

2024



**DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL EN BEBIDAS
ANALCOHÓLICAS GASIFICADAS TIPO COLA
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE IMÁGENES
TESINA DE LICENCIATURA EN QUÍMICA**

FRANCO PECINI ASSEF

ÁREA (III), QUÍMICA ANALÍTICA; DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



Departamento de **Química**
Universidad Nacional del Sur



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ÁREA (III), QUÍMICA ANALÍTICA

**TESINA DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL EN BEBIDAS
ANALCOHÓLICAS GASIFICADAS TIPO COLA
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE IMÁGENES**

**ALUMNO:
FRANCO PECINI ASSEF**

**DIRECTOR:
Dr. Francisco D. Ávila Orozco**

**DIRECTORA ASISTENTE:
Dra. Claudia E. Domini**

**BAHÍA BLANCA, ARGENTINA
2024**

Agradecimientos

Ha finalizado una etapa importante de mi vida. En este tiempo conocí a personas muy valiosas, como mi novia Brisa (mi gran fuente de motivación en los últimos dos años), amigos, y docentes, los cuales siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, incluso en aspectos que iban más allá de lo académico.

Tuve la fortuna de representar a la UNS en ocho Juegos Universitarios en la disciplina Fútbol, compartiendo momentos inolvidables con gente increíble y obteniendo trofeos que hoy están en las vitrinas de Deportes UNS, junto a las medallas y credenciales que cuelgan orgullosamente en la manija de mi ropero. Además, tuve el privilegio de participar en actividades de extensión, devolviendo un poco a mi querida E.E.S.T. N°4 "Antártida", la cual me formó tanto personal como académicamente para afrontar el desafío de estudiar una carrera universitaria. También tengo la suerte de formar parte de "Cluster Analítica", un grupo de investigación de Química Analítica que me abrió las puertas para desarrollar mi tesina y en el que, si Dios quiere, aún me queda un largo camino por recorrer.

Por último, y no por eso menos importante, quiero agradecer a mis padres, Analía y Gustavo, quienes me apoyaron incluso cuando las cosas no salían como esperaba y parecía que todo se derrumbaba. Elegí esta fecha, de hecho, porque coincide con el aniversario de su casamiento. También quiero agradecer a mis amigos Agustín, Matías, Julián y Loana; a Pacho y Cali, mis directores de tesina; a mi novia y su familia, que siempre están a mi lado; a Marcelo y Marcela, los dueños del escaparate en la esquina de mi casa, donde he pasado incontables horas a lo largo de mi vida; a mis tíos y primos; y a mis abuelos maternos Ida (Porota) y Emir (Milo), y paternos Olga y Carlos, de los cuales lamentablemente tres ya no están físicamente, pero que siempre me alentaron a perseguir mis sueños.

Bahía Blanca, 17 de mayo de 2024.

Contenido

1. Introducción	2
1.1. El Fósforo	3
1.1.1. <i>El fósforo en la salud humana</i>	3
1.1.2. <i>El fósforo en alimentos y bebidas</i>	4
1.1.3. <i>Riesgos asociados al consumo inadecuado de fósforo</i>	4
1.2. Métodos para la determinación de P_{total}	5
1.2.1. <i>Determinación de P_{total} en alimentos y bebidas</i>	6
1.3. Alternativas para la determinación de P_{total}	7
1.3.1. <i>Espectroscopía de imágenes</i>	7
1.3.2. <i>Procesamiento y análisis de imágenes</i>	8
1.3.3. <i>Determinación de P_{total} por espectroscopía de imágenes</i>	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Metodología	12
3.1. Aparatos, instrumentos y software	12
3.1.1. <i>Aparatos</i>	12
3.1.2. <i>Instrumentos</i>	12
3.1.3. <i>Software</i>	12
3.2. Reactivos, soluciones, muestras y materiales	13
3.2.1. <i>Reactivos</i>	13
3.2.2. <i>Soluciones</i>	13
3.2.3. <i>Muestras</i>	14
3.2.4. <i>Materiales</i>	14
3.3. Procedimientos	15
3.3.1. <i>Desarrollo y aplicación del método propuesto</i>	15
3.3.2. <i>Calibración metodológica y análisis de muestras reales</i>	16
4. Resultados y discusión	20
4.1. Desarrollo y aplicación del método propuesto	20
4.1.1. <i>Sistema imagenoespectroscópico portátil</i>	20
4.1.2. <i>Formación, captura y procesamiento de imágenes, y colorimetría CIE</i>	21
4.1.3. <i>Calibración metodológica</i>	27
4.1.4. <i>Análisis de muestras reales</i>	30
4.2. Validación del método propuesto	31
5. Conclusiones	33
6. Bibliografía	34

