

Métodos de captación de imágenes

En junio de 2003 tuvo lugar la asamblea anual «Bildschaffende Methoden» (Métodos de captación de imágenes) del Instituto de Investigación am Goetheanum de Dornach, Suiza. En los siguientes artículos los ponentes sintetizaron sus exposiciones. Lamentablemente no se han podido tener en cuenta las ponencias breves y las intervenciones en los debates. La ponencia de Haijo Knijpena y Beatrix Waldburger está incluida dentro de este ejemplar, en el artículo «Diseño experimental para investigaciones en hojas vegetales mediante el procedimiento de la cristalización sensible».

Análisis de la dependencia temporal de los procesos de cristalización en el caso de la cristalización del cloruro de cobre como condición para la validación del método

*Johannes Kahl, Nicolaas Busscher, Gaby Mergardt, Jens-Otto Andersen,
Machteld Huber, Angelika Meier-Ploeger*

Planteamiento del problema

El interés de los consumidores por obtener alimentos sanos y seguros va en aumento (*Hammet al. 2002*). Por ello la confianza en la seguridad de los productos ecológicos, así como la creencia de que éstos contribuyen de forma importante a la salud de cada persona, están entre los principales criterios de los consumidores a la hora de comprar. Si se toman las exigencias de los consumidores como criterio de medición para valorar la calidad ecológica de los alimentos, entonces hay que volver a tener más en cuenta y a valorar la calidad referida al producto, además de la calidad referida al proceso (sello de biocalidad, Reglamento Ecológico de la CEE 2092/91). La calidad referida al producto sólo puede medirse en su conjunto como suma de análisis específicos selectos (por ejemplo de vitaminas). En la investigación comparada de la calidad referida al producto de alimentos cultivados y procesados de forma ecológica y convencional, se están aplicando cada vez más nuevos métodos que se consideran como algo que faltaba para complementar la determinación analítica de sustancias. En ellos se parte de que el análisis de los parámetros de calidad externos e internos sólo recoge aspectos parciales de la calidad, mientras que con los métodos complementarios se puede llegar a una explicación «integral» («el todo es más que la suma de sus partes») (*Meier-Ploeger/Vogtmann 1991*).

¿Por qué una validación?

El método de la cristalización del cloruro de cobre se aplica con éxito para la averiguación de la calidad integral de los alimentos (*Balzer-Graf 1994, Andersen et al. 2001*). De este modo, según declaran éstos autores, se puede comprobar tanto la influencia de los diferentes sistemas de cultivo como de los diversos pasos en el procesamiento de plantas y de productos vegetales. Para poder aplicar habitualmente el método de averiguación de la calidad de los productos ecológicos hay que validar el método, pues de lo contrario no podrán aceptarse los resultados en el terreno científico ni utilizarse en el terreno jurídico. La validación significa comprobar si por medio de este método puede responderse inequívocamente una determinada cuestión (*Kromidas 2000, DIN ISO 17025*). El enfoque metódico (*Kahl et al. 2002*) viene determinado por el modo de plantear el problema. En el enfoque elegido, que parte del reclamo de una validación de procedimientos y métodos, existen cuatro posibilidades distintas de comparar las investigaciones sobre la calidad: determinando la precisión de repetición (*repeatability*), la precisión de laboratorio (*intermediate precision*), la precisión de comparación (*reproducibility*) o la robustez metódica (*robustness*) (v. *Kromidas 2000*).

Para poder analizar estas características de procedimiento, hacen falta:

1. material probatorio definido en cantidad suficiente;
2. procesos de laboratorio documentados;
3. valoración estadística de los resultados;
4. más de tres laboratorios que trabajen con el método.

Estos análisis no son posibles si partimos de los resultados de los trabajos de otros autores publicados hasta ahora sobre la cristalización del cloruro de cobre, exigiéndose al método:

- que sea objetivo, es decir que el resultado pueda establecerse de forma inequívoca por parte de la persona del evaluador;
- que sea fiable, es decir que al repetirlo varias veces se obtengan los mismos resultados;
- que sea válido para un ámbito preestablecido, es decir que el resultado refleje las características esenciales para la cuestión.

En opinión de los autores, la cristalización del cloruro de cobre se puede validar según las especificaciones del procedimiento DIN ISO 17025. Se pueden analizar algunas características del procedimiento tales como la precisión y la robustez.

