
Segundo		74-136	y=-0.59x+134.92	0.874
Primero	G	1.6-52	y=-2.14x+125.92	0.991
Segundo		84-150	y=-0.23x+44.43	0.942
Primero	B	1.6-32	y=-1.82x+81.96	0.953
Segundo		84-136	y=-0.22x+41.71	0.871

Tabla10. Estudio detallado de los dos tramos lineales

Como se observa en la luz blanca se consiguen dos tramos lineales para cada componente.

La componente verde consigue una mayor sensibilidad en el primer rango lineal y por lo tanto un mejor límite de detección, por lo que se estudiará la regresión para esta recta.



Gráfica 2. Gráfico de los residuales G

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,995
Coefficiente de determinación R^2	0,991
R^2 ajustado	0,989
Error típico (DSR)	4,218
Observaciones	8

Tabla 11. Ajuste estadístico para el color G

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11741,29	11741,29	659,89	2,294E-07
Residuos	6	106,76	17,79		
Total	7	11848,04			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada en el origen	125,92	2,32	54,35	120,26	131,59
Pendiente	-2,14	0,08	-25,69	-2,34	-1,93

La calidad de la regresión se verificó mediante el estudio estadístico de los residuos. Este estudio se muestra en la **Gráfica 2** y en **Tabla 11**.

Análisis de los residuales			
Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Residuos estándares
1	122,454	5,908	1,513
2	118,984	-0,229	-0,059
3	112,043	-2,894	-0,741
4	105,102	-2,279	-0,584
5	77,338	1,140	0,292
6	56,516	-2,360	-0,604
7	35,693	-4,698	-1,203
8	14,871	5,412	1,386

Tabla 12: Estudio estadístico de los residuos para G

De los resultados anteriores se deduce que:

- Sensibilidad, como la pendiente de la recta: -2,1351 ur· l/mg
- Sensibilidad analítica, definida como 'sensibilidad/error típico', es -0,506 l/mg
- Límite Máximo de Linealidad , LML: 52,013 mg/l
- Desviación estándar del método, como error típico: 4,218 ur
- Límite de detección, LD: 3,601mg/l, calculado como: LD= (3·x G_{blanco})/pdte recta.
- Límite de cuantificación ,LQ: 12,00 mg/l, como: LQ=10·LD/3
- Intervalo lineal de la regresión; 1,9-52,013 mg/l

Primer tramo lineal	Iluminación Blanca		
	R	G	B
Sensibilidad (ur·l/mg)	-1,12	-2,14	-1,82
LML (mg/l)	52	52	32
Desviación estándar (ur)	3,63	4,22	5,55
LD (mg/l)	6,31	3,59	9,29
LC (mg/l)	21,03	11,96	30,96
Intervalo lineal (mg/l)	1.6-52	1.6-52	1.6-32

Se comprueba que el color G, destaca por su mayor sensibilidad y menor LD.

4.2.- Calibración por regresión lineal múltiple-MLR-

Con la calibración múltiple se consigue incluir más de una variable predictorica para tener en cuenta la presencia de distintas fuentes de varianza. Este estudio se realiza por Matlab y un programa creado por nosotros.

En nuestros estudios se concluye que las variables que más afectan a la determinación de sulfitos son la componente roja con iluminación roja (Rr), la componente verde con iluminación verde (Gg) y la componente azul con iluminación azul (Bb). Realizamos la MLR con estos factores.