1. Introducción

En el mundo actual, la calidad y seguridad de los alimentos y bebidas que consumimos juega un papel fundamental en la salud pública y la satisfacción del consumidor. Entre los diversos componentes alimentarios que requieren un monitoreo constante, especialmente en bebidas analcohólicas gasificadas tipo cola (*en adelante, bebidas cola*), el fósforo total (P_{total}) es de particular interés por su impacto tanto en la calidad de estos productos como en la salud humana. En esta, el consumo excesivo de fósforo (P), especialmente a través de estas bebidas, puede tener efectos adversos, como la hiperfosfatemia y la desmineralización ósea, la alteración de la absorción de minerales esenciales, o generar problemas endocrinos, renales, cardiovasculares, digestivos o metabólicos en general. (Bird & Eskin, 2021)

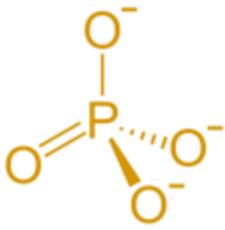
En este contexto, el método de *Murphy-Riley* para la determinación de P_{total} a través de la formación del complejo azul de fosfomolibdeno (**PMB**, *por sus siglas en inglés*), ha demostrado ser una alternativa efectiva para la cuantificación del P_{total} en *bebidas cola*. (Cho & Nielsen, 2017) Sin embargo, este método implica el uso de diversas disoluciones y la utilización de espectroscopía *UV-Vis* para medir el complejo, lo que dificulta su rápida implementación y su aplicabilidad en campo, además de encarecerla.

Por otra parte, la espectroscopía y el procesamiento de imágenes han surgido como herramientas poderosas en el análisis de alimentos y bebidas, brindando una capacidad única para la determinación rápida, simple y precisa de componentes químicos, tales como el contenido de P en alimentos. En este sentido, su incorporación en metodologías analíticas que a la vez integren tecnologías disruptivas como la impresión *3D* y los *smartphones*, resulta crucial en el desarrollo de enfoques innovadores más accesibles, prácticos, y eficaces.

Esta tesina está orientada a la aplicación de la espectroscopía y procesamiento de imágenes para la determinación colorimétrica del P_{total} en *bebidas cola* mediante una modificación al método de *Murphy-Riley*. El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un sistema económico, portátil y de fácil uso que permita a la industria alimentaria y los organismos de control verificar el contenido de P_{total} en estas bebidas de manera rápida, simple y precisa, sin la necesidad de equipos de laboratorio costosos y complicados de usar. Para lograr este objetivo, se empleará la reacción de formación del complejo **PMB**, se diseñará e imprimirá en *3D* un portaceldas que pueda ser retroiluminado con luz ambiente, y se utilizará un software de código abierto para el procesamiento de imágenes que permita usar la medida del color para cuantificar el P_{total} .

A través de este trabajo de tesina, esperamos contribuir al campo del análisis de alimentos y bebidas al proporcionar una solución innovadora y accesible para la determinación colorimétrica de P_{total} en *bebidas cola*, mejorando así el control de la calidad de estos productos, la seguridad alimentaria, y promover la salud pública.

1.1. El Fósforo



Este elemento, fundamental en numerosos compuestos inorgánicos y orgánicos, asume diversos roles en sistemas biológicos y ambientales. La forma más prevalente de P en la naturaleza son los fosfatos, principalmente, iones de ortofosfato (PO_4^{3-}). (Iheagwara et al., 2013) Estos oxoaniones de P consisten en un átomo de P unido a cuatro átomos de oxígeno. Se encuentran ampliamente distribuidos en diversos entornos, incluyendo el agua, suelos, rocas, minerales y organismos vivos, ya sea en forma de fosfatos inorgánicos u orgánicos solubles o en biomoléculas. (Bringhurst et al., 2011; Gutiérrez, 2020; Heaney, 2004)