Métodos

Pruebas de alimentos

La validación de procedimientos y métodos debería realizarse con material biológico de ensayo procedente de ensayos de cultivos como el ensayo DOK (comparación de cultivos biológico-dinámicos, ecológicos y convencionales, FIBL/CH). El material de ensayo se presenta en una cantidad suficiente y una entidad independiente se encarga de codificarlo y de enviarlo. No obstante, las pruebas alimentarias están sometidas con el tiempo a una modificación natural, con lo que dejan de ser válidas para una investigación sistemática plurianual. Para las investigaciones que se presentan aquí se han empleado ensayos con zanahorias procedentes del comercio ecológico.

Substancias químicas

Para la cristalización se pueden emplear también sustancias químicas cuyo comportamiento se pueda comparar con el de los ensayos biológicos de la fase de «cristalización» (*Morris/Morris*, 1939, *Ballivet et al.* 1999). Como sustancia de referencia se empleó la molécula de pirrolidona de polivinilo (PVP), la cual ya se ha probado con éxito con el método (*Andersen et al.* 1998).

Cristalización

En el caso de la cristalización del cloruro de cobre cristaliza una solución acuosa de cloruro de cobre resultando en un típico dibujo (*Beckmann* 1959). Los aditivos tales como extractos vegetales influyen en este dibujo de manera característica, estando el dibujo (elementos estructurales: ramificación, moldes huecos, grosor de aguja) en función de la concentración (*Petterson* 1967, *Engquist* 1970, *Selawry/Selwary* 1957). Para cada material de ensayo (por ejemplo zanahoria, cereales) se puede averiguar una determinada proporción de mezcla con la que el dibujo se diferencia del de otros ensayos (*Balzer-Graf/Balzer* 1991). La diferenciación se puede perfeccionar optimizando las condiciones experimentales límite, siendo la temperatura y la humedad las principales variables activas que influyen en la cristalización (*Andersen* 2001, *Ballivet et al.* 1999). Con ello se obtiene un dibujo de cristal característico para cada material de ensayo. Las investigaciones sobre la influencia de la proporción de la mezcla sobre determinados elementos estructurales definidos del dibujo cristalino ya se han explicado en otros trabajos (*Andersen et al.* 2003).

Cámaras climatizadas

La cristalización se produce en cámaras climatizadas, construidas adecuadamente para ello, cuya unidad de evaporación esté montada exenta de vibraciones (para una descripción más detallada de las cámaras, véase *Andersen* 2001). En un desarrollo más reciente Andersen incorporó un segundo anillo de modo que pudieran investigarse 43 placas por cada pasada (c. *Busscher et al.* 2003). La verdadera unidad de evaporación se halla en un habitáculo (cámara exterior), cuyos parámetros climáticos de temperatura y humedad se mantienen igualmente constantes. Las condiciones climáticas de la unidad de evaporación y de la cámara exterior se miden y se supervisan *online* constantemente y en diversos puntos. Hay dos sensores encima de los auténticos anillos cristalinos de la unidad de evaporación y dos sensores, uno en la pared interior y otro en la exterior de la cámara de cristalización. Adicionalmente, por medio de una estación meteorológica se van registrando de forma continua los datos meteorológicos dominantes en el momento del experimento. La documentación de las correspondientes fases del proceso y la recopilación de las condiciones existentes durante la secuencia de ensayo se recogen de manera asistida por ordenador.

Evaluación de imagen

La evaluación visual de las imágenes según criterios definidos (elementos estructurales) se complementa mediante un análisis de textura asistido por ordenador. Para la evaluación de imagen asistida por ordenador se escanean las imágenes y se analiza estadísticamente la textura a través de una transformación de la distribución de la escala de grises (*Andersen et al.* 1999).

La averiguación de las características del procedimiento se realiza en tres laboratorios preparados especialmente para este propósito con cuatro cámaras de estructura idéntica (una en el Instituto Louis Bolk /NL, otra en Hertha/DK, dos en la Universidad de Kassel/D). La coordinación de este proyecto triangular la lleva la universidad de Kassel. Los tres laboratorios aplican los mismos procedimientos documentados para todas las fases del procedimiento.

Resultados

Documentación

Para cada fase del proceso se han desarrollado documentos normativos que describen todas y cada una de las fases del proceso. Las correspondientes normas nacionales e internacionales para el trabajo en laboratorio sirvieron de modelo de referencia para la elaboración de documentos, habiéndose tenido especialmente en cuenta las peculiaridades del método en todas sus fases.

