



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

KIMIKA FAKULTATEA  
FACULTAD DE QUÍMICA

# Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Química/Kimika Fakultatea

## *Kimikako Gradua*

GRADU AMAIERAKO LANA

Paper euskarriaren diseinua eta optimizazioa irudi digitalean oinarrituta

**Egilea:** Maddi Amondarain Gaztañaga

**Zuzendariak:** Ane Bordagaray Eizagirre eta Miren Ostra Beldarrain

Donostia, 2020ko uztaila

GIPUZKOAKO CAMPUSA  
CAMPUS DE GIPUZKOA  
Pº. Manuel de Lardizabal, 3  
20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN  
GIPUZKOA



# AURKIBIDEA

---

LABURPENA .....	5
ABSTRACT .....	6
1. SARRERA .....	7
1.1 Koloratzaileak elikagaietan.....	7
1.1.1 Allura Gorria (E-129).....	11
1.1.2 Toxikologia .....	12
1.2 Irudi digitalen analisia .....	13
1.3 Paper euskarri bidezko analisia (PAD).....	18
3. HELBURUAK .....	21
4. ATAL ESPERIMENTALA .....	22
4.1 Erreaktiboak eta materialak.....	22
4.2 Ekipoak eta Softwareak.....	22
4.3 Paperaren prestaketa .....	22
4.3.1 Permanentearen tamaina eta kolorea .....	23
4.3.2 Borobilaren diametroa .....	23
4.3.3 Bolumena .....	23
4.3.4 Denbora.....	23
4.4 Paperaren euskarria .....	23
4.5 Kolore-patroia .....	24
4.6. SCRIPT-a paperean.....	24
5. EMAITZAK ETA EZTABAIDAK .....	28
5.1 Permanentearen tamaina eta kolorea .....	28
5.2 Borobilaren diametroa.....	31

5.3 Bolumena.....	34
5.4. Denbora.....	37
5.5. Etorkizunera begira.....	41
6. ONDORIOAK.....	44
6. CONCLUSIONS .....	45
7. BIBLIOGRAFIA.....	46

# LABURPENA

---

Elikadura-koloratzaileak elikadura industrian geroz eta gehiago erabiltzen diren gehigarriak dira. Baina hauen erabilera mugatua dago haurren osasunean izan ditzakeen eraginengatik. Horien artean Allura gorria (E-129) dago, azken urte hauetan aztertua izan dena. Hori dela eta, elikagaietan dagoen koloratzaile kantitatea determinatzea beharrezkoa da.

Lan honetan, paper euskarri bidezko analisisian oinarritutako metodo berri bat bilatu da. Jarraian, diseinu experimentalaren bidez optimizazioa egin da, non 4 parametro optimizatu diren, permanentearen tamaina eta kolorea, zirkunferentziaren diametroa, borobilerara botatako disoluzioaren bolumena eta argazkiak hartzeko denbora. Paper euskarri bidezko analisisia aztertzen den lehenengoa aldia denez, script berri bat garatu da argazkiak prozesatzeko eta datuak lortu ahal izateko.

Bukatzeko, ezin izan da metodo berri hau balidatu alarma egoeraren ondorioz lan experimentalaren etetea dela eta.

# ABSTRACT

---

Food dyes are increasingly used additives in the food industry, but its use is limited by the effects they can have on children's health. Among them we can find the Allure Red (E-129), that has been studied in recent years. Therefore, it is necessary to determine the amount of colorant in the food.

In this work, a new method based on paper-based analysis has been used. Subsequently, the optimization was carried out using the experimental design, where four parameters were optimized, the size and colour of the permanent, the diameter of the circumference, the volume of the solution that has been thrown around and the time of photographing. As it is the first time that these analysis has been analysed on paper, a new script has been developed to process the photographs and obtain data.

Finally, this new method could not be validated due to the interruption of the experimental work as a consequence of the alarm state.

# 1. SARRERA

---

## 1.1 KOLORATZAILEAK ELIKAGAIETAN

Elikadura-gehigarriak balore nutritiborik ez duten substantziak dira. Hauek kontserbazio eta elaborazio teknikak hobetzeko gehitu ohi dira, baita janarien eta edarien itxura hobetzeko ere, eta horrek kontsumitzaileentzat desiragarriagoak egiten ditu. Horregatik, elikagaien industriak elikagai gehigarriak (kontserbatzaileak, koloratzaileak..) erabiltzen ditu merkatuan eskuragarri dauden elikagai prozesatuetan edo edarietan.<sup>1</sup>

Jatorriaren aldetik, gehigarriak bi taldetan banatzen dira: <sup>2</sup>

- **Naturalak:** Berez gertatzen diren konposatuak edo iturri naturaletatik isolatutako gehigarriak
- **Sintetikoak:** prozesu industrial batetik lortzen diren konposatuak, petroliotik eratorritako sintesi kimiko gisa ezagutzen dena.

Aldiz, gehigarrien funtzioaren arabera, talde desberdinetan bana daitezke: <sup>2</sup>

- **Koloratzaileak:** Produktu bati kolorea ematea.
- **Kontserbatzaileak:** Elikagaien narriadura saihestea mikroorganismoen jardueraren ondorioz.
- **Antioxidatzaileak:** Elikagaiaren koipeak ez oxidatzea eta galtzea ekiditea.
- **Aromatizatzaileak:** Elikagaien usaina eta zaporea hobetzea.

- **Lodigarriak, egonkortzaileak, emulsionatzaileak:** Elikagaien testura eta konposizioa aldatzea.
- **Azidotasunaren erregulatzaileak:** Elikagaien azidotasun-maila erregulatzea, edo produktuaren zaporea aldatzea.
- **Zaporea areagotzeko agenteak:** Elikagaiaren zaporearen pertzepzioa areagotzea.
- **Edukoratzaileak:** Elikagaiei zapore gozoagoa ematea.
- **Almidoi modifikatzaileak:** Berez nahastea lortuko ez luketen bi elikagai mota edo gehiago elkartuta edukitzea.
- **Entzimen prestakinak:** Elikagaietan erreakzio biokimikoak sortzea, horretarako substantzia kimikoak erabili beharko liratekeen prozedurak ordeztzeko.

Elikaduran erabiltzen diren gehigarriek "E-" kode batez izendatzen dira, 1. taulan ikus daitekeen bezala, eta E kode honek gehigarrien segurtasuna bermatzen du. Izan ere, kantitate batetik aurrera osasunean kalteak sor ditzakete eta horregatik segurtasun kontrolak pasa behar izaten dituzte. Horretaz gain, E kode hau, Europar Batasun osoan erabiltzen den kode normalizatua da.<sup>3</sup>



1. Taula. Elikadura-gehigarriak E zenbakiaren bidez sailkatuak.

E KODEA	FUNTZIOA
100-199	Koloratzaileak
200-299	Kontserbatzaileak
300-399	Antioxidatzaileak eta azidotasunaren erregulatzaileak
400-499	Egonkortzaileak
500-599	pH eta azidotasunaren erregulatzaileak
600-699	Zaporea indartzaileak
700-799	Antibiotikoak
900-999	Edulkoratzaileak, gasifikatzaileak...
1100-1599	Beste batzuk

1. Taulan ikus dezakegun bezala, koloratzaileen E kodea 100 eta 199 tartean dago. Koloratzaileak, beste gehigarri motak bezala, bi taldetan bereizten dira: konposatu naturalak edo iturri naturaletik isolatutakoak, eta bestetik, konposatu kimiko sintetikoak.<sup>2,4</sup>

Garai batean, koloratzaileek jatorri naturala zuten eta soilik hiru kolore nagusi ezagutzen ziren: gorria (sustraietatik eta "Cochinilla" intsektu batetik), urdina (landare indigoferoetatik) eta horia (landareetatik). Baina kimikaren garapenarekin, koloratzaile artifizialak garatu ziren.

Gaur egun, koloratzaile artifizialak naturalak baino arrakastatsuagoak izan ohi dira. Izan ere, sintetiko sortutako koloratzaileek propietate hobeak dituzte. Esaterako, koloratzaile naturalak, koloreztatze ahalmen txikiagoa dute sintetikoek baino,

egonkortasun baxuagoa baitute; argia, tenperatura, pH eta oxigenoarekiko sentikortasun handiagoa dutelako.<sup>2</sup>

Koloratzaile artifizialen artean ere hainbat talde desberdinetan banatzen dira, koloratzaile azoikoak, trifenilmetano koloratzaileak, triarilmetano koloratzaileak, xantano koloratzaileak, indigotina koloratzaileak eta kinolina koloratzaileak.<sup>2</sup> Alde batetik, koloratzaile azoikoek egitura molekularrean funtzio kromoforoa duen azo taldea (-N=N-) dute. Allura gorria talde honetan dago.

Elikagaien koloratzaileei dagokienez, hauek ere E kode bat dute, kolorea eta substantzia deskribatzen dituztenak 2. Taulan ikus dezakegun bezala.

2. Taula. Elikagaien koloratzaileen E kodeen sailkapena koloreen arabera.

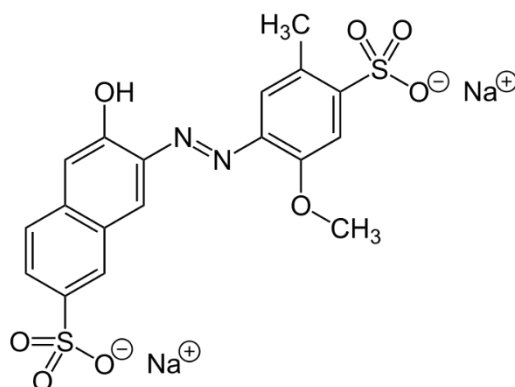
<b>E KODEA</b>	<b>KOLOREAK</b>
100-109	Horiak
110-119	Laranjak
120-129	Gorriak
130-139	Urdinak eta moreak
140-149	Berdeak
150-159	Marroiak eta beltzak
160-199	Kolore anitzak

2. taulari dagokionez, eta proiektu honetan deskribatuko den koloratzailea kontuan hartuta, Allura gorria (E-129) aurreko sailkapenarekin bat dator.

### 1.1.1 Allura Gorria (E-129)

Allura gorria kolore gorriko koloratzaile artifizial bat da, funtzio kromoforo bezala azo taldea duena. Bere IUPAC izena 2-hidroxi-1-(2-metoxi-5-metil-4-sulfonato-fenilazo)-naftaleno-6-sulfonato disodikoa da eta bere formula molekularra  $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$  da. Bere pisu molekularra 496,42 g/mol-ekoa da eta espektrofotometroan seinalea 506 nm-tan ematen du.