1.1.1. El fósforo en la salud humana

El P desempeña un papel crucial en el funcionamiento del cuerpo. Contribuye a la formación de huesos y dientes, trabajando en conjunto con el calcio (Ca) para mantener la salud ósea y dental. Además, el P es un componente esencial de las moléculas de ATP (adenosín trifosfato), la principal fuente de energía para las células, vital para las funciones celulares y metabólicas. Su presencia también es necesaria para la comunicación entre las células nerviosas y la contracción muscular, desempeñando un papel clave en la transmisión de señales nerviosas y la función muscular. Participa en procesos metabólicos como la síntesis de proteínas, la producción de ADN y ARN , y la activación enzimática. Además, es esencial para mantener el equilibrio ácido-base en el cuerpo, crucial para el funcionamiento de muchas enzimas y procesos bioquímicos, tales como la entrega de oxígeno a través de la molécula de 2,3-difosfoglicerato. (Bird & Eskin, 2021) Por este motivo, es esencial para la salud ósea y sistémica mantener un equilibrio adecuado de P , Ca y demás minerales en el organismo mediante una dieta balanceada.



Esta foto de Autor desconocido está bajo licencia [CC BY-SA-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Aunque la ingesta diaria recomendada de P varía según la edad y la actividad física, oscilando generalmente entre 700 y 1250 mg para adultos, es fundamental garantizar un consumo adecuado de este mineral en la dieta diaria. (Calvo & Uribarri, 2013; Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997) Esto se puede lograr incorporando alimentos ricos en P , tales como carnes, lácteos, nueces, legumbres y granos enteros, entre otros, como parte de una alimentación equilibrada.

1.1.2. El fósforo en alimentos y bebidas

Los PO_4^{3-} se encuentran presentes como constituyentes de los alimentos utilizados tanto para la nutrición humana como animal. (Picard et al., 2023) Además, desempeñan un papel fundamental en la industria alimentaria como aditivos funcionales en productos procesados, ultraprocesados y bebidas, cumpliendo múltiples funciones, incluyendo la regulación de la acidez, la protección antioxidante y la emulsificación. Estas funcionalidades contribuyen significativamente a mantener o mejorar la estabilidad, textura, apariencia y otras propiedades organolépticas o tecnológicas de alimentos y bebidas. (Tomaska & Brooke-Taylor, 2014)

La cantidad de P en alimentos, bebidas y refrescos puede variar según su tipo y procesamiento. En alimentos con alto contenido de P como las carnes magras de pollo, pavo, cerdo y ternera, el contenido de P suele estar entre 200 y 300 mg de P por cada 100 g de carne. En pescados, tales como salmón, atún y bacalao, suele estar entre 200 y 400 mg por cada 100 g de pescado, dependiendo del tipo. En productos lácteos como leche, yogur y queso, este contenido puede variar entre 120 mg por cada 100 mL de alimento para la leche y 700 mg o más por cada 100 g de alimento para el queso. En legumbres, tales como lentejas, garbanzos y frijoles suele estar entre 100 y 200 mg por cada 100 g de alimento. Y, en frutos secos y semillas como almendras, nueces y semillas de girasol, este contenido puede variar de 300 - 400 mg por cada 100 g de alimento. (Cupisti et al., 2012; Cupisti & Kalantar-Zadeh, 2013)



Esta foto de Autor desconocido está bajo licencia [CC BY-SA-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)



Esta foto de Autor desconocido está bajo licencia [CC BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

En lo que respecta a las bebidas, el agua carece de una cantidad apreciable de P , mientras que los jugos de frutas como naranja, manzana y uva tienen cantidades inferiores a 10 mg por cada 100 mL de bebida. Por su parte, algunas bebidas deportivas pueden contener P agregado como PO_4^{3-} , según la marca y el tipo, superando los 50 mg por cada 100 mL de bebida en algunos casos. Las gaseosas como las **bebidas cola** en su mayoría no poseen P en su composición original, sin embargo, pueden contener PO_4^{3-} añadidos como reguladores de acidez o conservantes. En estas, el contenido de P puede oscilar entre 10 y 50 mg por cada 12 oz (equivalentes a 355 mL de bebida en envase personal), dependiendo de la marca y el tipo de bebida. (Wickham, 2014)

