



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Infusioen ahalmen
antioxidatzailearen determinazioa
Folin-Ciocalteu erreakzioa eta
irudi digitalen analisi bidez**

*Jokin Ezenarro, Ane Bordagaray
eta Rosa García-Arrona*

87-93 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.11>



Infusioen ahalmen antioxidatzailearen determinazioa Folin-Ciocalteu erreakzioa eta irudi digitalen analisi bidez

Ezenarro, J.; Bordagaray, A. eta García-Arrona, R.

Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
jezenarro001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Infusio mota ezberdinek duten ahalmen antioxidatzailea aztertzeko metodo berri bat garatu da Folin-Ciocalteu erreakzioa oinarritzat hartuz, honela determinazio kolorimetrico bat egin ahal izateko irudi digitalen analisi bidez. Horrez gain, metodo berri honen optimizazioa, baldintzen azterketa eta automatizazioa garatu dira, helburu honetarako ez ezik argi ikuskorra absorbatzen duen edozein konposaturaren irudi digitalen analisi bidezko determinaziorako baliagarria den inguruko argiaren zuzenketa eta *on-line* programa bat garatuz: MADDI.

Hitz gakoak: antioxidatzaile, Folin-Ciocalteu, irudi digital, kolorimetria, argi

Abstract

A new method has been developed for the determination of the antioxidant capacity of infusions based on the Folin-Ciocalteu method, so a colorimetric determination can be carried out by analysis of digital images. Furthermore, the analysis conditions of this method have been examined, optimized and not just for this method but for the determination of any visible light absorbing compound a light correction and an on-line program for the automation of the picture processing have been developed: MADDI.

Keywords: antioxidant, Folin-Ciocalteu, digital image, colorimetry, light

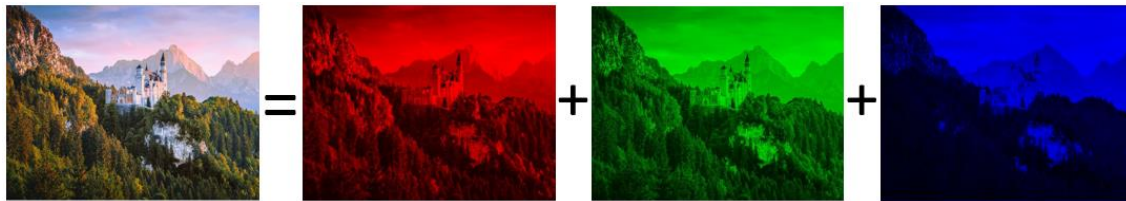
1. Sarrera eta motibazioa

Disoluzio baten ahalmen antioxidatzailea espezie oxidatzaileak desaktibatzeke duen gaitasuna da. Espezie oxidatzaile hauek kaltegarriak dira giza organismoarentzat, zahartze zelularra eta erlazionatutako hainbat gaixotasun sortzen baitituzte: gaixotasun kardiobaskularrak, minbiziak, osteoporosia... eta gaixotasun neurodegeneratiboetan eta diabetes mellitusean eragina izan dezakeela uste da (Scalbert et al., 2005).

Elikagai baten ahalmen antioxidatzailea hain garrantzitsua izaki, gure eguneroko dietaren bidez lortzen dugun ahalmen antioxidatzailea ezagutzea oso baliagarria izan daiteke. Honetarako erabiltzen den erreferentziatzeko metodoa Folin-Ciocalteu erreakzioan eta espektrofotometroan oinarritutakoa da (Folin eta Ciocalteu, 1927): erreakzio honetan wolframio eta molibdeno gatzak antioxidatzaileekin erreakzionarazten dira ingurune basikoan, lehen hauek erreduzituz molibdeno urdina lortzeko, disoluzioari kolore urdin iluna emanez, eta honek absorbatzen duen argia espezie antioxidatzaileen kontzentrazioarekiko proportzionala izanik. Ondoren argiaren absorbantzia hori espektrofotometro batekin neurtzen da 765 nm-ko uhin-luzeran. Infusioetan espezie antioxidatzaile ezberdinak daudenez, azido galikoaren (ohiko antioxidatzaile ezagun eta eskuragarria) kontzentrazio baliokideetan adierazten da disoluzio hauen ahalmen antioxidatzailea.