La documentación de laboratorio asistida por ordenador (véase fig. 1) hace posible un seguimiento de rastreo detallado de cada uno de los resultados de un análisis de calidad. En este proceso las pesadas de las sustancias y de las muestras así como el volumen de soluciones pipeteadas se vinculan en un documento con las posiciones en el anillo de cristalización y las condiciones durante la cristalización. Los volúmenes prefijados sobre sus correspondientes placas y la

proporción de mezclado de material y cloruro de cobre determinan de forma automática las correspondientes aportes de solución para la persona que realice el experimento.

Cámara climatizada

Se ha desarrollado una regulación de la climatización que permite mantener constantes las condiciones climáticas sobre el anillo y dentro de la cámara exterior, con independencia de las oscilaciones de la humedad exterior debidas a causas climatológicas. La temperatura de los anillos de cristalización y la temperatura y la humedad de la cámara exterior pueden ajustarse con precisión a $\pm 0,1$ °C y a $\pm 0,5$ % rh exactamente (véase fig. 2, siguiente página). Las puntas en la evolución de la humedad sobre el anillo (g/d) y sobre la pared interior (f) son las curvas de evaporación de la capacidad de una cámara. Con la documentación de laboratorio además se pueden poner en relación los tiempos (a averiguar manualmente) del comienzo de la cristalización en función de los dos anillos de cristalización y de las posiciones en el correspondiente anillo. Con ello se pueden determinar las posibles diferencias tanto entre los anillos como dentro de las posiciones (para averiguar la precisión de repetición).

Las condiciones de la cámara exterior influyen en las condiciones existentes sobre el anillo. Mediante la regulación de las condiciones de la cámara exterior y de la «cubierta» del depósito de agua de debajo del anillo, las condiciones iniciales se pueden predeterminar para cada pasada de cristalización. La variable activa es el comienzo de cristalización medio de las placas de todas las posiciones de ambos anillos que puedan ajustarse para cada medición y para cada cámara. El ajuste se efectúa modificando la humedad de dentro de la cámara exterior. La correlación estadística entre la humedad ajustada en la cámara exterior y la humedad siguiente de encima del anillo no se podía realizar todavía a causa de los efectos de la histéresis.

El comienzo de la cristalización dentro de un plazo de 43 posiciones en una medición no se efectúa al mismo tiempo, sino siguiendo una distribución estadística independiente de la correspondiente posición de la placa sobre el anillo. Tanto el PVP como las muestras de zanahorias muestran tal distribución, influyendo tanto la concentración como el material de ensayo en el curso de la curva. En la figura 3 se representa el número acumulativo de placas que ya han comenzado la cristalización dependiendo del tiempo después del comienzo de la evaporación siendo la ocupación de la cámara igual en los dos casos (PVP, muestras de zanahorias 50 % de ocupación de la cámara cada una)

fig. 1: Hoja de datos de la documentación de laboratorio asistida por ordenador

Visión general cámara desde el miércoles 1 de enero de 1003 hasta el sábado 1 de marzo de 2003
Humedad / Humedad absoluta en g / m³
Tiempo [...]

fig. 2: Humedad relativa (%) en el anillo (r/g) y dentro de la cámara exterior (c) antes (arriba) y después (abajo) de introducir la regulación precisa

La cristalización puede comenzar cuando se haya sobrepasado la concentración de saturación y a continuación se haya vaporizado la cantidad de agua correspondiente.

El momento del comienzo de la cristalización con la misma ocupación de cámara depende de la humedad relativa dominante sobre el anillo de cristalización (correlación $r_2 = 0,97$). Cuanto más alta sea la humedad tanto más tarde será el inicio de la cristalización (duración media). Una modificación de un 6% de la humedad relativa sobre el anillo produce un desplazamiento de los tiempos de hasta seis horas. Hay que investigar si esto depende exclusivamente de la humedad. La distribución estadística del comienzo de la cristalización para las 43 posiciones también depende de la humedad relativa ajustada sobre el anillo. Cuanto más alta sea la humedad relativa tanto más amplia será la distribución del comienzo de la cristalización en el interior de una cámara (correlación $r_2 = 0,89$). La influencia de los diferentes materiales de ensayo no se ha investigado todavía.