1.1.3. Riesgos asociados al consumo inadecuado de fósforo

El consumo inapropiado de P en bebidas, especialmente cuando se añaden PO_4^{3-} , acarrea diversos riesgos para la salud. Uno de estos riesgos está relacionado con el desequilibrio entre el Ca y el P . Un exceso de P en comparación con el Ca puede

perturbar el equilibrio mineral en el organismo, disminuyendo la absorción de Ca y aumentando el riesgo de trastornos óseos, como la osteoporosis, especialmente en casos de baja ingesta de Ca.(Anderson et al., 1996) Actualmente, se recomienda mantener una relación Ca/P igual o superior a 1, ya que relaciones inferiores a este umbral se consideran un factor desencadenante de la pérdida de masa ósea.(Levenson & Bockman, 2009; Teegarden et al., 1998) Así también, las personas que padecen de enfermedad renal crónica pueden enfrentarse a problemas renales, ya que experimentan dificultades para eliminar el exceso de P a través de sus riñones. Esto puede llevar a niveles elevados de P en la sangre, conocido como hiperfosfatemia, lo que contribuye al deterioro de la función renal y puede ocasionar otras complicaciones. Además, varios estudios sugieren que el consumo elevado de P en bebidas puede aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, como hipertensión arterial y calcificación de las arterias.(Wickham, 2014) Por otra parte, el exceso de P puede interferir en la absorción de otros minerales esenciales, como zinc y magnesio, afectando la salud general.(Reinhold et al., 1976; Vohra & Kratzer, 1966)

El P inherente a los alimentos en su estado natural raramente conlleva riesgos significativos para la salud, dado que tiende a absorberse eficientemente en el organismo cuando forma parte de una alimentación balanceada. No obstante, como se ha señalado anteriormente, la ingesta de bebidas o alimentos, especialmente procesados y ultraprocesados, con un alto contenido de P añadido, puede inducir desequilibrios nutricionales y contribuir al desarrollo de problemas de salud a largo plazo.

1.2. Métodos para la determinación de P_{total}

Desde 1920, cuando Denigès informó por primera vez una reacción de color extremadamente sensible entre molibdato de P y cloruro estañoso ($SnCl_2$) en condiciones adecuadas,(Deniges, 1920) el método colorimétrico para cuantificar P basado en esta reacción ha sido modificado y estudiado extensamente durante más de un siglo.(Mahajan et al., 2018; Truog & Meyer, 1929) La sustitución de $SnCl_2$ por ácido ascórbico como agente reductor; el uso de tartrato de antimonio potásico como catalizador, así como el uso de calentamiento o variaciones en condiciones ácidas(Murphy & Riley, 1962) han sido algunas de las modificaciones que ha sufrido el método original de Denigès para ampliar las capacidades analíticas del complejo **PMB** (ver Figura 1). Esto ha permitido la determinación de P en una amplia variedad de muestras, incluyendo orina y sangre,(Bell & Doisy, 1920) aguas naturales,(Murphy & Riley, 1962) suelos y biofertilizantes,(Santos de Souza et al., 2023) y alimentos.(Cho & Nielsen, 2017)

La reacción de formación del complejo **PMB** ha sido ampliamente utilizada debido a su asequibilidad, simplicidad, sensibilidad y robustez. El uso de este complejo se extiende desde proyectos de investigación colaborativos, dirigidos por organismos

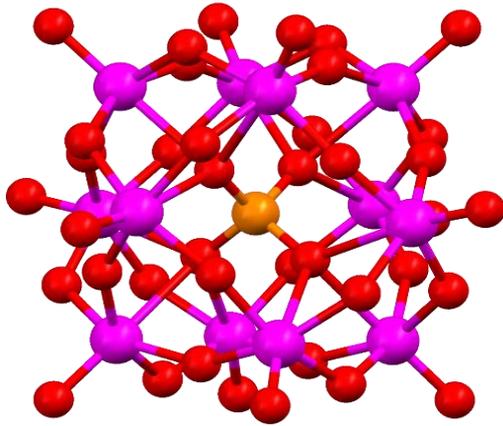


Figura 1. Estructura del ion de Keggin $[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$ (12-PMA) precursor del complejo PMB. La esfera naranja representa al P; y las esferas violetas y rojas al Mo y O respectivamente.