Lan honen helburua, ordea, metodo berri, fidagarri, azkar, merke eta berdeagoa garatzea da, Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarrituz. Horretarako irudi digitalen analisia erabili da, irudi bat gorputzek absorbatzen duten argi ikuskorra neurtzeko beste modu bat besterik ez baita. Argazki digital batek irudia pixeletan banatzen du, sare bat balitz bezala, eta pixel bakoitzeko kolorea hiru kolore primarioen konbinazio gisa osatzen du, 1. irudian ikus daitekeen bezala: kolore hauei kanalak deritze (Red, Green eta Blue kanalak; R, G eta B deituak). Disoluzio bati argazkia atera ondoren, disoluzio hori ageri den pixelak iruditik banatu eta kanal hauetan dituzten balioak erabiliz absorbantziaren baliokide bat lortu daiteke, kolorimetria tradizionalan bezala kontzentrazioarekin erlazionatu daitekeena hau determinatzeko.

1. irudia. Argazki baten deskonposaketa R, G eta B kanaletan, hurrenez hurren.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Irudi digitalen analisi bidezko teknika analitikoak bogan daude eta hainbat ikerkuntza lerrok hartu dute hau oinarritzat, hala nola mikroplaketan disoluzioak prestatuz eta eskaner batekin irudia lortuz (Vidal et al., 2018), eta berau Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarrituz garagardoan ahalmen antioxidatzailea neurtzeko (Martins Ledesma et al., 2019). Bestalde, beste ikerketa batzuetan telefono mugikorreko argazkiak eta argi baldintza kontrolatuak (kutxa itxia, LED argiak...) erabiliz egin dira determinazioak (Silva eta Rocha, 2020).

Baina lan honen helburua irudi digitalen bidezko analisiaren bidez infusio ezberdinen ahalmen antioxidatzailea neurtzea da, telefono mugikorra bakarrik erabiliz, beste inolako aparailu edo muntaiaren beharrik gabe. Horretarako inguruko argi naturalaren zuzenketa matematiko bat garatu nahi da, irudien prozesamenduan aplikatuz inguruko argiaren barietaziotik datorren errorea minimizatzen.

3. Ikerketaren muina

3.1. Erreakzio kolorimetrikoa

Antioxidatzaileak diren espezieen kontzentrazioa determinatu nahi bada kolorimetriaz, beharrezkoa da hauek argi ikuskorra absorbatzea eta absorzioa intentsua eta kontzentrazioarekiko proportzionala izatea. Hau ez denez horrela beharrezkoa da ahalmen antioxidatzailearekiko proportzionala den koloredun espezie bat sortzea, eta hori egitea ahalbidetzen duena Folin-Ciocalteu erreakzioa da.

Folin-Ciocalteu erreakzioa mikroplaka batean burutu da. Mikroplaka hauek hainbat abantaila dituzte: bolumen oso txikiak egin daitezke lan (400 μ L-koak dira putzuak), argazkia ateratzeko egokiak dira, mugikorrak, egonkorak eta 96 putzu dituztenez kalibratua zein hainbat lagin, bakoitzaren behar adina erreplikarekin, plaka berean prestatu eta determinatu daitezke.

Erreakzio honek lau pauso ditu: lehenik espezie antioxidatzaileak dituen lagina gehitzen da putzura. Bigarren, Folin-Ciocalteu erreaktiboa komertziala gehitzen zaio (20 μ L, soberan) eta ondo nahasteko 5 bat minutu eman ondoren sodio karbonato disoluzio bat (64 μ L, 100 mg/L) gehitzen da ingurunea basikotzeko. Azkenik, karbonatoak deskonposatzean sortzen dituen karbono dioxido burbuilek ihes egin ondoren, edo hala ez bada, kendu ondoren, ur bidestillatuarekin guztiz betetzen da putzua gainazala laua izan dadin (kapilaritateagatik ahurra edo ganbila bada argazkia ateratzerakoan distirak sortu eta arazoak eman baititzake). Erreakzioa ez denez berehalakoa, posible den kolore gehiena lor dadin bi ordu itxaroten da argazkia atera aurretik.