Allura gorria hauts gorri ilun moduan aurkezten da eta oso disolbagarria da uretan, 22g/100 mL, 25°C-tan, eta partzialki disolbagarria etanoletan.



a)



b)

1. irudia. Allura gorriaren a) egitura molekularra eta b) itxura

Batez ere, jogurtetan, gelatinetan, gozokietan, haragietan eta freskagarrietan erabiltzen da koloratzaile hau.

Azken urte hauetan aztertua izan da, osasunean eduki ditzakeen ondorio kaltegarrietatik, kantitate handian hartuta beti ere.

Osasunean eduki ditzakeen ondorioen artean: asma areagotzea, umeetan hiperaktibitatea, etab. Horregatik, ezinbestekoa da elikagaietan dagoen koloratzaile kantitatea determinatzea.<sup>2,5</sup>

### 1.1.2 Toxikologia

Koloratzaileak oso erabiliak dira gaur egun gozokietan, edarrietan... Kolore bizi horiek desira puntu hori sortzen die umeei. Baina hauen kontsumoa handia bada, ezinbestekoa da koloratzaile sintetiko hauek osasunean izan dezaketen eragina aztertzea.

Koloratzaile sintetikoak kimikoki sortuak dira, baina gehigarri hauek elikadura industrian erabili daitezkeen edo ez jakiteko, hainbat proba egiten zaizkie. Proba hauen bitartez, koloratzaileen segurtasuna, kalitatea, trinkotasuna eta indarra neurtzen da. Allura gorria eta urdin distiratsua dira horien artean elikagai industrian gehien erabiltzen diren koloratzaileak.

Beti aipatu izan da elikagaien koloratzaile sintetikoek eta beste elikagai-gehigarri mota batzuek eragina dutela haurren portaeran. Substantzia hauek AFCA (*Artificial Food Colors and food Additives*) ere deitzen dira. Konposatu hauek portaera hiperaktiboa, oldarkorra eta arduragabea eragin dezaketela ikertu zuten.<sup>6</sup>

Hala ere, horiek ez dira koloratzaile artifizialek sor ditzakeen arazo bakarrak. Azken ikerketek erakutsi dutenez, Allura gorriak arratoien eta saguen DNAn kalteak eragin ditzake. Ez hori bakarrik, urtikaria edo asma bezalako erreakzio alergikoak ere eragin ditzake, bereziki beste koloratzaile batzuekin nahasten denean. Honen ondorioz, elikadura-

koloratzaile azoikoen erabilera oso kontrolatua dago, beraien tinteak degradatzean sortzen diren produktuengatik.<sup>7-9</sup> Hori dela eta, koloratzaile sintetikoak dituzten edozein elikagaietan etiketan umeetan arazoak sor ditzaketela adierazi behar da.<sup>10</sup>

*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* eta *EU Scientific Committee for Food (SCF)* behin baino gehiagotan ebaluatu dituzte koloratzaileen Eguneroko Ahoratze Onargarria zehazteko (*Acceptable Daily Intake, ADI*). ADI baloreak eguneko koloratzaile mg-ak gorputz masa kg-ko adierazten dira, ikus 3. Taula.<sup>2</sup>

3. Taula. ADI balioak Allura gorriarentzat.

KOLORATZAILEA	ADI BALIOAK	
	mg/kg	mg/70 kg
Allura gorria	7	490

Horretaz gain, elikagai edo edari industriek kontuan hartu behar dute legeak ahalbidetzen duen koloratzaile kantitate maximoa zein den.<sup>11</sup>

## 1.2 IRUDI DIGITALEN ANALISIA

Gaur egun, teknologiaren garapenarekin, analisi-metodo berriak aurkitu behar dira, aplikatzeko errazak, ingurumenarekin lagunkoiak, errektibo eta lagin gutxi erabiltzen dituztenak eta emaitza fidagarriak dituztenak. Horregatik, gailu teknologiko txikien erabilera gero eta garrantzitsuagoa bihurtzen ari da, hala nola, irudi digitalen analisia.

Bereziki interesgarriak dira telefono mugikorrek eta tabletak, konektibitate-konbinazioa eta potentzia konputazionala duten argazkiak hartzeko gaitasuna direla eta. Horri esker, kontzeptu berriak garatu ahal izan dira.<sup>12-15</sup>

Analisi kimikoaren egungo eremuan, kolorearen erabilera, informazio kimikoa duen eta objektiboki neur daitekeen materiaren propietate optiko gisa, nagusiki bi domeinurekin lotuta dago: irudi-gailuen erabilera tresna analitiko gisa eta sistema analitiko azkarren garapena laborategitik kanpoko aplikazioetan erabiltzeko. Beraz, irudi-gailuen agerpenak, kolorearen propietateen analisiarekin konbinatuta, kolorea informazio kimikorako objektibatzea ahalbidetu du, eta horrek neurketaren zientziaren demokratizazioaren kontzeptua planteatzen du.

Analisi kimikoa egiteko beharrezkoak diren konputagailu bidezko ikusmen-sistemak, oso desberdinak izan daitezke, baina, oro har, oinarritzko osagai desberdinak izan daitezke: kolore-ezaugarriak aldatzen dituen gailu analitiko bat lagin batekin kontaktuan, irudi-gailu bat (kamera digitala, eskanerra, web-kamera, telefono adimenduna edo beste bat) konputagailu batera konektatuta, argiztapen-sistema bat eta softwarea bat.

Gailu analitiko baten irudia zenbakizko forma bihurtzeko, normalean analitoa/k dituen lagin batekin erreakzionatu ondoren, prozesu batek irudia pixel bidimentsional erregularreko lauki batean banatzen du, ondoren digitalki prozesatzen dena. Irudiak hartu ondoren, prozesatu eta aztertzeko bidali behar dira.<sup>12</sup>

Koloreen kuantifikazioa kolorimetriaren bidez egiten da, hau da, kolorearekin lotutako prozesuak aztertzen dituen zientziaren bidez, argi ikusgarriaren deskonposizioa, analisia eta deskribapena ahalbidetzen duten metodoen definizioaren bidez, kolorearen informazioa kuantifikatzeko, prozesatzeko eta hainbat helbururekin esparru zientifiko eta teknologiko askotan aztertzeko. Koloreak ikusmen-erperientzietan agertzen edo irudikatzen diren ezaugarriak dira, eta fisikoki definitutako ikusmen-estimulu baten kolorea zenbakitan kuantifikatu daiteke, hainbat kolore-metodo edo -espazio erabiliz.<sup>12,16</sup>

Koloreak kuantifikatu daitezke oinarrizko hiru koloreen kolorea zehazten duten hainbat metodo edo kolore-espazio erabiliz, giza kolorearen pertzepzioaren antzera. Young-Helmholtz-ek<sup>i</sup> kolorearen teoria trikromatikoari buruz adierazi zuen bezala,<sup>17</sup> edozein kolore osa daiteke behar bezala aukeratutako hiru kolore primario konbinatuz.

Beraz, kolore-espazio gehienek hiru osagaien irudikapena erabiltzen dute giza ikusmenaren sistema zehaztasunez deskribatzeko. Kolore-espazio horiek, bai eta haien arteko kolore-aldaketak ere, azken urteetan analisi kimikoan egindako ikerketarekin erlazionatzen dira.

Analisi kolorimetrikoa egiteko, duela gutxi espektrofotometroa ordezkatu duen teknika berria, kasu honetan, argazki-irudi digitalaren RGB balioak zehazten dira. RGB kolore-espazio ohikoena da gailuetan, giza ikusmen-sistemaren antzera funtzionatzen baitu, eta, horregatik,

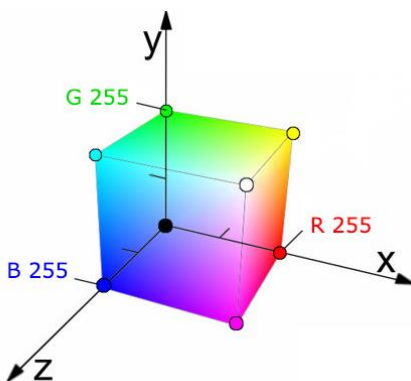
---

<sup>i</sup> Young-Helmholtzen teoria (Thomas Young eta Hermann von Helmholtzek XIX. mendean egindako lanean oinarritua), teoria trikromatiko bezala ere ezaguna, koloretako ikuspegi trikromatikoaren teoria bat da, ikusmen sistemak kolorearen esperientzia fenomenologikoa sortzeko duen modua.

beste espazio batzuen koordinatuak lortzeko hasierako kolore-espazio gisa erabiltzen da.

Izan ere, kolore- eta irudi-detektagailu gehienak RGB koordinatuetan informazioa emateko sortu eta diseinatu dira. RGBk gorria, berdea eta urdina esan nahi du,<sup>12,16,18,19</sup> espazio gehigarri honetan kolore bat erabat definitzeko erabiltzen diren kolorezko hiru osagaiak direnak.

Pixel bakoitzak 0 eta 255 arteko balioa du kanal bakoitzerako. RGB espazioa kubo bat bezala irudikatu daiteke, non ardatz bakoitza kanal bati dagokion (2. Irudia). Pixelak ardatz bakoitzean (R, G edo B) duen balioaren arabera, kolore bat edo bestea izango luke. Koordinatuak, kolore beltzetik [0, 0, 0] txurira [255, 255, 255] aldatzen dira.<sup>12,20</sup>



2. irudia. RGB espazioa kubo batean irudikatuta.

RGB koloreko espazioa asko erabili da soluzioak eta ibilgetutako substantziak kuantifikatzeko, irudien prozesamendu digitalaren bidez eta software espezifiko baten bidez. Software horrek informazio kolorimetrikoa ateratzeko aukera ematen du, irudi baten intereseko eremuak hautatuz.



RGB kolore-espazioaz gain, badaude beste batzuk, hala nola, HSV, nahiz eta erabiliena RGB balioak izan. Tonura orientatutako kolore-espazio honek kolore bat erabat deskribatzen du hiru osagai desberdinen bidez: tonua (H), saturazioa (S) eta balioa (V). Tonua, eskuarki, kolore baten espektro erradiazioaren uhin luzera nagusi bezala definitzen da. Saturazioak kolorearen garbitasuna definitzen du. Eta, azkenik, balioa, normalean distira bezala ere ezagutzen dena, deskribatutako kolorean dagoen argiaren intentsitatea da.<sup>21</sup>

Hortaz, substantzia horiek kuantifikatzeko lehenik eta behin argazkia bildu behar da. Horretarako, lehen aipatu bezala hainbat gailu mota daude: kamera digitala, eskanerra, web-kamera, telefono adimenduna, etab.