Fuente: [Haga clic aquí.](#)

internacionales,(Pulliainen & Wallin, 1996) hasta innovaciones analíticas originales(Gliszczyńska-Świąto & Rybicka, 2021) enfocadas en la determinación del contenido de *P* en una amplia gama de productos alimenticios, tales como harinas, embutidos, productos cárnicos y lácteos, entre otros. Desde que *Murphy*(Murphy, 1983) y *Lozano-Calero et al.*(Lozano-Calero et al., 1996) propusieron los primeros métodos colorimétricos para el análisis del contenido de *P* en bebidas utilizando el complejo **PMB**, han surgido numerosos enfoques analíticos para investigar en esta área. Estos enfoques comprenden la determinación de orto-, poli- y metafosfatos

mediante cromatografía en capa fina y de columna de intercambio iónico;(Tonogai & Iwaida, 1981) la adaptación del método de *Murphy* a un sistema de microinyección en flujo (μ FIA, *por sus siglas en inglés*) para la determinación de fosfatos;(Shafi Al-Jorani & Hussien Al-Sowdani, 2020) y la evaluación cuantitativa del ácido metilfosfónico como estándar en ³¹P-RMN para estimar el contenido de *P* en bebidas,(Köllo et al., 2013) entre otros.

1.2.1. Determinación de P_{total} en alimentos y bebidas

Como se ha indicado previamente, los fosfatos no solo poseen un valor intrínseco debido a la relevancia del *P* en las reacciones metabólicas y funciones fisiológicas del cuerpo humano, sino que también presentan propiedades tecnológicas significativas. En el ámbito de las bebidas embotelladas, ampliamente conocidas como refrescos o gaseosas, tales como las **bebidas cola**, es habitual la inclusión de estos compuestos. Sustancias como el ácido fosfórico o sus sales sódicas o potásicas son empleadas con regularidad como acidulantes o reguladores de acidez, otorgando de esta manera un sabor ácido o agrio característico a dichas bebidas.(Smith, 2007)

Dada la influencia del *P* en la salud humana y su prevalencia en las **bebidas cola**, por los fosfatos usados como aditivos, la cuantificación de este elemento es de suma importancia. En general, la determinación de *P* en alimentos y bebidas, denotada como P_{total} , se requiere con frecuencia para evaluar la calidad de estos productos, cumplir con las normas regulatorias nacionales y las recomendaciones internacionales, tales como las establecidas por organismos como la ANMAT en Argentina o la Comisión del *Codex Alimentarius* de las Naciones Unidas.

La metodología comúnmente empleada para determinar el contenido de P_{total} en alimentos, se describe en la norma oficial AOAC 995.11.(AOAC INTERNATIONAL, 2016) La metodología adoptada se fundamenta en la formación del complejo **PMB** y su

posterior cuantificación mediante espectrofotometría *UV-Vis* en el rango de longitudes de onda de 600 a 700 nm. La formación de dicho complejo se produce mediante la interacción entre los fosfatos solubles en el alimento, previamente calcinado, y una solución compuesta por molibdato de sodio y ácido ascórbico, empleados como agentes complejante y reductor, respectivamente, y con calentamiento vigoroso.

1.3. Alternativas para la determinación de P_{total}

La creación de métodos analíticos eficientes y precisos es necesaria para garantizar mediciones con una calidad analítica adecuada y el cumplimiento de las normativas alimentarias vigentes. Esta necesidad se hace especialmente relevante en el ámbito de la determinación del contenido de P_{total} en **bebidas cola**, no solo para establecer su calidad, sino también cuando se requiere evaluar sus posibles impactos en la salud pública y concientizar a los consumidores. En este sentido, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que implementen el uso de *smartphones* y la impresión 3D, entre otras tecnologías, deben ser eficaces y confiables además de rápidas, prácticas, económicas y amigables con el ambiente.

En años recientes han surgido alternativas instrumentales a la espectroscopía *UV-Vis* convencional, entre las que se destaca la espectroscopía de imágenes o imagenoespectroscopía. Esta técnica, considerada moderna y eficiente, presenta potenciales beneficios prácticos para simplificar la evaluación del contenido de P_{total} en **bebidas cola**.