3.2. Datuen neurketa eta prozesamendua

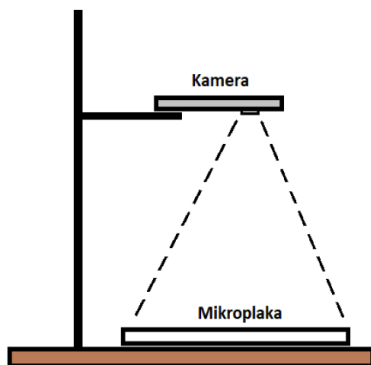
Argazkia ateratzeko 2. irudian ikusten den muntaia erabili da, mikroplaka hondo zuri baten gainean ipiniz eta mugikorra metro erdi inguruko altueran, mikroplakarekiko paralelo. Honela 3. irudikoa bezalako argazkiak lortzen dira, perspektibarik eta distirarik gabeak, prozesamendua erraztuko dutenak.

Irudi digitala lortu ondoren hau prozesatu beharra dago, erabili den putzu bakoitzeko disoluzio bakoitzaren batezbesteko R, G edo B balioak lortu ahal izateko. Horretarako garatu da MADDI on-line¹ (Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images) programa, aurreko lan batean (Ezenarro, 2020) garatutako mahaigaineko MADDItik abiatuz: programa honetan irudia kargatu ondoren, bertan mikroplaka kokatzen da, marko batekin lerratuz, ondoren, programak

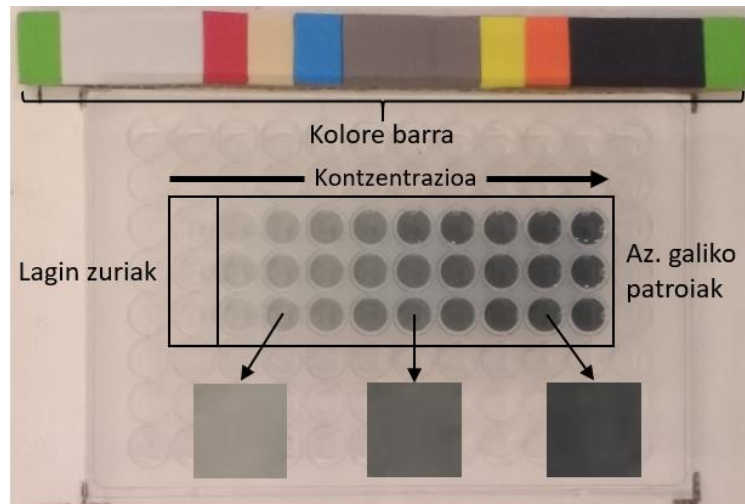
¹ maddi-project.github.io

automatikoki putzu bakoitzetik nahi hainako pixel kopurua (kasu honetan 10x10eko lauki bat, 100 pixel) hartu eta hauen batezbestekoak kalkulatzen ditu 3 kanalentzat.

2. irudia. Argazkiak ateratzeko erabilitako muntaia.



3. irudia. Argazki baten adibidea.



Balio hauek ez dira, ordea, kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak, beraz, absorbantziarekiko balioidea eta kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala den balioa kalkulatu beharra dago, (1) ekuazioa erabiliz (Abderrahim et al., 2016):

$$A_K = \log(I_K/I_{K0}) \quad (1)$$

K: R, G edo B; A_K : Laginaren absorbantzia K kanalean; I_K : Laginaren pixelen batezbesteko balioa K kanalean; I_{K0} : Lagin zuriaren pixelen batezbesteko balioa K kanalean.