Eta behin argazkia dugularik, irudi digitalen analisia egiten da software baten bidez, kasu honetan *Matlab* programa baten bidez egin da. Software honek, irudiak tratatzeko aukera izan behar du, eta RGB balio hauen algoritmoa erabiliz lortuko dira guk nahi ditugun seinaleak, honako formulak erabiliz:<sup>12</sup>

$$A_R = -\log\left(\frac{R_s}{R_b}\right) \quad (1)$$

$$A_G = -\log\left(\frac{G_s}{G_b}\right) \quad (2)$$

$$A_B = -\log\left(\frac{B_s}{B_b}\right) \quad (3)$$

### 1.3 PAPER EUSKARRI BIDEZKO ANALISIA (PAD)

Paperean oinarritutako gailu analitiko mikrofluidikoak,  $\mu$ PAD edo PAD (*Paper-based analytical devices*) azkar garatu dira Whitesides taldeak 2007an proposatu zituenetik.

PADek, normalean, paperezko substratuen gainean modelatutako mikroegitura hidrofiliiko/hidrofoboan antolamendua barne hartzen du, eta bertan burutzen dira argizariaren inprimaketa, tinta ezabaezina gehitzea, eta abar bezalako teknikak.<sup>22-24</sup>

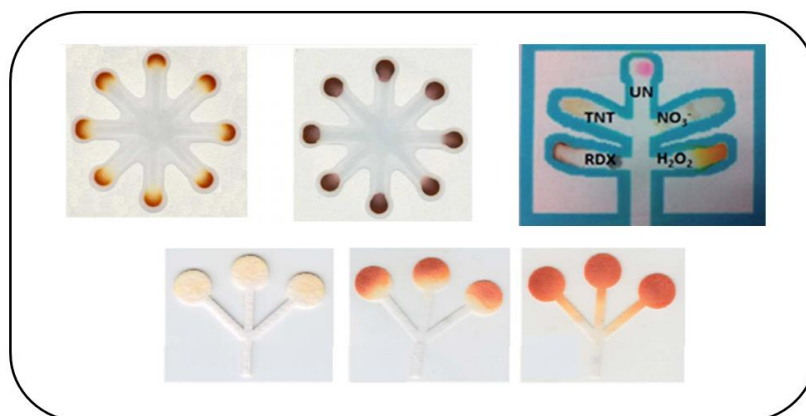
PADek arreta handia erakarri dute azken urteotan, tresna sinplea, fabrikazio-prozesu erraza, kostu txikikoa eta ingurumen-analisirako eta analisi biologikorako erabilerraza direlako. Lehen  $\mu$ PAD-ak diagnostiko medikoa egiteko bioentsegu gisa garatu zen, baina orain bakterioen, molekula organikoen, pestiziden eta metalen in situ analisisian eraginkor bihurtu da. Ondorioz, gero eta gehiago erabiltzen dira biomedikuntzako, ingurumeneko, analisi klinikoko, elikagaien prozesamenduko eta industria kimikoko aplikazioetan.<sup>22,25,26</sup>

PADak, orokorrean, paperean oinarritutako hainbat material erabiliz egin daitezke, iragazki papera, grafito papera eta kromatografia papera barne. Material horiek zelulosa hutsez osatuta daude, eta ez dute beste gehigarririk behar, horiek kaltegarriak izan baitaitezke saiakuntza analitikoaren errendimendurako.

Gainera, iragazki-paperak eta kromatografia-paperak zuritze osoa izaten dute fabrikazioaren ondoren, eta horrek paperaren ia ez-

purutasun guztiak ezabatzen ditu. Baina, hainbat aplikazioetarako beharrezkoa izaten da iragazki-papera hidrofobizatu behar izatea, eta horretarako sililazio-agentek erabil daitezke.<sup>22,24</sup>

Aipatzekoa da, PADek askatasun handia eskaintzen dutela diseinuari dagokionez, eta forma eta tamaina desberdinak dituzten elementuak integratzea ahalbidetzen dute. Hala ere, paper bakoitzaren ezaugarriek, xurgapen-abiadura zehazten dute eta laginaren eta errektiboen arteko ukipen-denboran ez ezik, errektiboen banaketan ere eragin dezake detekzio-puntuan. Bi arazo horiek eragina izan dezakete kolorearen magnitudean eta homogeneotasunean.<sup>27-29</sup>

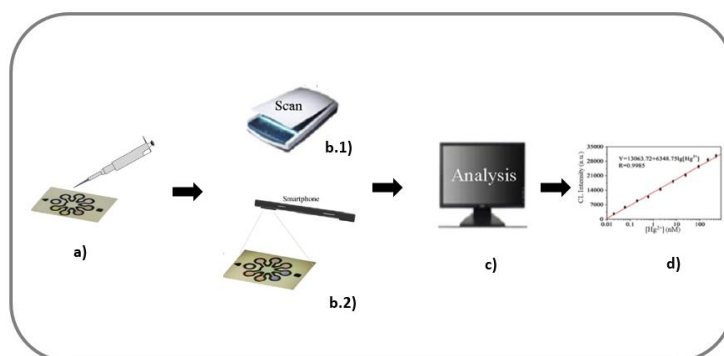


3 irudia. PAD-en diseinu ezberdinak.<sup>27,28,30</sup>

PADetan erabiltzen den detekzio ohikoenetako bat, kolorearen intentsitatean oinarritutako analitoak identifikatu eta kuantifikatzeko errektibo espezifikoak erabiltzen dituen metodo kolorimetrikoa da.<sup>26</sup>

Oro har, PAD kolorimetriako detekzio-metodoetako detekzio-eremuko irudiak eskanerren, telefono zelularren kameraren edo kamera

digitalen bidez biltzen dira, eta, ondoren, PC batera edo telefono zelular batera transferitzen dira analisiak bertan egiteko edo burutzeko.<sup>22,30</sup>



4 irudia. PAD bidezko prozesua. Laginen prestaketa paperean (a), argazkia ateratzea eskaner (b.1) edo telefono mugikor (b.2) baten bidez, argazkia PC batera igo analisia egiteko (c) eta datuen interpretazioa (d).

### 3. HELBURUAK

---

Lan honen helburu nagusia paper euskarrian oinarrituko analisi digitalaren metodo berri, azkar eta erraza bilatzea eta optimizatzea da. Metodo berri honen bidez koloratzaileen kontzentrazioa determinatzea izango litzake hurrengo pausoa. Nahiz eta metodo hau ikerketa taldearentzat nahiko berria izan, taldeak mikroplaketan oinarritutako irudi bidezko analisi ikerketen oinarriak ditu. Izan ere, argazkiak atera eta ondoren software batean prozesatzen dira.

Horretarako, lehenik eta behin, ordenagailuko *Matlab* programako script-a moldatu da gure paper euskarrira. Eta ondoren metodo hau optimizatzeko parametroak aztertu dira, lau hain zuzen ere. Hori burutu ahal izateko argazkiak atera eta programan bertan interpretatu dira.

Azkenik, froga guztiak egin ostean 4 parametro horiek finkatu dira.

## **4. ATAL ESPERIMENTALA**

---

### **4.1 ERREAKTIBOAK ETA MATERIALAK**

Ikerketa hau burutzeko Roha Epsa S. L. enpresako Allura gorria (% 85) koloratzaile sintetikoa erabili da. Honen disoluzioak egiteko, ur birdistilatua erabili da beti.

Azterketa egiteko erabili dugun paper euskarria Sigma-Aldrich enpresakoa da, Whatman N°1 motakoa (10 x 7,5 cm). Eta bertan borobilak egiteko erabili dugun permanentea *STAEDTLER permanent Lumocolor* izan da.

### **4.2 EKIPOAK ETA SOFTWAREAK**

Irudi digitalen analisia egiteko, sakelako telefono bat erabili da irudiak lortzeko. Sakelako telefonoa bq Aquaris X da, 16MPko atzeko kamera duena.

Behin irudiak hartuta, ordenagailu batera bidali dira, non irudiak tratatzeko software bat duen. Irudien tratamendurako, Matlab R2019a (The Mathworks, Inc. Natick, Ma) programa erabili da.

### **4.3 PAPERAREN PRESTAKETA**

Koloratzailea aztertzen hasi aurretik, paper euskarria prestatu behar da. Horretarako hainbat parametro aztertu behar dira.

#### 4.3.1 Permanentearen tamaina eta kolorea

Tamaina ezberdinetako permanenteak probatu dira, hain zuzen ere, S (~0,4 mm), F (~0,6 mm), M (~1,0 mm) eta B (~1,0-2,5 mm).

Koloreari dagokionez, beltza eta urdina probatu dira.

#### 4.3.2 Borobilaren diametroa

Borobilaren diametroari dagokionez, 3 desberdin probatu dira: 1 cm, 1,5 cm eta 2 cm.

#### 4.3.3 Bolumena

Paper euskarrian kantitate asko botatzen ez denez, 10 eta 20  $\mu\text{L}$  probatu dira.

#### 4.3.4 Denbora

Behin aurreko parametroak finkaturik, papera busti eta argazkia hartu bitarteko denbora hartu behar dugu kontuan. Horretarako argazkiak 0, 5, 15 eta 30 minututan hartu dira, beti ere tartetan labean edukiz  $\approx 85^{\circ}\text{C}$ -tara.

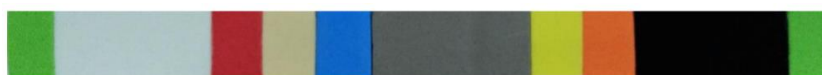
### 4.4 PAPERAREN EUSKARRIA

Paperaren borobiletara disoluzioa gehitzean, azpian tanta txikiak geratzen dira (kantitate gutxi bada ez da erortzen) eta horretarako euskarri bat behar da. Posible da pintza batzuekin iskinetatik eutsiz ipintzea baina erosoagoa da gainazal lau eta iragazgaitzeko material bat ipinita bere gainean jartzea papera, hobe zuria bada.

Izan ere, azpian duen materiala iragazgaitza bada ez da bertatik pasako ezta permanentetik ere, beraz, denborarekin lehortzen joango da eta bertan posible izango ditugu argazkiak atera.