1.3.1. Espectroscopía de imágenes

La espectroscopía de imágenes es una técnica que combina los principios de la espectroscopía y la imagenología (*formación de imágenes*). (Gupta, 2018) Esta técnica permite la adquisición de imágenes digitales y la obtención de información espectral, parcial o completa, a partir de los píxeles que las conforman. Estas imágenes, por sus características, reciben el nombre de imágenes espectrales y se clasifican, según las bandas o rangos de longitudes de onda del espectro electromagnético que registren, en: imágenes multiespectrales, hiperespectrales o de espectro completo (*ver Figura 2*). Las imágenes multiespectrales se forman a partir de un número acotado de bandas del espectro electromagnético, que varían en su ancho y continuidad, y las hiperespectrales, a partir de una región concreta del espectro o del espectro completo, y se caracterizan por tener una mayor resolución espectral. Además de la resolución espectral, las imágenes espectrales poseen otra característica importante, la resolución espacial; la cual está relacionada con el número de píxeles del sensor utilizado para capturarlas. Por esta razón, la información obtenida a partir de las imágenes espectrales se representa comúnmente en forma de cubos de imágenes, como si fuera un cubo de datos. (Kim et al., 2007; Schweizer & Moura, 2001)

En la actualidad, la adquisición, procesamiento y análisis de imágenes espectrales se aplican en campos tan variados y distintos entre sí como la astrofísica, la medicina y la química. Estas herramientas han adquirido especial relevancia en los últimos años, particularmente en el campo de la química analítica.(Chen et al., 2002) En esta, la detección basada en imágenes espectroscópicas ofrece la posibilidad de relacionar la información espectral contenida en la imagen con la distribución, identidad y composición química de los objetos en ella; o lo que es lo mismo, permite obtener mapas espaciales de variación espectral. Por esto y por características como la mínima preparación de la muestra, los rápidos tiempos de adquisición y medición simultánea de compuestos químicos, esta técnica se ha convertido en una herramienta versátil, simple, de bajo costo y alta eficacia, para el desarrollo de nuevos métodos analíticos aplicados al estudio de sistemas químicos.(Mehl et al., 2004)

En las últimas dos décadas, se han propuesto métodos analíticos que incorporan el uso de dispositivos de captura de imágenes, tales como *smartphones* o cámaras digitales, como detectores en determinaciones imagenoespectroscópicas o colorimétricas,(Gaiao et al., 2006; Valeria Springer et al., 2020) fluorimétricas,(Uriarte et al., 2021; Yu et al., 2014) y nefelométricas.(Byrne et al., 2000; Vidal et al., 2021) Otras aplicaciones de estos dispositivos también incluyen, la medición de propiedades ópticas como el índice de refracción y la densidad óptica para la clasificación y cuantificación de muestras líquidas,(Eriksson & Iqbal, 2014) y la determinación de distintos contaminantes emergentes, tales como fármacos(Cheng et al., 2022) y pesticidas.(Khalaf et al., 2023)

1.3.2. Procesamiento y análisis de imágenes

La relación entre el análisis de imágenes y el procesamiento de imágenes es fundamental en el contexto del análisis químico mediante imágenes espectrales. El procesamiento de imágenes implica la aplicación de procedimientos para mejorarlas o extraer información útil, lo que constituye la base para análisis posteriores.(da Silva & Mendonça, 2005) Por otro lado, el análisis de imágenes se centra en extraer información significativa de las imágenes mediante técnicas de procesamiento de imágenes, lo cual es crucial para tareas como el reconocimiento de objetos, análisis estadístico cuali- y cuantitativo.(Dempster, 2001)

En el ámbito del análisis químico mediante imágenes espectrales, estos conceptos se entrelazan para permitir la extracción de información química valiosa de datos complejos

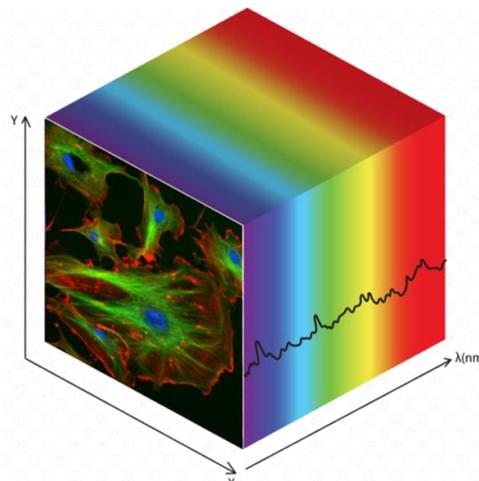


Figura 2. Representación gráfica de una imagen hiperespectral de la detección de un tumor glandular. Fuente: [Haga clic aquí.](#)