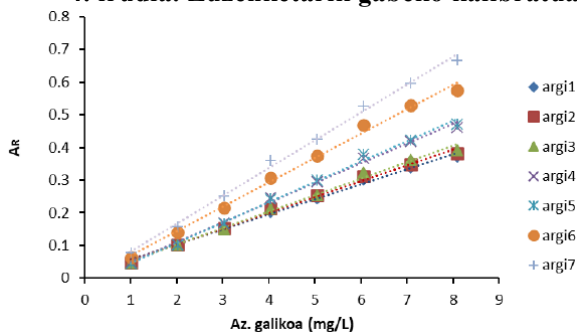
Argazkiak ez direnez argi baldintza kontrolatuetan ateratzen, mikropelaka beraren bi argazkik absorbantzia balio ezberdinak izan ditzakete, nahiz eta lagin zuriarekiko normalizatzeak errorea txikitzen duen. Hau ez da arazoa laginak eta kalibratua argazki berean daudenean, baina argazki ezberdinetako disoluzioak alderatu nahi direnean errorea handia izan daiteke. Horregatik ondorengo zuzenketa proposatu da: mikropelakaren ondoan kolore barra bat jarri da (ikus 2. irudia), beti kolore berdina izango dituen, eta argazkitik honen kolore bakoitzaren R, G eta B balioak atera dira lehen azaldu bezala MADDIrekin. Azkenik balio guzti hauen batezbestekoa kalkulatu da, Z balioa deitu zaiona, eta argazki bakoitzari bereizgarria zaiona, argi baldintzen indikatzailea. Balio honekin hainbat zuzenketa probatu ondoren egokiena (2) ekuaziokoa dela ondorioztatu da (Ezenarro, 2020):

$$A_{Kzuz} = A_K \cdot \sqrt{Z} \quad (2)$$

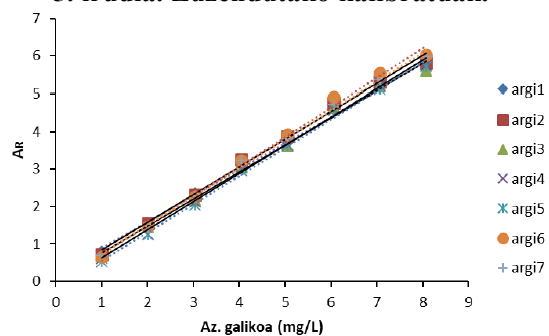
A_K : Laginaren absorbantzia K kanalean; A_{Kzuz} : Laginaren absorbantzia zuzendua K kanalean;
Z: Argiaren indikatzailea erabili den argazkian

Zuzenketa hau probatzeko 2. irudikoa bezalako mikropelaka bat prestatu da, azido galiko patroiez osatutako kalibratu bat duena, eta argi baldintza ezberdinetan atera zaizkio argazkiak. Ondoren, argazki hauek prozesatu eta absorbantzia balioak zuzendu gabe (4. irudia) eta (2) ekuazioko zuzenketarekin (5. irudia) irudikatu dira.

4. irudia. Zuzenketa rik gabeko kalibratuak.



5. irudia. Zuzendutako kalibratuak.