#### 4.5 KOLORE-PATROIA

Argazkiak ateratzen direnean kolore-patroi bat jartzen da. Hau, *foamy*-z osatutako pieza bat da, hamar kolore ezberdin dituena, 4. irudian ikusi daitekeen bezala. Kolore-patroi honek filtro bat emango du, eta filtro honen bidez zenbait irudi baztertuko dira, determinaziorako egokiak ez direnak. Patroiak argiaren kontrola emango digu, irudi guzti-guztietan aplikatzean.



5. irudia. Kolore-patroiaren 10 koloreak hurrenez hurren: Berdea 1, txuria, gorria, beigea, urdina, grisa, horia, laranja, beltza eta berde 2.

Patroia irudi digital bakoitzari aplikatu behar zaio. Izan ere, irudia beti leku berean hartzen bada ere, kontrolatu ezin diren faktoreak daude, hala nola laborategiko argiztapena edo eguraldiak izan dezakeen eragina. Faktore horiek kolorearen intentsitatean eragin zuzena izan lezakete eta, horregatik, kolorearen patroiak nahi ez diren irudiak baztertzen lagunduko luke.

#### 4.6. SCRIPT-A PAPEREAN

Ikerketa honetan, mikroplaketan oinarritu beharrean, paperean oinarritzen garenez eta script zehatzik ez dugunez, mikroplaketan



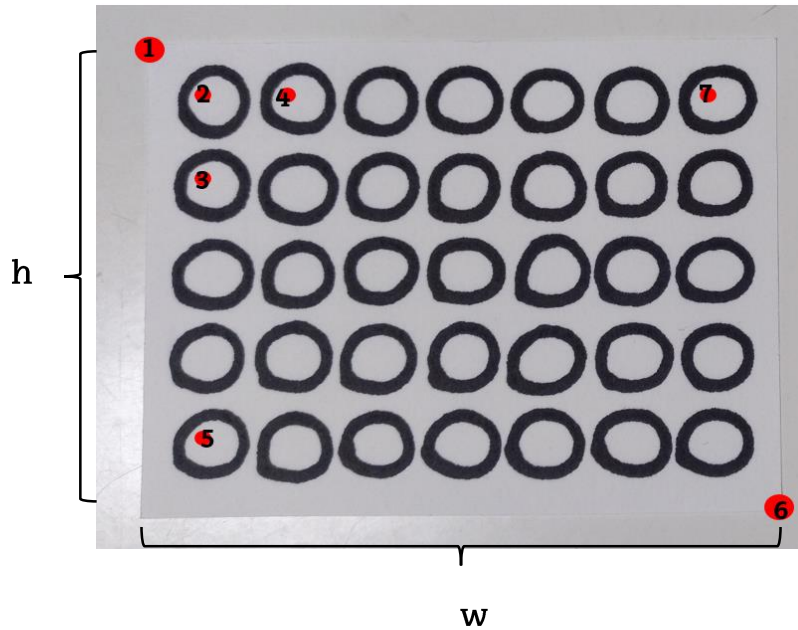
erabiltzen den script-a moldatu da paperera. Script hau *Matlab* programan burutu da.

Paperean, 5 lerro eta 7 zutabe daude, denera 35 borobil. Beraz, balioak moldatzeko beharrezkoa da jakitea paperaren zabalera, paperaren altuera, borobilen arteko tartea eta borobil eta ertzen arteko tartea. Puntu horien koordenatuetatik gainerako informazio guztia estrapolatu daiteke.

Script-ean borobilaren 10x10 pixeleko dimentsioa hautatzen du, beraz, garrantzitsua da, bi borobilen arteko distantzia beti berdina izatea.

Hortaz, 7 puntu hartu behar ditugu, beti ere hauen kokapena pixeletan izanik:

- Paperaren goiko ezkerreko ertza (1 Puntua)
- Lehenengo borobileko 10x10 pixelaren ertza (2. Puntua)
- 2. lerroko borobileko 10x10 pixelaren ertza (3. Puntua)
- 2. zutabeko borobileko 10x10 pixelaren ertza (4. Puntua)
- Azken lerro eta lehenengo zutabeko borobileko 10x10 pixelaren ertza (5. Puntua)
- Paperaren beheko eskuineko ertza (6. Puntua)
- Lehenengo lerroko eta azken zutabeko borobileko 10x10 pixelaren ertza (7. Puntua)

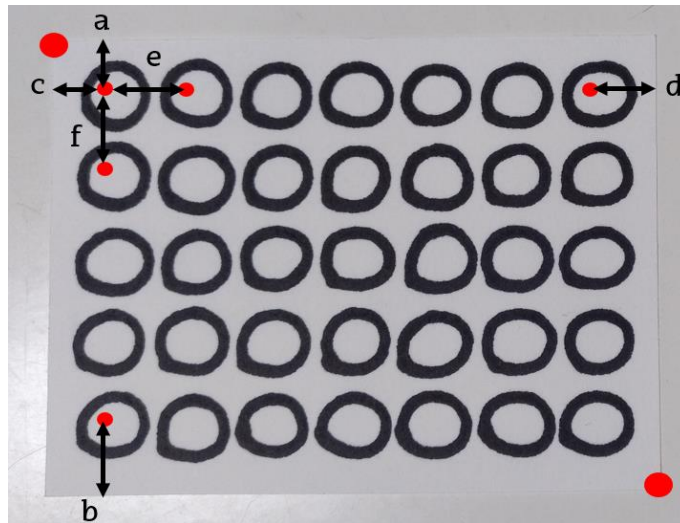


6. irudia. 7 puntuen kokapena paperean.

4. Taula. 7 puntuen eta paperaren zabalera eta luzera koordinatuak pixeletan.

PUNTUA	KOORDENATUAK	
	X	Y
1	195	1820
2	450	2025
3	450	2450
4	850	2025
5	450	3700
6	3265	4150
7	2875	2025
Pixelak		
w	3070	
h	2330	

Puntu horiek identifikatuta ditugarik tartearik atera behar ditugu, horretarako puntuen arteko eragiketak egingo dira: tarte goi ( $Y_2 - Y_1$ ), tarte beheara ( $Y_6 - Y_5$ ), tarte ezker ( $X_2 - X_1$ ), tarte eskuin ( $X_6 - X_7$ ), tarte w ( $X_4 - X_2$ ) eta tarte h ( $Y_3 - Y_2$ ).



7. irudia. Kalkulatu beharreko 6 tarteak. a) Tarte goi, b) tarte beheara, c) tarte ezker, d) tarte eskuin, e) tarte w eta f) tarte h.

Beraz, tarteak eta paperaren zabalera ( $w$ ) eta luzera ( $h$ ) jakinik, erlazioak atera behar ditugu, izan ere tarte  $w/w$  eginik borobilen arteko tartearen eta paperaren zabalaren artekoa erlazioa aterako dugu. Berdin, tarte  $h/h$  eginik, borobilen arteko tartearen eta paperaren luzeraren arteko erlazioa lortuko da. Kalkulu berdinak egin behar dira gainontzeko tarteekin.

Orduan, amaitzeko, mikroplaketentzat egindako script-ean erlazio hauek aldatuz, gure paperarentzako script-a lortuko da, non bertatik lortuko diren irudiko datuak interpretatzea

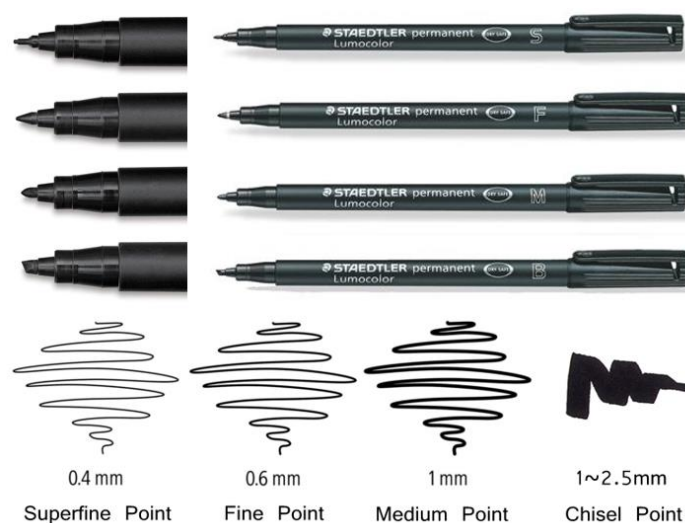
## 5. EMAITZAK ETA EZTABAIDAK

---

Lehen aipatu bezala, lan honetan, metodo berri baten optimizazioa da helburua, hortaz, atal honetan, optimizatzeko prozesu horretan behatu ditugun parametroen emaitzak eta hauen eztabaida jorratuko da.

### 5.1 PERMANENTEAREN TAMAINA ETA KOLOREA

Permanentearen tamainari dagokionez, aurreko atalean aipatu bezala, 4 tamaina ezberdineko permanenteak probatu dira: S (~0,4 mm), F (~0,6 mm), M (~1,0 mm) eta B (~1,0-2,5 mm).

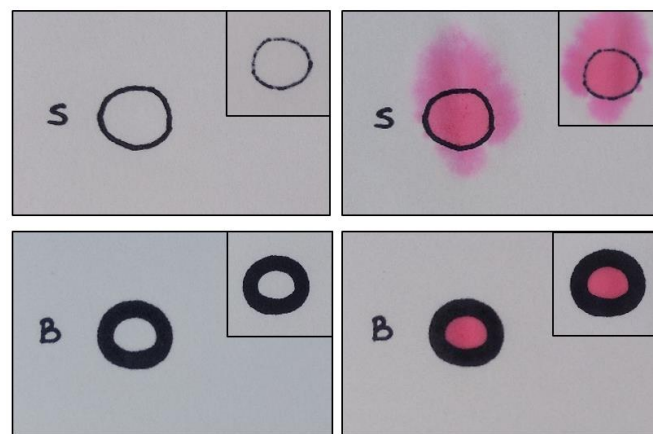


8. irudia. *STAEDTLER permanent Lumocolor* tamaina desberdinak.