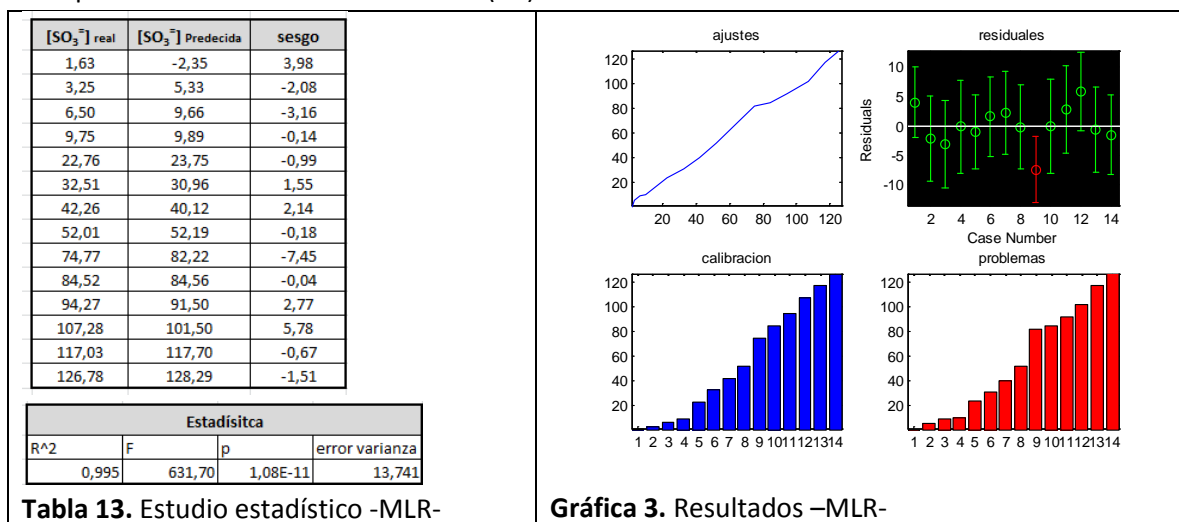


Tabla 13. Estudio estadístico -MLR-

Gráfica 3. Resultados -MLR-

Recta: $y = 228.43 + 0.337Bb - 1.28Rr - 0.45Gg$; siendo $Y = \text{mg/l Sulfitos}$

En la MLR se estudia todo el rango dinámico.

5.- APLICACIÓN DEL MÉTODO. DETERMINACIÓN DE sulfito EN MUESTRAS REALES

5.1 .-Determinación de sulfitos en vino

En este capítulo se presentan los estudios llevados a cabo en la aplicación del método DIC a la determinación de Sulfito en muestras reales, así como su evaluación estadística.

La muestra analizada fue vino blanco Valssira: IGP Vino Bajo Aragón.

5.2 .-Tratamiento de la muestra

En nuestro ensayo la muestra se somete directamente a la reacción de Boedeker optimizada.

Los estudios han demostrado que el método RBoe sin 'mps' es más sensible cuando se aplica directamente sobre la muestra. Se justifica por la influencia de la matriz alcohólica.

5.3 .-Resultados

Se lleva a cabo una medida directa de la muestra. Se toman 6 réplicas-alícuotas, de 600 μl cada una. Y Se mide sus colores reflejados en las condiciones RBoe óptimas sin 'mps'.

En la siguiente tabla se muestran, los mejores resultados obtenidos por interpolación en la regresión con MLR.

		[vino] mg/l ic	
luz blanca	MLR	158,4	13,35

Tabla 14.

Contenido medio de sulfitos tras el análisis de 6 réplicas, mediante RBoe, e interpolación en MLR

5.4.- Validación

Se aplica un método de contraste con una determinación basado en el procedimiento oficial: Método de Paul.

5.4.1.- Método Oficial

La determinación por el método de Paul se realiza sobre una alícuota de muestra de 40mL. El método permite calcular los SO_3^- libres y asociados. El método supone la destilación del SO_2 y su recogida con borboteo sobre una disolución de H_2O_2 que oxida el sulfito a sulfato. Posteriormente este se valora con una disolución de NaOH patrón y con indicador de naranja de metilo, el cambio de color es de rojo a naranja-amarillo, el pH de viraje es de 3-4.

Previamente diversos experimentos se han realizado sobre disoluciones patrón de sulfitos para evaluar el procedimiento.

Método oficial	M_{NaOH} , mol/L	SO_3^- , ppm
SO_3^- libres	0,0107	28,53
SO_3^- Asociados	0,0107	149,8
SO_3^- total		178,33.

Tabla 15:

contenido de sulfitos, como mg/l en el vino blanco.

Los resultados dan un contenido que está de acuerdo con los valores que describe la bibliografía para vinos blancos.

Comparación estadística mediante el test t.

Se comparan estadísticamente los resultados frente a los obtenidos por la interpolación en la regresión MLR. Se toma como valor de t, para 6-1 grados de libertad y nivel de confianza del 99 %.

	[Muestra]	s	ic (99%)
MLR	158,38	12,71	20,92
$t_{exp} = (\mu - X_m) \cdot s / \sqrt{n}$	3,85	t_{tab}	4,03
Resultado	$t_{exp} < t_{tab}$		

Tabla 16. Resultados de t_{exp}

Los resultados demuestran que estadísticamente al nivel de confianza las diferencias se justifican por procesos aleatorios, no habiendo errores sistemáticos.