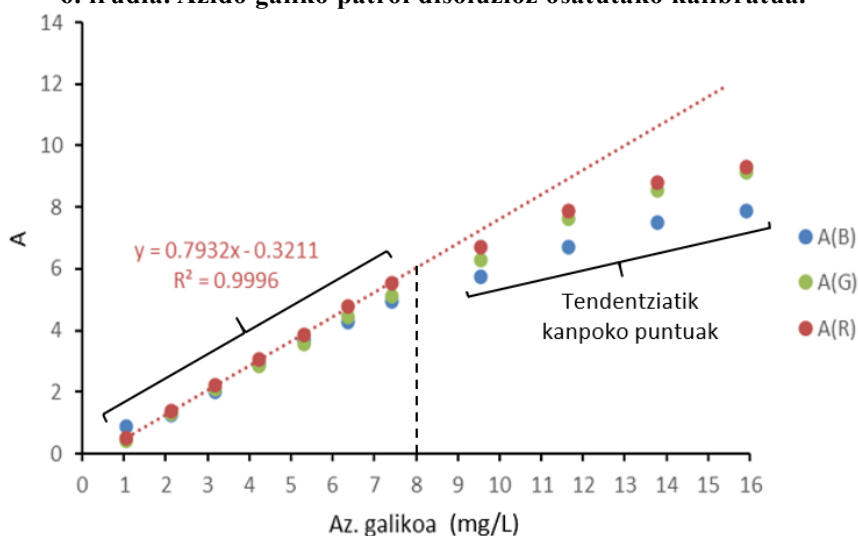


4. eta 5. irudietan ikus daitekeenez zuzenketa honek maldak berdintzen ditu, kasu honetan zuzenen malden arteko RSDa (Relative Standard Deviation, balio baten neurketa ezberdinen arteko aldakortasuna hauen batezbestekoarekiko normalizatuta) % 24 izatetik % 4 izatera igaro da, eta horren ondorioz neurketen estimatutako errorea % 25etik % 5era jaitsi da. Baina zuzenketa honek funtzionatu dezan beharrezkoa da mugikorren kameraren argiaren zuzenketa automatikoa desaktibatzea eta argazkiak eskuzko konfigurazioarekin ateratzea, guztiak berdin.

3.3. Metodoaren balioztatzea

Behin erabiliko den prozedura eta datuen prozesamendua zehaztuta, metodoa balioztatu beharra dago egingo diren analisisien emaitzak fidagarriak direla ziurtatzeko eta zein baldintzetan egin daitezkeen aztertzeko. Horretarako ondorengo parametroak aztertu dira azido galiko patroien kalibratutik (6. irudia) abiatuz: tarte lineala, detekzio eta kuantifikazio mugak, doitasuna eta zehaztasuna.

6. irudia. Azido galiko patroien disoluzioz osatutako kalibratua.



Lehenik erabiliko den kanala hautatu beharra dago, kolore ezberdineko disoluzioentzat ezberdina baita. 6. irudian ikus daitekeenez hiru kanaletan absorbantzia ona eta kontzentrazioarekiko proportzionala izan arren R kanalean apur bat handiagoa da, beraz, honekin egin da lan metodoaren sentikortasuna hobetze aldera.

Tarte lineala, seinalea eta kontzentrazioa zuzenki proportzionalak diren tartea, determinatzeko, zuzenaren R^2 erabili da irizpidetzat, 8 mg/L inguru arte 0,999-koa izanik, tarte lineala 1-8 mg/L azido galiko da. Hortik aurrerako puntuak joera linealetik kanpo daude. Infusioak matrize konplexuak direnez posible liteke disoluzioan dagoen beste substantziaren batek seinalean eragitea. Horregatik patroien gehikuntza erabiliz probak egin dira, ondorioztatuz matrize efektua ez dela adierazgarria.

Detekzio muga (LOD) eta kuantifikazio muga (LOQ) ziurtasun estatistiko adierazgarriarekin detekta daitezkeen analito kontzentrazio txikiena eta ziurtasun estatistiko adierazgarriarekin kuantifikatu daitezkeen analito kontzentrazio txikiena dira hurrenez hurren. Hauek kalkulatzeko

6 lagin zuri prestatu dira eta hauen absorbantziak neurtu, ondoren hauen batezbestekoa eta desbideratze muga hauek kalkulatu: LOD: 0,10 mg/L az. galiko eta LOQ: 0,33 mg/L az. galiko. Muga hauek infusioek dituzten kontzentrazioak baino askoz ere baxuagoak direnez eta tarte linealaren hasierako muturra bakarrik hartzen dutenez egokiak dira lan honetarako.

