



FACTIBILIDAD DEL USO DE MODELOS DE CLASIFICACIÓN SIMCA PARA LA DETECCIÓN DE OXITETRACICLINA Y SULFATIAZOL EN MIEL DE ABEJA

Karina Uribe-Hernández^a, Tzayhri Gallardo-Velázquez^a, Guillermo Osorio-Revilla^a, Norma Almaraz-abarca^b

^aEscuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, karinauribe@gmail.com, gtzayhri@yahoo.com, osorgi@gmail.com

^bCentro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional, Durango, almaraz@ipn.mx

RESUMEN

Este trabajo explora la posibilidad de utilizar la espectroscopia infrarroja en la región media (FTIR-MIR), acoplada a técnicas de reconocimiento de pautas supervisadas para desarrollar modelos para la clasificación de muestras de miel sin contaminar y dos grupos de muestras contaminadas con sulfatiazol y oxitetraciclina. Los modelos de clasificación para los tres grupos de muestras fueron desarrollados por la técnica de modelado independiente de clases (SIMCA), el cual se basa en construir un modelo independiente para cada una de las clases mediante la herramienta estadística análisis de componentes principales (PCA). Las distancias entre las clases (modelos) estuvieron por arriba de 6 y por debajo de 14 entre los tres grupos de muestras lo cual permitió visualizar adecuadamente los modelos en un espacio 3D (hiperboxes). Los modelos obtenidos fueron validados mediante validación externa con muestras no utilizadas para la construcción de los modelos dando tasas de reconocimiento y rechazo del 100% para todas las muestras.

1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes de la práctica apícola incluyen acaricidas, los repelentes de abejas utilizadas en la cosecha de miel, los plaguicidas para la polilla y los antibióticos. Los antibióticos se encuentran en gran parte en la miel porque se utilizan en la apicultura para el tratamiento de enfermedades bacterianas. Antibióticos como sulfatiazol, oxitetraciclina, estreptomina, enrofloxacin, etc, también se utilizan en la apicultura¹. Los métodos de análisis aplicados a la miel generalmente se agrupan en varios temas: determinación de origen botánico o geográfico, control de calidad de acuerdo a la normatividad vigente y a la detección de la adulteración o residuos. En todas estas áreas la espectroscopia infrarroja se ha aplicado recientemente ya que presenta un enfoque rápido, no destructivo y prometedor.

2. TEORÍA

Las técnicas de reconocimiento de pautas supervisadas tienen como fin desarrollar reglas de clasificación o modelado de clases para muestras (objetos) desconocidas a partir de un grupo de muestras conocidas (conjunto de calibración o training set), que están caracterizadas por los valores de las variables medidas².

El método SIMCA se basa en construir un modelo independiente para cada una de las clases mediante la herramienta estadística análisis de componentes principales (PCA). PCA reduce todas las variables (longitudes de onda) de los espectros obtenidos de cada clase a un menor número de variables. Los componentes principales (PC) son combinaciones lineales que contiene un mapa que describe las propiedades físicas y químicas de la muestra³. El número de componentes principales utilizado para cada clase explica un determinado porcentaje de la varianza en los



datos. El modelo SIMCA desarrolla una estructura geométrica conocida como hiperbox, que se construye alrededor de las muestras de cada clase, y los límites de este espacio se definen a un nivel específico de confianza.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Calibración del modelo SIMCA

A un grupo de muestras de miel se adicionaron sulfatiazol y oxitetraciclina en un intervalo de 10 a 1000 ppb, se obtuvieron sus espectros para la construcción de los modelos quimiométricos mediante el espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo GX junto con el aditamento de reflectancia total atenuada (HATR) con cristal de selenuro de zinc. Tomando 3 espectros de cada muestra mediante 64 barridos, resolución de 4 cm^{-1} en el intervalo de $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$. Para la calibración y optimización de los modelos cualitativos (SIMCA) se utilizó el programa AssureID[®] desarrollado por Perkin Elmer. Adicionalmente se obtuvieron los espectros de un conjunto de muestras sin ningún tipo de antibiótico. La técnica de modelado SIMCA fue aplicada a los espectros de tres conjuntos de muestras (clases) obtenidas en FTIR-MIR, se realizó primero la matriz de datos espectrales para su posterior procesamiento. Los modelos fueron creados utilizando el 80 % (27 muestras de cada clase) de las muestras como grupo de calibración y el 20% restante (3 muestras de cada clase) como grupo de validación, el modelo fue validado mediante validación externa con un 99% de confiabilidad, obteniéndose los resultados que a continuación se describen. Se realizaron un conjunto "n" de calibraciones, modificando diferentes opciones de procesamiento de datos con los cuales cuenta el programa AssureID, hasta realizar la optimización del modelo definitivo, es decir la obtención del modelo que mostrara una adecuada separación de las clases y un correcto reconocimiento o clasificación de muestras de validación. Las condiciones que se utilizaron para obtener el modelo optimado fueron las siguientes: se eligió un intervalo espectral entre $1450\text{-}600\text{ cm}^{-1}$; se eliminó el ruido electrónico en los intervalos $4000\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$; se utilizó un filtro para eliminar el ruido causado por dióxido de carbono y humedad ambiental, se aplicó un suavizado de 5 puntos, se corrigió la línea base espectral mediante derivada de segundo orden y finalmente se utilizó una normalización MSC o corrección multiplicativa de la dispersión. Bajo las características mencionadas se pudo observar que los conjuntos de muestras para cada clase se separaron, lo cual se indica como espacios definidos en 3D (hiperboxes) bajo tres colores distintos, Figura 1; es decir se desarrolló adecuadamente un modelo de clasificación para cada conjunto de muestras.