El tiempo hasta el comienzo de la cristalización influye en el cristalograma. Cuanto más larga sea la fase de evaporación (por causa de la humedad de inicio relativa sobre el anillo) tanto mayor será el diámetro de la estructura. Una representación logarítmica del diámetro de la estructura con respecto al tiempo del comienzo de la cristalización para dos concentraciones de ensayo de PVP con la misma concentración de cloruro de cobre arroja una correlación de $r_2 = 0,61$ y $0,55$.

Cristalización en min. / cantidades acumulativas comenzadas
Duración de la evaporación en horas

fig. 3: Cantidad acumulativa de las placas ya comenzadas en función del tiempo transcurrido después de haber pipeteado (Puntos: duración de la cristalización por placa)

El tipo de incremento (curso de una curva) el diámetro de la estructura con tiempo de evaporación creciente (hasta el comienzo de la cristalización) es diferente para el PVP y para las muestras de zanahorias, tal y como se muestra en la figura 4 (se ha determinado el diámetro porcentual de la estructura, donde el 100% significa que la muestra de cristal está estructurada por toda la superficie de la placa, a partir de uno o de varios centros). Con las muestras de zanahorias

parece haber un intervalo «sensible» del tiempo de evaporación en el que el diámetros de la estructura varía mucho. Hay que investigar qué otros factores influyen en la configuración de la imagen.

Todavía hace falta realizar investigaciones sobre la influencia de las condiciones de la cámara sobre la evaluación de imagen asistida por ordenador, y serán objeto de más investigaciones sobre el material de ensayo definido. En este punto se plantea la cuestión de reducir la dispersión mediante el proceso de cristalización y con ello mejorar la capacidad de separación del método en primer plano.

Conclusión

En el presente trabajo se describe el enfoque científico para la validación del método, investigándose sistemáticamente y valorándose estadísticamente la influencia de las condiciones de la cámara sobre el proceso de cristalización. Las condiciones climatológicas tienen un efecto significativo sobre el proceso de cristalización, tanto dentro de una pasada de cámara como en la comparación entre dos pasadas de cámara. Al ajustar la humedad inicial sobre el anillo, los valores de humedad que se han de alcanzar para ello varían de una cámara a otra; posteriores investigaciones indicarán si esto es atribuible a las diferentes distancias en la construcción de las cámaras (hasta 2 años de diferencia) en cada uno de los emplazamientos (adaptación del material).

Diámetro de estructura (%)

Tiempo después de pipetear (h:min)

fig. 4: Dependencia del diámetro de la estructura PVP (de puntos) y de muestras de zanahoria (de triángulos) del periodo comprendido entre el momento de pipetear la solución y el comienzo de la cristalización

Desde nuestro punto de vista es posible comparar las investigaciones sobre calidad con cristalización de cloruro de cobre si las condiciones límites experimentales se pueden conocer o se pueden controlar o medir. Es posible establecer las fases del proceso en documentos normativos y hacer el seguimiento de la secuencia de pruebas en su conjunto, siendo una condición añadida para poder comparar las investigaciones sobre calidad con cristalización de cloruro de cobre. Las investigaciones que se han presentado aquí sobre la robustez del método dentro de la fase de cristalización permiten la averiguación de la precisión de repetición y de laboratorio, siendo por tanto condición necesaria para poder averiguar la precisión de comparación con la ejecución de ensayos cooperativos. Sigue persistiendo inalterado el problema de la falta de patrones de referencia (y con ello de la comprobación de la exactitud).

Los autores/as agradecen a la empresa Eosta, de la fundación Iona Stiftung, a la señora y el señor Kindersley, de la fundación Software AG y a la fundación Triodos el apoyo financiero que han dispensado al proyecto.

Bibliografía

Johannes Kahl, Nicolaas Busscher, Gaby Mergardt, Angelika Meier-Ploeger
Universidad de Kassel
Departamento de calidad alimentaria ecológica y de cultura nutricional
Nordbahnhofstr. 1a
D-37213 Witzenhausen
kahl@wiz.uni-kassel.de

Jens-Otto Andersen
Asociación de Investigación Biodinámica
Landsbyvænget 7B
Herskind
DK-8464 Galten

Machtheld Huber
Instituto Louis Bolk
Hoofdstraat 24
NL-3972 Driebergen