Permanentearekin borobilak egitean, ikusi da permanenteak iragaz paperaren bi aldeetatik nabarmena izan behar duela, hau da, kolorea ondo ikusi behar dela. Izan ere, bi aldeetatik kolorea nabarmena

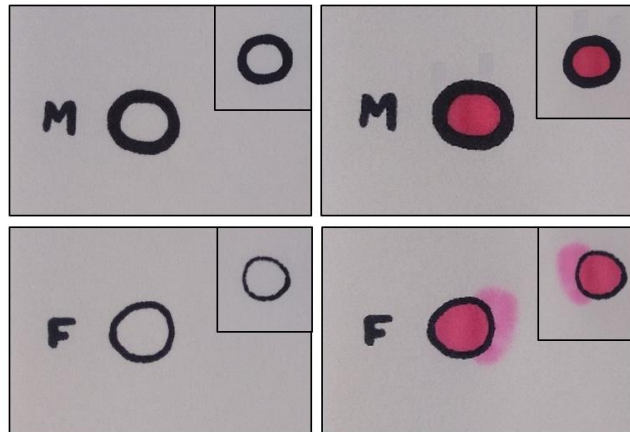
bada, papereko poro guztiak tintarekin betetzen dira eta ez dio uzten urari (koloratzailearekin barne) borobil horretatik irteten. Aldiz, kolorea ez bada nabarmena bi aldetatik edo borobila ondo itxita ez badago, kanpora ateratzen da.

Ikusi da, S tamainako permanenteak ez duela nahikoa zeharkatzen behin pasata edo ez dituela poro guztiak ixten, eta bi aldiz pasatzen bada borobila pixka bat deformatzen dela. Aldiz, B tamainakoa erabiliz, lehenengo pasadan tinta gehiegi askatzen duela ikusi da eta horretaz gain borobilaren diametroa txikitzen du.



9. irudia. STAEDTLER permanent Lumocolor S eta B tamainak aurretik (ezker aldean) eta atzetik (eskuin aldean).

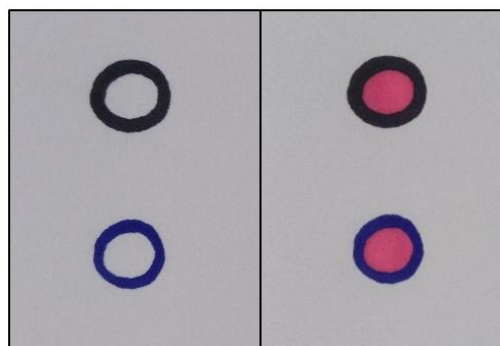
Beraz, F eta M tamainak, tarteko tamaina edukiko dute. F tamainakoak, ez ditu bere osotasunean betetzen poroak behin pasata, baina bigarren pasada eman eta gero kolorea nabarmena da bi aldeetatik eta ez du diametroa txikitzen. Ordea M tamainako permanentearekin, behin pasata poro guztiak ixten ditu bi aldeetatik nabarmen izanik kolorea.



10. irudia. STAEDTLER permanent Lumocolor M eta L tamainak aurretik eta atzetik.

Beraz, ikerlariaren eta borobilak eskuz marraztearen erosotasuna bilatzearren, M tamaina erabiliko dela zehaztu da.

Koloreari dagokionez, Allura gorriarekin ari garenez, kolore urdin edo beltzeko permanentea probatu da. Azkenean kolore beltza erabaki da, kontraste hobe izango duelako koloratzailea gorria izanik.

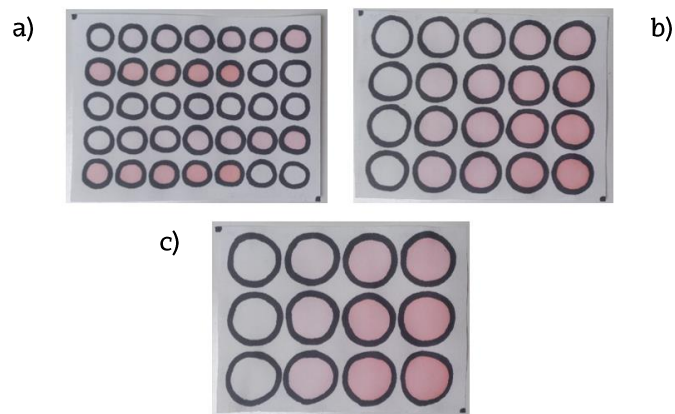


11. irudia. STAEDTLER permanent Lumocolor kolore beltza eta urdina.

## 5.2 BOROBILAREN DIAMETROA

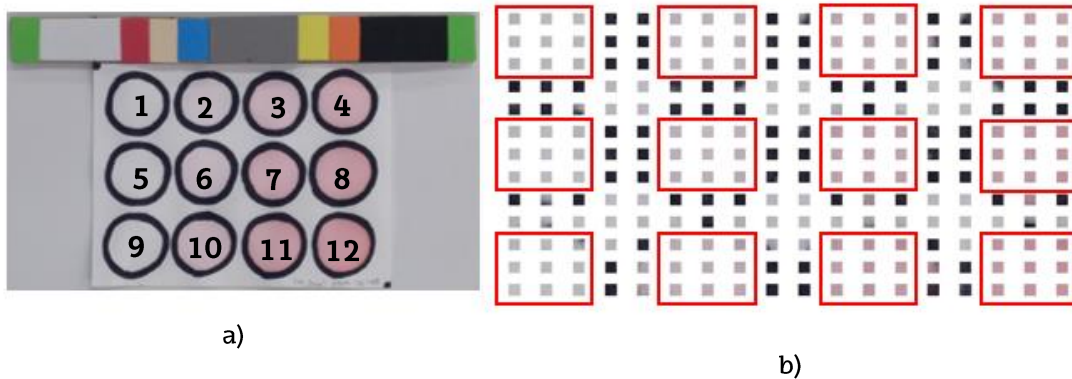
3 diametro desberdinen behaketa egiteko txantilo bat egin da, 1 cm, 1,5 cm eta 2 cm diametroko borobilekin.

Allura gorria disoluzioaren kontzentrazio desberdinak botatzean ikusi da zirkunferentzia osoan ez dela homogeneousun bera mantentzen 1,5 eta 2 cm-ko diametroa dutenetan. Beraz, horien azterketa sakonago bat egin da, hain zuzen ere, 2 cm duen diametroarekin.



12. irudia. Borobilen diametroa, a) 1 cm, b) 1,5 cm eta c) 2 cm.

Bertan 10x10 pixel bat hartu beharrean, 4 eta 9 10x10 pixel hartzen probatu da borobileko, ea zirkunferentzia osoan homogeneousun mantentzen den ikusteko (horretarako, script-a moldatua izan da berriro). Beraz, paperari argazkia atera eta RGB kanalak neurtu dira. Borobil bakoitzeko 4 edo 9 10x10 pixel genituenez horien arteko batz bestekoa, desbideratze estandarra eta desbideratze estandar erlatiboa kalkulatu dira, ikus 5 eta 6. taula.

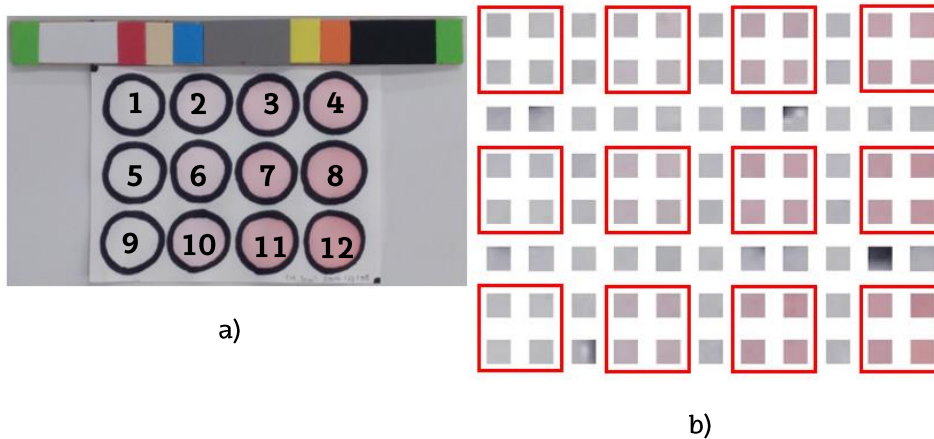


13. irudia. a) 2 cm-ko diametroa duen paperaren argazkia eta b) *Matlab* programak irudia aztertu ostean emandako irudia (9 lauki 10x10 pixel borobileko).

5. Taula. 2 cm-ko diametroan 9 lauki 10x10 pixelen datuak.

BOROBILA	KANALAK					
	BERDEA (G)			URDINA (B)		
	Bat. best.	s	RSD (%)	Bat. best.	s	RSD (%)
1	221	3.5	1.6	227	3.3	1.5
2	216	3.9	1.8	226	3.5	1.5
3	202	6.6	3.3	213	6.0	2.8
4	194	3.1	1.6	207	3.0	2.9
5	223	3.1	1.4	230	3.0	1.3
6	213	3.3	1.5	224	3.2	1.4
7	191	6.0	3.1	204	5.2	2.6
8	184	5.8	3.2	195	6.1	3.1
9	211	3.8	1.8	218	3.1	1.4
10	202	10	5.3	215	9.5	4.4
11	180	8.0	4.4	192	8.1	4.2
12	175	7.9	4.5	186	8.2	4.4





14. irudia. a) 2 cm-ko diametroa duen paperaren argazkia eta b) *Matlab* programak irudia aztertu ostean emandako irudia (4 lauki 10x10 pixel borobileko).

6. Taula. 2 cm-ko diametroan 4 lauki 10x10 pixelen datuak.

BOROBILA	KANALAK					
	BERDEA (G)			URDINA (B)		
	Bat. best.	S	RSD (%)	Bat. best.	S	RSD (%)
1	219	4.2	1.9	226	4.2	1.9
2	216	3.8	1.8	227	3.9	1.7
3	200	7.0	3.5	212	6.2	2.9
4	195	1.5	0.8	208	2.1	1.0
5	223	3.3	1.5	230	2.9	1.3
6	212	3.5	1.7	223	3.3	1.5
7	193	3.8	2.0	206	4.5	2.2
8	183	5.5	3.0	195	6.3	3.2
9	226	3.4	1.5	206	4.6	2.2
10	206	4.6	2.2	217	4.6	2.1
11	183	5.4	2.9	194	4.7	2.4
12	176	8.6	4.9	187	8.7	4.7

Aurreko bi tauletan ikusi dezakegun bezala, nahiko RSD balio onak lortu dira bi kasuetan. 9 laukietako kanal berdean %1,4-5,3 tartea ikusi da, aldiz, kanal urdinean %1,3-4,4. Kanal berdean balio bat dago agian ez dena nahiko ona kontsideratzen, hau da, %5,3 balioa, baina hori kenduta gainontzekoak onargarriak dira. Ordea, 4 laukietako kanal berdean %0,8-4,9 tartea ikusi da, eta kanal urdinean %1,0-4,7, non onargarritzat kontsidera daitezkeen. Honetaz gain, aipatu behar da disoluzio bolumen gehiagorekin, hau da, azken ilarako borobilekin, RSD balioak handitzeko joera dagoela bi kasuetan, eta joera berdina gertatzen da azken zutabeko borobilekin eta disoluzio kontzentratuenekin.