Metodoaren doitasuna aztertzeko bi parametro neurtu dira: errepikakortasuna eta erreproduzigarritasuna. Ezaugarri hauek metodoaren sendotasunaren adierazgarri dira, hau da, baldintzak apur bat aldatuta ere emaitzak fidagarriak direla ziurtatu nahi da. Errepikakortasuna ikusteko momentu berean 6 mikropilaka prestatu dira, kontzentrazio ezberdinetako disoluzio berdinekin guztietan, eta hauek jada sortutako kalibratuarekin determinatu ondoren balioen batezbesteko RSDa kalkulatu da: % 2,6koa. Erreproduzigarritasuna ikusteko, berriz, aurrekoak bezalako 2 mikropilaka prestatu dira egunean, 3 egun ezberdinetan, eta disoluzio hauek ere determinatuta RSDa kalkulatu da: % 2,9koa. 1 mg/L-ren ordenean dauden kontzentrazioentzat onargarritzat hartzen diren errepikakortasuna eta erreproduzigarritasunaren RSDak % 11 eta % 16rainokoak dira hurrenez hurren (AOAC, 2016). Beraz, kontuan hartu beharra dagoen arren ez dela egin parametro hauen behar bezalako ikerketa sakona (baliabide eta denbora faltagatik) metodoa sendoa dela esan daiteke.

3.4. Lagin errealen analisisa

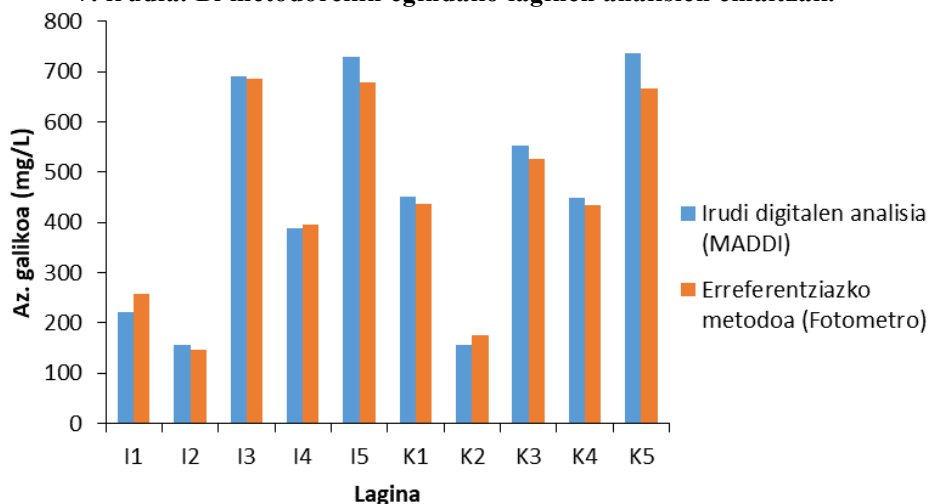
Zehaztasuna lortutako emaitzen eta benetako balioen arteko antzekotasuna da, hau aztertzeko lagin errealek erabili dira, 1. taulan agertzen diren laginak hain zuzen. Bost lagin solido komertzial (I1-I5), infusio poltsatxoak, eta bost lagin likido komertzial (K1-K5), te infusioetan oinarritutako edari freskagarriak. Lagin solidoak determinatu ahal izateko urarekin erauzi dira, eta erauzketaren aldagaiak (tenperatura, denbora, bolumena...) optimizatzeko esperimentuen diseinua erabili da.

Estatistikaren adar honek esperimentu gutxiago baina adierazgarriagoak eginez prozesuan eragina duten aldagaiak duten jokaera ondorioztatzea ahalbidetzen du. Honela aldagai bat aztertzeko besteak finkatu beharrean guztiak batera aldatzen dira, hauen maila altu eta baxuen konbinazio adierazgarri guztiak errepikatuz esperimentua, ondoren datu hauetatik interesekoa den propietatearen eta aldagaien arteko erlazioa ezagutzeko.