producidos por espectroscopía *UV-Vis* u otras técnicas ópticas. Las técnicas de imágenes espectrales (*multi- o hiperespectrales*) generan datos de imágenes multivariantes, donde cada píxel o grupo de píxeles representa un espectro o vector de intensidades de luz o color correspondientes a diferentes compuestos químicos. (Geladi et al., 1986) Al utilizar métodos de procesamiento de imágenes como el ajuste de contraste, ecualización de histograma, eliminación de ruido, segmentación y análisis de regiones de interés (ROI), entre otros, se pueden mejorar las imágenes espectrales para una interpretación del color más clara y precisa, y extraer información química detallada a partir de datos complejos. (Geladi et al., 1992)

1.3.3. Determinación de P_{total} por espectroscopía de imágenes

El análisis químico por espectroscopía de imágenes ha experimentado un notable incremento en la investigación científica en los últimos años. Este tipo de análisis aprovecha dispositivos cotidianos como cámaras digitales, escáneres, cámaras web y *smartphones* para la captura y procesamiento de imágenes. (Barbosa et al., 2016; Dominguez & Centurión, 2015; Masawat et al., 2017; PASSARETTI FILHO, 2015; Schults et al., 2019)

Un ejemplo destacado es el método desarrollado por Phansi et al., quienes emplearon dispositivos analíticos microfluídicos de papel (μ PADs) junto con la cámara de un *smartphone* para determinar el contenido de fosfato en muestras de agua y suelo. Este método involucra la formación del complejo **PMB**, utilizando ácido ascórbico como agente reductor, y la preconcentración de la muestra para mejorar la sensibilidad. La detección del complejo **PMB** se lleva a cabo mediante espectroscopía de imágenes, y el análisis subsiguiente se realiza utilizando el programa *ImageJ*®. Este método presenta un intervalo lineal de concentraciones entre 0 y 100 mg L^{-1} de P, con un límite de detección de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de P y una precisión del 3,1 % de RSD para 50 mg L^{-1} de P. (Phansi et al., 2022)

Por su parte, Barros et al. utilizaron el análisis de imágenes digitales (*DIA*, por sus siglas en inglés), una forma de denotar al análisis imagenoespectroscópico, para medir la concentración de $Al(III)$, Fe_{total} , NO_2^- y $H_2PO_4^-$ en muestras de agua. Para esto, emplearon una cámara web en la captura de las imágenes digitales y convirtieron las intensidades de rojo, verde y azul en absorbancias. Obtuvieron resultados óptimos para $Al(III)$ y NO_2^- al medir la absorbancia en el verde, mientras que para Fe_{total} y $H_2PO_4^-$ utilizaron combinaciones de absorbancia en verde-azul y rojo-azul, mejorando tanto la sensibilidad como los coeficientes de determinación. (Barros et al., 2017) El *DIA* demostró ser eficaz también en la detección precisa de P en concentraciones bajas. Además, en otro estudio reciente, se propuso un método colorimétrico para detectar PO_4^{3-} en muestras de agua tras preconcentrarlo utilizando una centrifugadora de papel circular (*Paperfuge*) y tubos dopados con adsorbentes. Se observó que la intensidad del **PMB** en los adsorbentes mostraba una relación lineal con la concentración de PO_4^{3-} , con un intervalo lineal de

concentraciones de 0 a 5 μM ($R^2 = 0,9921$) y un límite de detección de 0,19 μM .(Puno et al., 2017)

Otro estudio condujo al desarrollo de una aplicación para el análisis imagenoespectroscópico utilizando dispositivos inteligentes como *smartphones* y *tablets*. La aplicación, denominada *PhotoMetrix*[®], emplea técnicas simples de correlación lineal en el análisis univariado y de componentes principales (*PCA*, por sus siglas en inglés) en el análisis multivariado exploratorio.(Helfer et al., 2016) *PhotoMetrix*[®] se ha utilizado para determinar la concentración de iones de F^- y PO_4^{3-} en aguas tratadas y naturales mediante espectrofotometría *UV-Vis*, utilizando el compuesto *SPADNS* para la medición de F^- y la reacción de formación del **PMB** para la medición colorimétrica de P . Los coeficientes de determinación (R^2) para F^- y PO_4^{3-} mediante el método espectrofotométrico y el método imagenoespectroscópico fueron 0,990 y 0,998, y 0,999 y 0,999, respectivamente.(Ben da Costa et al., 2019)