5.3.2.- Ensayos de recuperación

En este caso se adiciona una cantidad conocida de $SO_3^{=}$ a la alícuota de 40mL de muestra. Y se procede a su análisis mediante el método RBoe. Los mejores resultados se obtienen mediante interpolación sobre la recta de regresión con iluminación w y color reflejado R. Los datos se recogen en la **tabla17**. El ensayo de recuperación por MLR muestra un valor de 136.59%, un error por exceso que se puede justificar por la fuente de varianza de las diferentes iluminaciones.

		[encontrada]	[adicionada _{real}]	%recuperación
luz blanca	R	135,36	138,10	98,02

Tabla 17. Resultados del ensayo de recuperación

El mejor ensayo de recuperación demuestra una discrepancia inferior al 2%, sobre los valores esperados. Lo que se argumenta como un alto nivel de calidad en el nuevo método RBoe.

Capítulo IV: Conclusiones y Bibliografía

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

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de $SO_3^{=}$ mediante una cámara digital compacta.
- Se ha caracterizado el comportamiento cromático de la reacción de Boedeker en condiciones óptimas y mediante colores básicos RGB en un rango dinámico de 0-130 mg/l.
- Se comprueba que con la adición de micro-partículas mejoramos la sensibilidad y el límite de detección,
- Se ha estudiado la varianza cromática del método demostrando que es justificada en un 78.5% por el analito. Mientras que la cámara influye en un 21.16% y el método en un 0,35%
- El método se ha aplicado y validado en su determinación de sulfito en vino.
- Con todo ello, se ha puesto a punto un método rápido y eficaz, para la determinación de sulfitos que posibilita el control de calidad de manera eficiente a bajo coste.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ A. López Molinero, et al, *Talanta*, (2013, 103, 236–244)
- ² A. López Molinero, et al, *Microchem J* (2010, 96, 380-385)
- ³ M. Eriksson, *Sensors and Actuators B* (2013, 185,354-362)
- ⁴ E. da Nobrega, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006, 570, 283-290)
- ⁵ M. Kompany-Zareh, *Anal. Chim. Acta* (2004, 521, 231-236)
- ⁶ Y. Suzuki, *Anal. Sci*, (2006, 22, 411)
- ⁷ W.Li,et al, *Anal. Methods*. (2016, 8, 2887-2894)
- ⁸ W. S. Lyra, et al, *Anal. Methods*,(2011,3,1975-1979).
- ⁹ D. Liñán, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2006)
- ¹⁰ M.A. Gómez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2009)
- ¹¹ J. Jiménez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias (2009)
- ¹² M. Pérez , Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2014)
- ¹³ P. Berlín, Trabajo fin de Grado, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2015)
- ¹⁴ J.S. Cosano, et al , *Anal. Quim.*, (1995, 302, 269-274).
- ¹⁵ F. Camacho, et al, *Anal. Quim.*, (1984, 80,295-301).
- ¹⁶ F. Burriel, et al. , *Química Analítica Cualitativa*, Ed. Paraninfo, Madrid 1983.
- ¹⁷ <http://milksci.unizar.es/adit/conser.html>
- ¹⁸ REGLAMENTO UE, 1130/2011, 11 noviembre de 2011, Aditivos alimentarios.
- ¹⁹ R. E. Humphrey,et al,*Anal Chem.*,(1970, 42, 698-702).
- ²⁰ S.S.M. Hasan,et al, *Anal.chim.Acta*, (2006, 570, 232–239).
- ²¹ C Andrade et al., *Inorg. Chem.*, (1972,11, 648- 650).
- ²² J.A. Nordlee,et al., *J. Allergy and Clinical Immunology*, (1988, 81, 537-542).
- ²³ Método oficial de análisis de vino: BOE-A-1988-11256.
- ²⁴ Norma UNE-EN, 1988-1-2000. Métodos alimentarios. Determinación de sulfitos. Parte 1- Método Monier-Williams optimizado.
- ²⁵ Official Methods of Analysis of AOAC, 16th ed. P. Cunniff, AOAC International, Gaithersburg, MD, AOAC. 1995a , Vol. 2, Ch. 47, Official Method 990.28, Section 47.3.43.