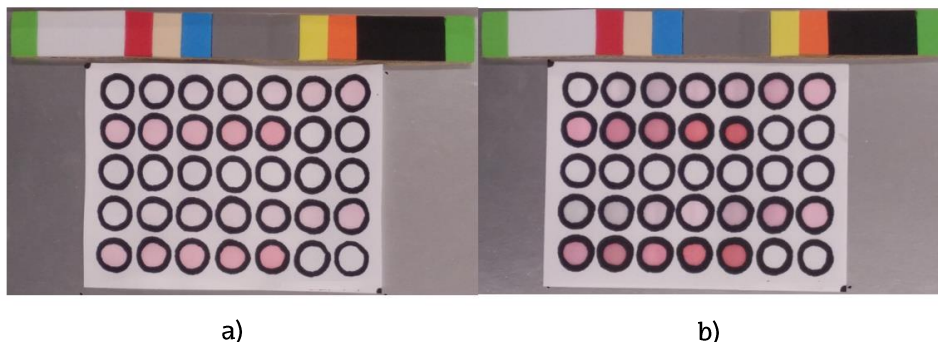
Beraz, datuak azterturik, esan genezake nahiko homogeneoa dela disoluzioa zirkunferentzia osoan zehar soilik 2 cm-tako diametroarekin proba eginik. Hortaz, 3 diametro desberdinak posible izango lirateke erabili, baina guk ahalik eta borobil gehien edukitzea lortu nahi dugu, ahalik eta lagin gehiago sartzeko.

Horren ondorioz, erabaki da 1 cm-ko diametroa duen borobila erabiltzea hemendik aurrera. Baita ere ohartu gara, diametroak erlazio zuzena duela botako den disoluzio bolumenarekin. Datorren atalean aztertuko da sakonago.

### 5.3 BOLUMENA

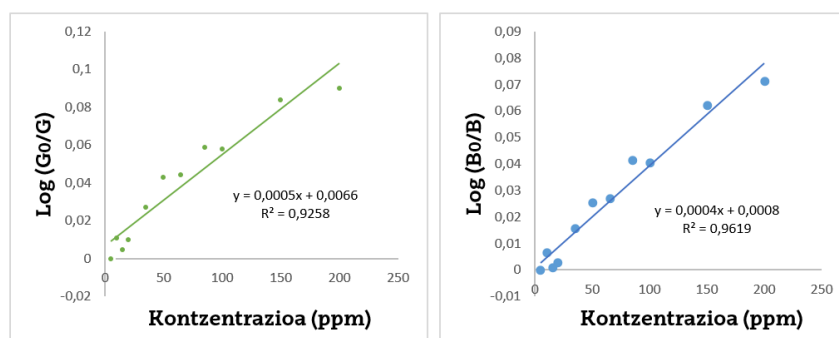
Aurreko atalean aipatu bezala, diametroak erlazio zuzena du botatzen den disoluzio bolumenarekin, eta erabiliko dugun diametroa 1 cm-koa denez ez da komeni asko botatzea. Izan ere, frogatu da, diametro txikia duenari kantitate asko botatzen bazaio ( $\approx 100 \mu\text{L}$ ), nahiz eta poro guztiak tapatuta eduki gehiegi denez atera egiten dela.

Hortaz bi kantitate behatu dira: 10  $\mu\text{L}$  eta 20  $\mu\text{L}$ . Bolumenaren behaketa egiteko patroi disoluzioak prestatu dira 5, 10, 15, 20, 35, 50, 65, 85, 100, 150 eta 200 mg/L-koak.



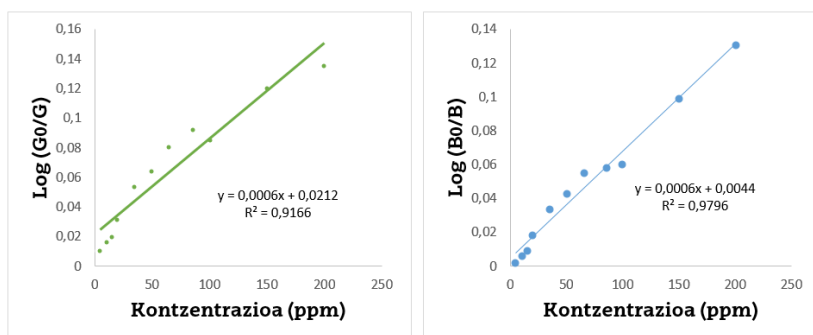
15. irudia. Bolumen ezberdinen argazki hartzea a) 10  $\mu\text{L}$  eta b) 20  $\mu\text{L}$ .

Argazkian bertan, 2 erreplika ageri dira. Garbi ikus daiteke, 20  $\mu\text{L}$  bolumen botaz gero, nabarmenagoa dela kolorea, hau da, intentsitate handiagoa duela.



16. irudia. Allura gorriaren kanal berde eta urdinen adierazpen grafikoa 10  $\mu\text{L}$ -rekin.

10  $\mu\text{L}$ -rekin aztertu ostean, ikusten da, kanal berdearen erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0,0005x + 0,0066$  dela eta korrelazio koefizientea 0,9258. Kanal urdinaren kasuan, berriz,  $y = 0,0004x + 0,0008$  eta 0,9619 izan dira.



17. irudia. Allura gorriaren kanal berde eta urdinen adierazpen grafikoa 20  $\mu$ L-rekin.

Aldiz, 20  $\mu$ L-rekin aztertu ostean, ikusten da, kanal berdearen erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0,0006x + 0,0212$  dela eta korrelazio koefizientea 0,9166. Kanal urdinaren kasuan, berriz,  $y = 0,0006x + 0,0044$  eta 0,9796 izan dira.

Lortutako hainbat lerro zuzenen maldak irizpide estatistiko baten bitartez konparatu dira, hain zuzen ere, kanal urdinarena. Lehenik, F kalkulatu da.  $F_{kal} = 1,42$  izanik eta  $F_{taula} = 3,18$ , beraz,  $F_{kal} < F_{taula}$  baino txikiagoa izanik ez dago diferentzia adierazgarririk, eta jarraian t kalkulatu da,  $t_{kal} = 6,21$  eta  $t_{taula} = 2,09$  izanik. Beraz, ikusi dezakegu  $t_{kal}$  handiagoa dela  $t_{taula}$  baino, hortaz diferentzia adierazgarria dela esan dezakegu, estatistikoki adierazgarria dela eta beraz 20  $\mu$ L-rekin malda sentikorragoa dela.

Hortaz, datu hauek azterturik erabaki da 20  $\mu$ L bolumen botako dela borobilerara, intentsitate gehiago baitu 10  $\mu$ L-rekin konparatuz gero.

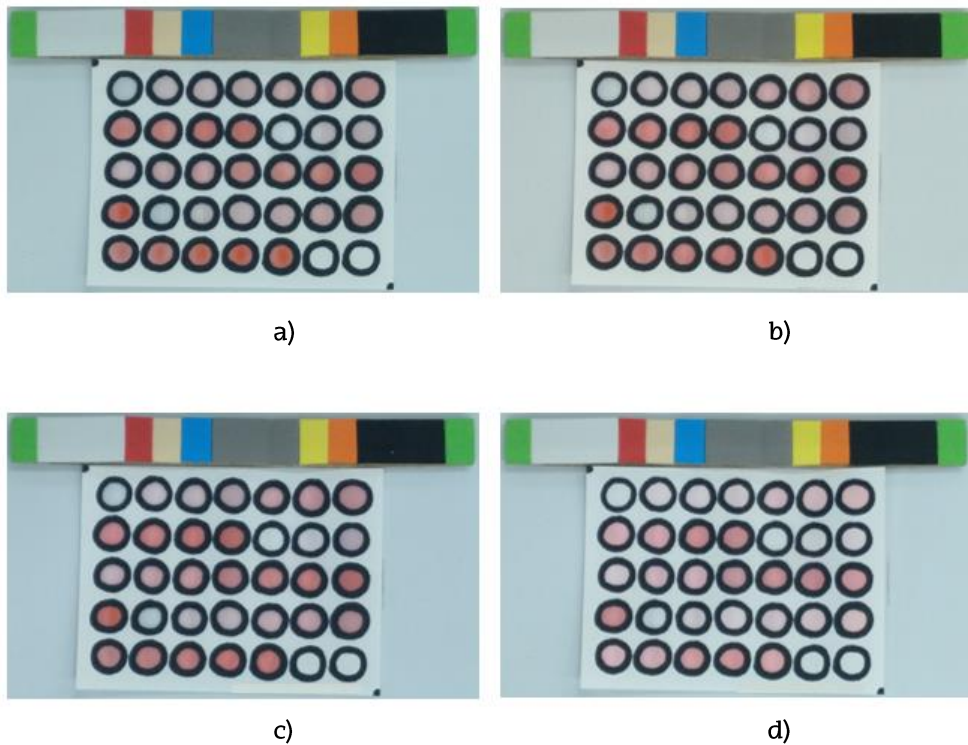
Horretaz gain, aipatu behar da, diametro txikia duenari bolumen handia botaz gero, permanentea pasatzen du eta atera egiten da. Aldiz, diametroa handia duen borobilari kantitate gutxi gehituz, koloratzailea soilik erdian geratzen da eta askoz ere kolore gutxiago iristen da iskinetara.

#### 5.4. DENBORA

Aztertu den azken parametroa denbora izan da. Izan ere, ikusi da, denbora luzean disoluzioa paperean lehortzen denez, intentsitatea galtzen duela, horretarako, 4 denbora desberdinetan hartu dira argazkiak: 0, 5, 15 eta 30 minutuetan hain zuzen ere.