Hau eginez ondorioztatu da ahalmen antioxidatzailea erauzketarako erabilitako tenperatura eta denborarekiko zuzenki proportzionala dela, beraz, uraren lurruntze tenperaturak eta denborak mugatuta, normalean etxean infusioak prestatzeko erabiltzen diren antzeko baldintzekin egin dira erauzketak: 200 mL ur bidestilatutan, 100 °C-tan eta 5 minutuz.

Lagin hauei tarte linealaren erdialdean sartzeko egokiak diren diluzioak aplikatu ondoren bi modutara determinatu zaie ahalmen antioxidatzailea: balioztatu nahi den irudi digitalen analisi bidez eta erreferentziako metodoa den espektrofotometro ultramore-ikuskorra erabiliz, biak Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarrituak. Honela metodo berriarekin lortutako emaitzak eta emaitza ontzat hartu daitezkeen erreferentziako metodoarekin lortutakoak alderatu ahal izateko.

7. irudia. Bi metodorekin egindako laginen analisisen emaitzak.



7. irudian ikus daitekeenez bi metodo hauek erabiliz lortutako emaitzak berdintsuak dira. Ezberdintasun hau kuantifikatzeko errore erlatiboa kalkulatu da, guztien batezbestekoa % 6,5ekoa izanik.

Analisi hauen emaitzak 1. taulan ageri dira, lagin solidoenak erabili den lagin solidoaren masarekiko normalizatu dira. Ikus daitekeenez ahalmen antioxidatzailea asko aldatu daiteke infusio motaren arabera.

Te lagin solidoak eta likidoak elkarren artean alderatuz gero ahalmen antioxidatzailearen arabera ordenatu daitezke: $K5 > K3 > K1 > K4 > K2$ eta $I5 > I3 > I4$. Eta 1. taularekin alderatuz halako erlazio bat antzeman daiteke:

Te zurian oinarritutako infusioa da ahalmen antioxidatzaile handiena duena, ondoren, te berdean oinarritutakoak, eta azkenik, te gorria eta te beltza. Kontuan hartuz gero te mota guztiak landare berdinetik eratorriak direla eta ezberdintasun bakarra hauek prozesatzeko modua dela, ondorioztatu daiteke prozesamendu honek infusioen ahalmen antioxidatzailean eragina duela. Te zuria lortzeko hosto gazteak bildu eta denbora gutxira txigortzen dira, oxidazioa mugatuz (Zhao et al, 2019). Te berdea lortzeko hosto helduak bildu eta berehala txigortu edo lurrun bainua aplikatzen zaie, oxidazio gutxi jasaten dutelarik (Graham, 1992). Te gorria lortzeko, ordea, hosto helduak bildu ondoren lehortu eta zuritu egiten dira eta hartutik utzi, kolore gorrixka ezaugarria lortuz. Azkenik, te beltza lortzeko hosto helduak bildu ondoren lehortu eta zuritu egiten dira te gorria bezala, baina ondoren mazerazioa izeneko prozesu bat aplikatzen zaie, egitura zelularra hautsiz, entzimak askatuz eta hostoaren oxidazio totala emanez (Stodt, 2014).

1. taula. Irudi digital bidez egindako lagin errealeen analisisen emaitzak.

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

Beraz, esan daiteke tearen prozesamenduak eta bertan jasaten duen oxidazioak eragin zuzena duela ondoren hauen infusioek izango duten ahalmen oxidatzailean, prozesuan zenbat eta gehiago oxidatu orduan eta antioxidatzaile eduki txikiagoa izango baitute infusioak prestatzeko erabiltzen diren hostoek.

4. Ondorioak

Metodo berri hau aztertu ondoren esan daiteke oso erabilgarria dela testuinguru jakin batzuetan. Irudi digitalen analisi bidezko kolorimetria ez da inoiz espektrofotometro bidezko kolorimetria bezain zehatza eta fidagarria izango, noski, ohiko metodoekin lortu daitezkeen emaitzek ziurgabetasun txikiagoa baitute, baldintzak askoz kontrolatuagoak direlako.