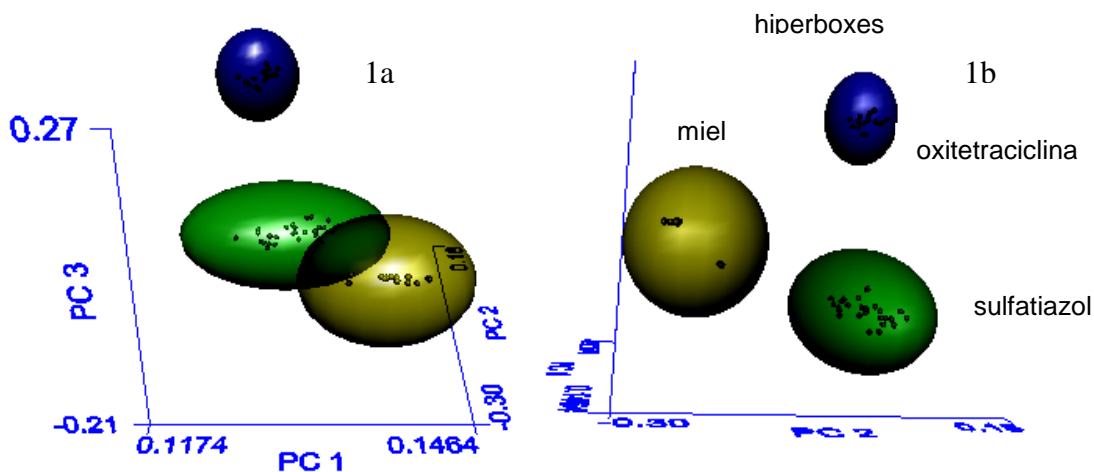


Figura 1. Ambas imágenes son representativas de los mismos modelos, la figura 1b corresponde a rotar la imagen teniendo como base PC2 en lugar de PC1 como en la figura 1a



Por otra parte los diagramas de Coomans son otra herramienta que permite visualizar los resultados obtenidos para SIMCA. Los diagramas de Coomans son representaciones bidimensionales de las distancias que presentan las muestras entre dos modelos. Se realizó el comparativo entre los diferentes modelos para cada una de las respectivas clases mediante que desarrollo el programa AssureID. En la figura 2 se presentan las gráficas.