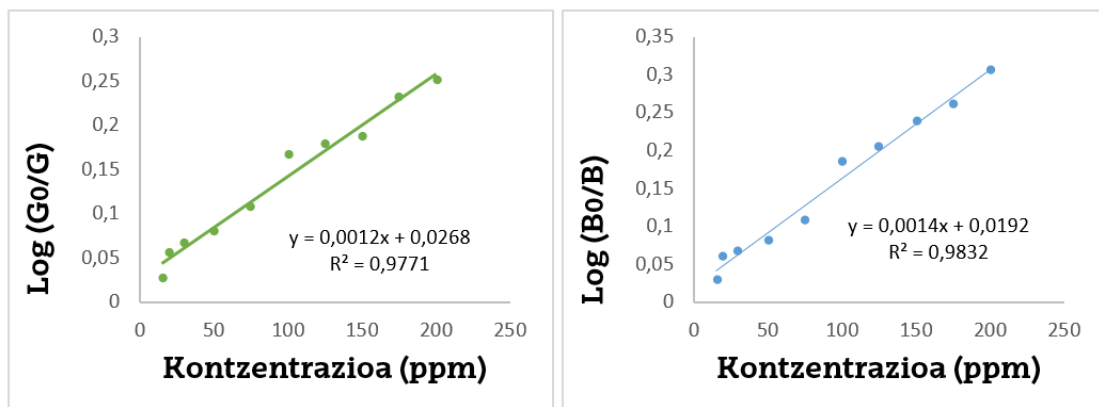
Zati esperimentalean aipatu bezala, argazkia hartu behar ez zeneko denbora tarteetan, labean sartzen zen papera gutxi gorabehera 85 °C-tan lehenago lehortzeko.

Parametro honen neurketarako erabili diren patroi disoluzioak 15, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175 eta 200 mg/L-koak izan dira. 17.irudian ikus daiteke 4 denboretan hartutako argazkiak.



18. irudia. Denbora parametroa aztertzeko argazki hartzea, a) 0 minutu, b) 5 minutu, c) 15minutu eta d) 30 minutu.

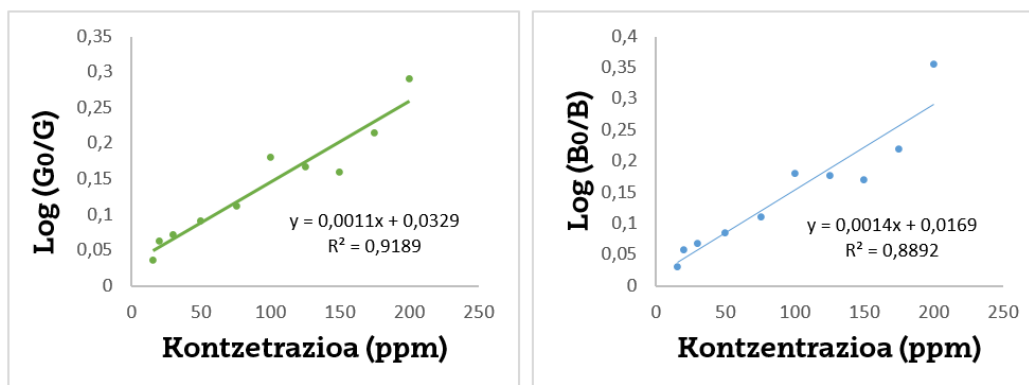
3 erreplika burutu dira eta datuak aztertzeko garaian hiru erreplika hauen bataz bestekoa egin da hauek interpretatzeko. Jarraian dugun irudian (18. irudia) ikus genezake 0 minutuan hartutako argazkiaren datuak.



19. irudia. Allura gorriaren kanal berde eta urdinen adierazpen grafikoa 0 minutuan.

0 minutuan hartutako argazkia aztertu ostean, ikusten da, kanal berdearen erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0,0012x + 0,0268$  dela eta korrelazio koefizientea 0,9771. Kanal urdinaren kasuan, berriz,  $y = 0,0014x + 0,0192$  eta 0,9832 izan dira.

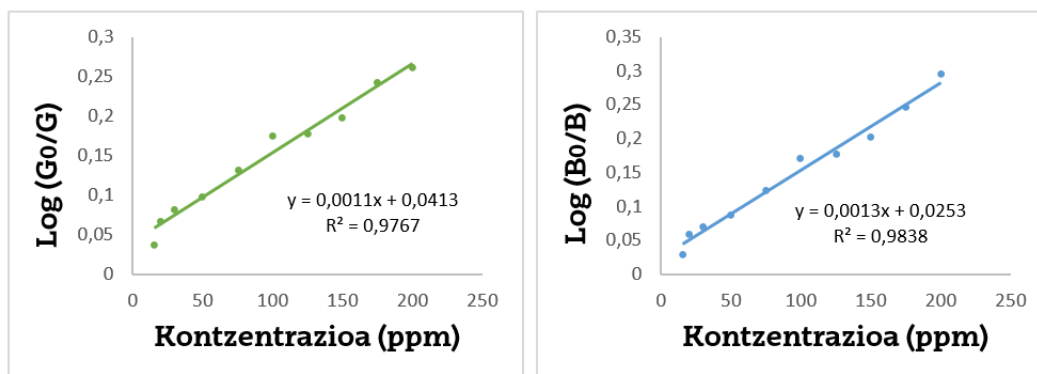
Hurrengoa, 5. Minututan hartutako datuak dira.



20. irudia. Allura gorriaren kanal berde eta urdinen adierazpen grafikoa 5 minutuan.

5. minutuan hartutako argazkian, ikusten da, kanal berdearen erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0,0011x + 0,0329$  dela eta korrelazio koefizientea 0,9189. Kanal urdinaren kasuan, berriz,  $y = 0,0014x + 0,0169$  eta 0,8892 izan dira.

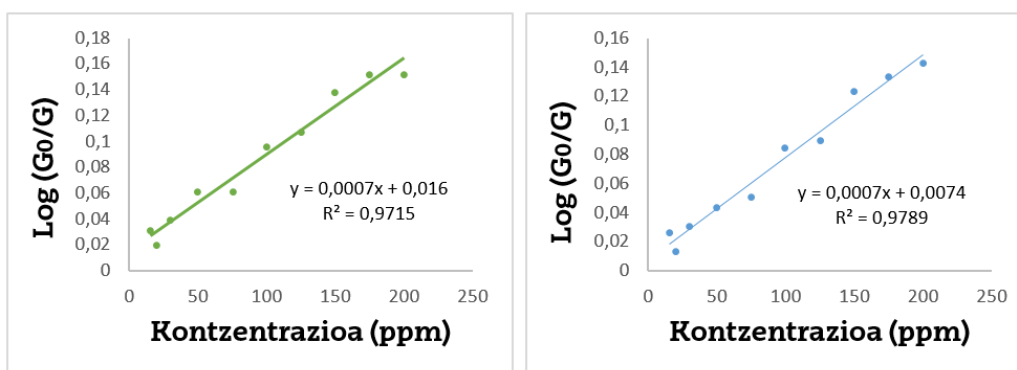
Jarraian, 15. minutuan hartutako datuak dira hauek.



21. irudia. Allura gorriaren kanal berde eta urdinen adierazpen grafikoa 15 minutuan.

15. minutuko argazkian, ikusten da, kanal berdearen erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0,0011x + 0,0413$  dela eta korrelazio koefizientea 0,9767. Kanal urdinaren kasuan, berriz,  $y = 0,0013x + 0,0253$  eta 0,9838 izan dira.

Eta azkenik, 30. minutuan hartutako datuak.



22. irudia. Allura gorriaren kanal berde eta urdinen adierazpen grafikoa 30 minutuan.

30. minutuko argazkian, ikusten da, kanal berdearen erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0,0007x + 0,016$  dela eta korrelazio koefizientea 0,9715. Kanal urdinaren kasuan, berriz,  $y = 0,0007x + 0,0074$  eta 0,9789 izan dira.

Horretaz gain, LOD eta LOQ kalkulatu dira, bai 4 denbora ezberdinetan bai kanal berde eta urdinerako, ikus 7. Taula.



7. taula. LOD eta LOQ balioak 4 denbora ezberdinetan kanal berde eta urdinerako.

DENBORA	KANALA	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
<b>0 minutu</b>	Berdea	36	107
	Urdina	30	92
<b>5 minutu</b>	Berdea	69	208
	Urdina	82	247
<b>15 minutu</b>	Berdea	36	108
	Urdina	30	90
<b>30 minutu</b>	Berdea	40	120
	Urdina	34	103

Taulan ikusten diren emaitzei erreparatuz, balio txarrenak 5. minutuan lortzen dira, oso balio handiak dira bai kanal berdearentzat baita urdinarentzat ere. Bi kanaletan papera busti eta segituan argazkiak hartzea balio nahiko onak lortzen direla ikusi da, detekzio muga nahiko baxua lor genezakelako 36 eta 30 mg/L kanal berde eta kanal urdinerako hurrenez hurren.

Emaitza guztiak aztertuz, esan genezake, disoluzioa bota eta segituan ateratzen bada argazkia emaitza hobekak lortzen direla, horretarako grafikoak ikusi besterik ez da egin behar, nahiz eta ez oso balio onak izan. Bestetik, ikusi da metodo honen bidez, nahikoa kontzentrazioak txikiak ez dituela detektatzen eta kuantifikatzen.

### 5.5. ETORKIZUNERA BEGIRA...

Azkenik, aztertutako aldagaien eta lortutako emaitzak 8. Taulan laburbildu dira.

8. taula. Aztertutako aldagaiak eta lortutako emaitzak.

ALDAGAIA	BALIOAK	EMAITZAK
Permanentearen tamaina eta kolorea	S F <b>M</b> B <b>Beltza</b> /Urdina	<b>Bi aldeetatik nabarmena</b> izatea da garrantzitsua, bestela disoluzioa pasa egiten baita. Horretaz gain, <b>kontrastea</b> ere kontutan hartu behar den gauza bat da.
Borobilaren diametroa	<b>1 cm</b> 1,5 cm 2 cm	<b>Homogeneitatea</b> garrantzitsua da, horretaz gain, <b>borobil kantitate gehiago</b> hobea izango da lagin gehiago analizatzeko.
Bolumena	10 $\mu$ L <b>20 <math>\mu</math>L</b>	<b>Maldak</b> konparatu dira irizpide estatistiko baten bitartez, <b>sentikorragoa</b> dena finkatu da.
Denbora	<b>0 min</b> 5 min 15 min 30 min	<b>Intentsitatean</b> eta <b>LOD eta LOQ</b> baliotan oinarriturik finkatu da denbora.