Baina metodo honek beste abantaila batzuekin osatzen du erabilgarritasuna: merkea da, edonork du mugikor edo kamera digital bat eskura, inbertsio handirik egin gabe. Gainera eramangarria da eta ez du sekulako muntaiarik behar. Bestalde, mikroplakak erabiltzeko 96 disoluzio batera analizatzea ahalbidetzen du, analisi eta prestatuta denborak asko murriztuz. Horrez gain, bolumen oso txikiarekin egin daiteke lan, laginaren eskuragarritasuna txikia bada oso baliagarria eta erabili beharreko produktuak arriskutsuak edo kaltegarriak badira hare gehiago. Azkenik, inguruko argiarekiko absorbantziaren zuzenketa argazki bakoitzean laginak eta patroiak eduki beharra baztertzen du, kalibratua behin bakarrik prestatuta lan egitea ahalbidetuz. Halere, zuzenketa hau aplikatzerakoan ikusi da erroreak egon daitezkeela argazki ezberdinak

erabiltzerakoan ez bada modu egokian egiten, espektrofotometro batekin ez bezala analista trebatu eta esperientziaduna beharrezkoa da emaitzak fidagarriak izango badira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan ikusi denez ez da beharrezkoa argi baldintzak kontrolpean izatea, posible da datuen tratamendu egoki batekin errore hori minimizatzea, baina lan honetan proposatu den zuzenketa ziurrenik ez da optimoa, aurkitu den egokiena baizik, aukera eta metodo gehiago aztertu beharra dago. Hala nola, datu hauen prozesamendua automatizatzeko garatu den programa, MADDI, zabaltzen eta hobetzen jarraitu daiteke, erabilerrazagoa eta azkarragoa izan dadin, kalibratuak eta azterketa estatistikoak egin ditzan, etab. Gainera, absorbantziaren zuzenketa oso on bat lortuko balitz posible litzateke erreakzio kolorimetriko ezberdinentzat kalibratuen datu base bat sortzea, hala nola aplikazio batean, *screening* probak egiteko bada ere.

6. Erreferentziak

- Abderrahim, M., Arribas S. M., Condezo-Hoyos, L. (2016): A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods, *Talanta*, 152, 82-89.
- AOAC International. (2016): Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
- Ezenarro J. (2020), Polifenol eduki totalaren determinazioa irudi digitalen analisi bidez eta hauen tratamendurako softwarearen garapena. Kimikako Gradu Amaierako Lana, Kimika Fakultatea, EHU.
- Folin, O. eta Ciocalteu. V. (1927), On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.
- Graham, H. N. (1992), Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry, *Preventive Medicine*, 21 (3), 334-350.
- Martins Ledesma, C., Mascarenhas Krepsky, L., Marcel Borges, E. (2019), Using a flatbed scanner and automated digital image analysis to determine the total phenolic content in beer, *Journal of Chemical Education*, 96, 10, 2315-2321.
- Stodt, U. W., Blauth, N., Niemann, S., Stark, J., Pawar, V., Jayaraman S., Koek. J., Engelhardt. U. H. (2014): Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (31), 7854-7861.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy C., Jiménez, L. (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.
- Silva, A. F. S. eta Rocha, F. R.P. (2020), A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry, *Food Control*, 115, 107299.
- Vidal, M., Garcia-Arrona, R., Bordagaray, A., Ostra M., Albizu G. (2018), Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis, *Talanta*, 158, 58-64.
- Zhao, C. N., Tang, G. Y., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Liu, Q., Mao, Q. Q., Shang, A., Li, H. B. (2019), Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, Oolong, white, yellow and dark teas, *Antioxidants*, 8, 215.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Euskal Herriko Unibertsitateak (GIU 19/13 proiektuak) emandako diru-laguntzei esker eraman da aurrera.

Lan hau Gradu Amaierako Lan baten memoriatik eratorri da (Ezenarro, 2020).

MADDI *on-line* programa erabili nahi izanez gero jarri artikulu honen egilearekin kontaktuan.