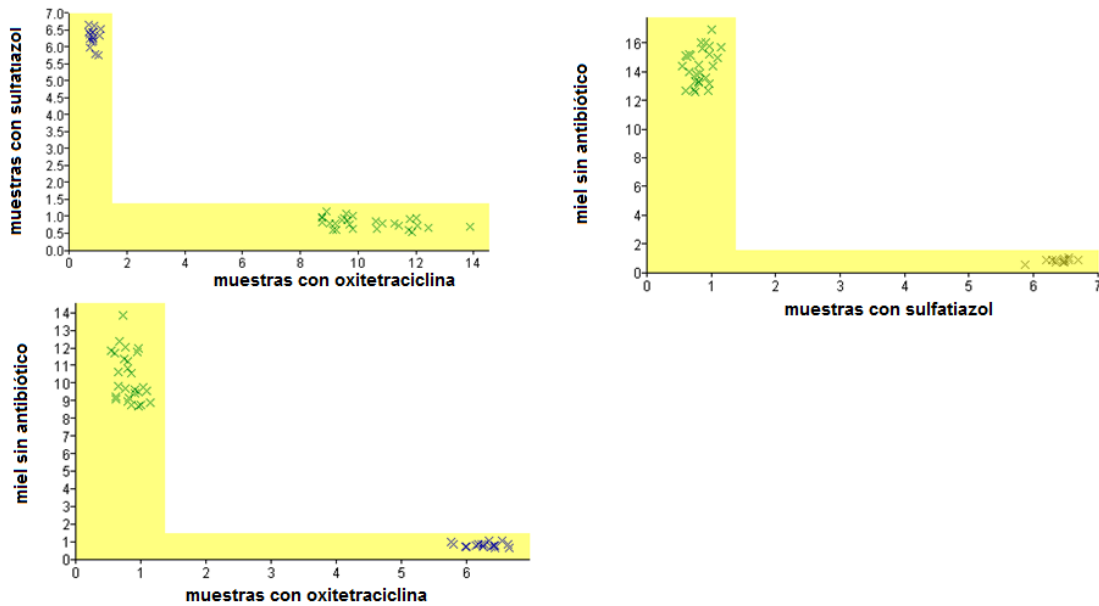


Figura 2. Diagramas de Coomans para los modelos obtenidos con SIMCA

En los diagramas en la figura 2 se observa que al comparar las clases formada por muestras conteniendo sulfatiazol, oxitetraciclina y miel, cada una de ellas se ubica en su respectiva área, ninguna de ellas se mezcla con otra de otro conjunto diferente, es decir todas las muestras que componen cada modelo son incluidas en su área representativa, por lo tanto cada modelo rechaza el 100 % de las muestras pertenecientes a otras clases. Lo anterior se ve reflejado en los resultados para las distancias interclase generados por el programa AssureID, Tabla 1.

Tabla 1. Distancia interclase para muestras contaminadas con oxitetraciclina, sulfatiazol y comparadas con miel sin antibiótico

Material	Distancia interclase		
	sulfatiazol	oxitetraciclina	miel
sulfatiazol		6.93	8.1
oxitetraciclina			13.3

Como se puede observar las distancias entre las clases para la construcción del modelo se encuentran por arriba de 6 y por debajo de 14, entre los tres grupos de muestras. La distancia interclase se define como la distancia geométrica de los modelos (hiperboxs) con un 99% de confianza de que el objeto particular pertenece a una clase. Como regla general, una distancia



interclase > 3.0 indica que las muestras están adecuadamente separadas y por lo tanto pertenecen a clases diferentes⁴.

Para cada clase y su modelo correspondiente como los que se observan en la Figura 1, se define la sensibilidad como el porcentaje de muestras que perteneciendo a esa clase son reconocidas correctamente por el modelo matemático. Análogamente se define la especificidad como el porcentaje de muestras que perteneciendo a otra clase son reconocidas como ajenas a los modelos. Estos dos términos se ven reflejados como tasas de reconocimiento y rechazo. Para el modelo optimado SIMCA desarrollado con el programa AssureID se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tasas de reconocimiento y rechazo obtenidas con los modelos simca para muestras contaminadas con oxitetraciclina, sulfatiazol comparadas con miel sin adicionar antibiótico

	% de reconocimiento	% de rechazo
sulfatiazol	100 (27/27)	100(41/41)
oxitetraciclina	100 (27/27)	100(41/41)
miel	100(14/14)	100(54/54)

Validación el modelo SIMCA

Por otra parte, al probar el modelo con el grupo de validación, cada una de las nueve muestras desconocidas para los modelos, fue predicha correctamente con lo cual se tienen los resultados que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Distancia total y residual de las muestras utilizadas para de validacion del modelo SIMCA

Material Especificado	Material Identificado	Distancia total del material especificado	Distancia Residual
SFZ	SFZ	0.6867	0.9225
SFZ	SFZ	0.5725	0.7691
SFZ	SFZ	0.8238	1.2011
Miel	Miel	0.7958	1.1604
Miel	Miel	0.5616	0.8188
Miel	Miel	0.5825	0.8493
OTC	OTC	0.5566	0.8111
OTC	OTC	0.6129	0.9491
OTC	OTC	0.8863	1.354

Se considera que este tipo de modelo de clasificacion estan validados adecuadamente cuando las muestras presentan una distancia total menor a 1 lo que indica que la muestra fue clasificada correctamente, la distancia residual debe ser tan bajo como sea posible ya que una gran distancia residual indica que la muestra contiene una fuente de variación que no ha sido previamente encontrado³. Estos resultados demuestran la capacidad del modelo SIMCA para clasificar correctamente los tres grupos estudiados con un límite de confianza del 99%.



4. CONCLUSIONES

Existen varias técnicas para determinar residuos de antibióticos en miel, sin embargo la espectroscopia infrarroja es una técnica que una vez creados los modelos de clasificación permitió la detección de sulfatiazol y oxitetraciclina. De acuerdo con los resultados la espectroscopia FTIR-MIR y los modelos de clasificación obtenidos mediante SIMCA esta técnica pueden ser una herramienta de cribado para la detección de los antibióticos analizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Bogdanov, "Contaminants of bee products", *Apidologie*, Vol. 37, 2006, pp.1-18.
2. D.L. Massart, B.G. Vandeginste, L.M. Buydens, P.J. Lewi, J Smeyers, S.D. Jong, Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A, (Elsevier Science Inc, New York, NY, 1997), pp 334-346.
3. O. G. Meza, T.G, Gallardo, G.I. Osorio, "FT-MIR and Raman spectroscopy coupled to multivariate analysis for the detection of clenbuterol in murine model", *Analyst*, Vol. 136,16, 2011, pp 3355-3365.
4. Y. He, C. Haiyan, "Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality", *Trends in Food Sci. Tech*, Vol.18,2, 2007, pp 72-83.