Lan hau burutu ostean eta 8. taulako emaitzei erreparatuz, hainbat parametro finkaturik utzi dira, hala nola, permanentearen M tamaina

eta beltz kolorekoa ikerlariaren erosotasuna bilatzearen, borobilaren diametroa 1 cm-koa izatea ahalik eta borobil gehiago sartzeko, botako den disoluzio kantitatea 20  $\mu$ L-koa izatea kolorearen intentsitatea handiagoa delako malden konparaketa egin ostean eta azkenik, disoluzioa bota eta argazkia hartzeko denbora 0 minutu izatea.

Nahiz eta lau parametro hauek finkatu, lan handia dago oraindik, emaitza hobetoak lortu daitezkeelako. Horretarako, iragaz papereko poroak nola bete pentsatuko nuke, hau da, poroak estaliz gero, disoluzio guztia paper eta permanentearen inguruan geratu litzateke eta posible izango zen intentsitate handiagoak lortzea, baina agian disoluzioaren bolumen gutxiago bota beharko litzateke. Horretaz gain, interesgarria izango litzateke LOD eta LOQ balioak baxuagoak lortzea eta laginekin metodo hau balidatzea.

Beste proposamen bat aipatzekotan, permanentearen ordez, beste material bat erabiltzea izango litzateke. Hau da, sarreran aipatu dudana bezala, permanentea erabili ordez posible da agian argizaria, inprimagailua, laserra... bezalako materialekin probatuz diseinu konplexuagoak eta emaitza hobetoak lortzea.

## 6. ONDORIOAK

---

Lehen aipatu bezala, helburu nagusia, paper euskarrian oinarritutako irudi digitalen analisi metodo merke, erraz eta azkarra bilatzea da. Horretarako metodo berri baten parametroen optimizazioa burutu da.

Lehendabizi, ikusi da, mikroplaketetan erabilitako script-a ondo moldatu dela paperara eta posible dela paperari argazkiak atera eta *Matlab* programaren bidez datuak interpretatzea. Bigarrenez, metodoa aurrera ateratzeko lau parametro optimizatu dira laborategian eta hauek finkatu hainbat froga egin ostean.

Hala ere, ezin izan da metodo hau laginetara eraman ezta balidatu denbora faltaren ondorioz, baina bai parametro batzuk finkatu. Hala ere, metodo gau guztiz fidagarria izan dadin, gehiago sakondu behar da bai kolorearen intentsitateak ematen dituen balioan baita LOD eta LOQ balioetan, nahiko altuak direla ikusi da eta.

## 6. CONCLUSIONS

---

As mentioned above, the main objective is to find a cheap, simple and fast method of analysis of paper-based digital images. For this, the optimization of the parameters of a new method has been carried out.

Firstly, the script used on the microplates has been found to be well adapted to the paper and it is possible to photograph the paper and interpret the data using the Matlab program. Secondly, to carry out the method, four parameters have been optimized in the laboratory and these have been fixed after carrying out various tests.

However, it was not possible to carry this method to the samples or validate it due to lack of time, but it was possible to set some parameters. However, for this method to be totally reliable, it is necessary to develop more deeply into the value provided by the color intensity as well as the LOD and LOQ values, which have been quite high.

## 7. BIBLIOGRAFIA

---

- (1) Commission, C. A.; Nations, F. and A. O. of the U. *Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual*; Food & Agriculture Org., 2007.
- (2) Rovina, K.; Siddiquee, S.; Shaarani, S. M. Extraction, Analytical and Advanced Methods for Detection of Allura Red AC (E129) in Food and Beverages Products. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00798>.
- (3) Elmadfa, I.; Muskat, E.; Fritzsche, D. *Tabla de aditivos. Los números E*; Editorial HISPANO EUROPEA, 2011.
- (4) Yoshioka, N.; Ichihashi, K. Determination of 40 Synthetic Food Colors in Drinks and Candies by High-Performance Liquid Chromatography Using a Short Column with Photodiode Array Detection. *Talanta* **2008**, *74* (5), 1408–1413. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.09.015>.
- (5) Scientific Opinion on the Re-Evaluation of Allura Red AC (E 129) as a Food Additive. *EFSA J.* **2009**, *7* (11), 1327. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1327>.
- (6) McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L.; Prince, E.; Sonuga-Barke, E.; Warner, J. O.; Stevenson, J. Food Additives and Hyperactive Behaviour in 3-Year-Old and 8/9-Year-Old Children in the Community: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *The Lancet* **2007**, *370* (9598), 1560–1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3).
- (7) Oh, S. W.; Kang, M. N.; Cho, C. W.; Lee, M. W. Detection of Carcinogenic Amines from Dyestuffs or Dyed Substrates. *Dyes Pigments* **1997**, *33* (2), 119–135. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(96\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(96)00038-1).

- (8) Pinheiro, H. M.; Touraud, E.; Thomas, O. Aromatic Amines from Azo Dye Reduction: Status Review with Emphasis on Direct UV Spectrophotometric Detection in Textile Industry Wastewaters. *Dyes Pigments* **2004**, *61* (2), 121–139. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2003.10.009>.
- (9) Pielesz, A.; Baranowska, I.; Rybak, A.; W ochowicz, A. Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2002**, *53* (1), 42–47. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2191>.
- (10) Amchova, P.; Kotolova, H.; Ruda-Kucerova, J. Health Safety Issues of Synthetic Food Colorants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *73* (3), 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>.
- (11) Reglamento (UE) no 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión Texto pertinente a efectos del EEE. 177.
- (12) Capitán-Vallvey, L. F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. J. Recent Developments in Computer Vision-Based Analytical Chemistry: A Tutorial Review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *899*, 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>.
- (13) López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Pérez de Vargas-Sansalvador, I. M.; Fernández-Ramos, M. D.; Carvajal, M. A.; Capitan-Vallvey, L. F.; Palma, A. J. Determination of O<sub>2</sub> Using Colour Sensing from Image Processing with Mobile Devices. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *171–172*, 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.007>.
- (14) Costa, G. B.; Fernandes, D. D. S.; Almeida, V. E.; Araújo, T. S. P.; Melo, J. P.; Diniz, P. H. G. D.; Vêras, G. Digital Image-Based Classification of Biodiesel. *Talanta* **2015**, *139*, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.043>.

- (15) Choodum, A.; Kanatharana, P.; Wongniramaikul, W.; Nic Daeid, N. Using the iPhone as a Device for a Rapid Quantitative Analysis of Trinitrotoluene in Soil. *Talanta* **2013**, *115*, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.037>.
- (16) Bang-iam, N.; Udnan, Y.; Masawat, P. Design and Fabrication of Artificial Neural Network-Digital Image-Based Colorimeter for Protein Assay in Natural Rubber Latex and Medical Latex Gloves. *Microchem. J.* **2013**, *106*, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.08.003>.
- (17) Qué es la teoría tricrómica | Imagen Digital [http://www.gusgsm.com/que\\_es\\_la\\_teoría\\_tricromica](http://www.gusgsm.com/que_es_la_teoría_tricromica) (accessed Jun 13, 2020).
- (18) Moonrungsee, N.; Pencharee, S.; Jakmunee, J. Colorimetric Analyzer Based on Mobile Phone Camera for Determination of Available Phosphorus in Soil. *Talanta* **2015**, *136*, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.024>.
- (19) Choodum, A.; Parabun, K.; Klawach, N.; Daeid, N. N.; Kanatharana, P.; Wongniramaikul, W. Real Time Quantitative Colourimetric Test for Methamphetamine Detection Using Digital and Mobile Phone Technology. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *235*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.11.018>.
- (20) Andrade, S. I. E.; Lima, M. B.; Barreto, I. S.; Lyra, W. S.; Almeida, L. F.; Araújo, M. C. U.; Silva, E. C. A Digital Image-Based Flow-Batch Analyzer for Determining Al(III) and Cr(VI) in Water. *Microchem. J.* **2013**, *109*, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.029>.
- (21) Erenas, M. M.; Cantrell, K.; Ballesta-Claver, J.; de Orbe-Payá, I.; Capitán-Vallvey, L. F. Use of Digital Reflection Devices for Measurement Using Hue-Based Optical Sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *174*, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.100>.



- (22) Fu, L.-M.; Wang, Y.-N. Detection Methods and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *107*, 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.018>.
- (23) Luther, J. L.; Henry de Frahan, V.; Lieberman, M. Paper Test Card for Detection of Adulterated Milk. *Anal. Methods* **2017**, *9* (38), 5674–5683. <https://doi.org/10.1039/C7AY01321C>.
- (24) Malekghasemi, S.; Kahveci, E.; Duman, M. Rapid and Alternative Fabrication Method for Microfluidic Paper Based Analytical Devices. *Talanta* **2016**, *159*, 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.040>.
- (25) Kirk, K. A.; Andreescu, S. Easy-to-Use Sensors for Field Monitoring of Copper Contamination in Water and Pesticide-Sprayed Plants. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (21), 13892–13899. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03385>.
- (26) Pratiwi, R.; Nguyen, M. P.; Ibrahim, S.; Yoshioka, N.; Henry, C. S.; Tjahjono, D. H. A Selective Distance-Based Paper Analytical Device for Copper(II) Determination Using a Porphyrin Derivative. *Talanta* **2017**, *174*, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.041>.
- (27) Gabriel, E. F. M.; Garcia, P. T.; Cardoso, T. M. G.; Lopes, F. M.; Martins, F. T.; Coltro, W. K. T. Highly Sensitive Colorimetric Detection of Glucose and Uric Acid in Biological Fluids Using Chitosan-Modified Paper Microfluidic Devices. *The Analyst* **2016**, *141* (15), 4749–4756. <https://doi.org/10.1039/C6AN00430J>.
- (28) Evans, E.; Gabriel, E. F. M.; Coltro, W. K. T.; Garcia, C. D. Rational Selection of Substrates to Improve Color Intensity and Uniformity on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *The Analyst* **2014**, *139* (9), 2127–2132. <https://doi.org/10.1039/C4AN00230J>.
- (29) Curto, V. F.; Lopez-Ruiz, N.; Capitan-Vallvey, L. F.; Palma, A. J.; Benito-Lopez, F.; Diamond, D. Fast Prototyping of Paper-Based Microfluidic Devices by Contact Stamping Using Indelible Ink. *RSC Adv.* **2013**, *3* (41), 18811. <https://doi.org/10.1039/c3ra43825b>.

(30) Peters, K. L.; Corbin, I.; Kaufman, L. M.; Zreibe, K.; Blanes, L.; McCord, B. R. Simultaneous Colorimetric Detection of Improvised Explosive Compounds Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (PADs). *Anal. Methods* **2015**, *7* (1), 63–70. <https://doi.org/10.1039/C4AY01677G>.