En resumen, la espectroscopía de imágenes, aprovechando dispositivos de bajo costo, tales como *smartphones*, *tablets* y otros, se ha convertido en una herramienta útil y cada vez más común en la investigación científica. Su aplicación en la identificación y cuantificación de diversas especies químicas está ganando terreno rápidamente, siendo utilizada con frecuencia en el análisis de matrices como alimentos,(Barreto et al., 2020) muestras biológicas,(Luiz et al., 2019) medicamentos(Jain et al., 2021) y suelos,(de Oliveira Morais et al., 2019; Morais et al., 2019) por mencionar algunas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

En esta tesina se propone el desarrollo de un método alternativo para la determinación del contenido de P_{total} en **bebidas cola**. Este método se basa en la reacción de formación del complejo **PMB** y su posterior medición colorimétrica mediante espectroscopía de imágenes. Para llevar a cabo este método, se empleará una solución acuosa de cloruro estañoso ($SnCl_2$), como reductor, y ácido sulfúrico (H_2SO_4) para la formación del complejo **PMB**. Además, se explorará el uso de la espectroscopía de imágenes y la colorimetría *CIE* como alternativas a la espectrofotometría *UV-Vis* convencional. En este método se implementará un sistema de análisis portátil constituido por la cámara de un *smartphone*, un portaceldas dual (*PCD*) impreso en 3D y luz ambiente como iluminante.

Hipótesis de trabajo:

El contenido de P_{total} en muestras de **bebidas cola** puede ser medido por espectroscopía de imágenes y colorimetría *CIE*, utilizando un portaceldas dual portátil impreso en 3D que permita la adquisición de imágenes digitales de disoluciones que contengan **PMB**.

2.2. Objetivos específicos

- Diseñar y fabricar, mediante la tecnología de impresión 3D, el prototipo del *PCD* portátil acoplable a un *smartphone* que permita la captura de imágenes digitales de disoluciones con **PMB** para su posterior análisis. En el dispositivo se podrán emplear elementos ópticos, tales como difusores u otros elementos, que mejoren la precisión, sensibilidad, especificidad y/o eficacia del sistema.
- Implementar metodologías analíticas para la determinación del contenido de P_{total} en **bebidas cola** de forma simple, rápida y eficaz. Se usará una única solución ácida de $SnCl_2$ como agente reductor en la formación del **PMB** para evitar el uso de catalizadores y calentamiento. Además, se emplearán técnicas de espectroscopía y procesamiento de imágenes digitales, incluyendo la colorimetría *CIE*.
- Los resultados obtenidos mediante el método propuesto se validarán por comparación con los obtenidos a partir de referencias metrológicamente apropiadas, como la norma AOAC 995.11, comúnmente usada en la determinación de P_{total} en alimentos.

3. Metodología

3.1. Aparatos, instrumentos y software

3.1.1. Aparatos

Se utilizó una balanza de laboratorio estándar de precisión *Ohaus TS 120S* (*Ohaus Europe GmbH*, Nänikon, Suiza). Se emplearon pipetas *Dragon Lab MicroPette* (*Dragon Laboratory Instruments Limited*, Beijing, China) con tres rangos de volumen distintos, que incluyen 20 - 200 μL , 100 - 1000 μL y 1000 - 5000 μL . Se utilizó un agitador *Vortex Velp Scientifica ZX3* (*Velp Scientifica SRL*, Milán, Italia). Se empleó un limpiador ultrasónico *Arcano PS-10A* que opera a una frecuencia de 40 kHz (80 W), equipado con un elemento calefactor (*Instrumental Pasteur SRL*, Buenos Aires, Argentina), y se utilizó una impresora 3D *Creality Ender 3* (*Shenzhen Creality 3D Technology Co.*, Shenzhen, China).

3.1.2. Instrumentos

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis con arreglo lineal de diodos *Agilent 8453* (*Agilent Technologies*, Avondale, PA, EE. UU.) para recopilar los espectros del **PMB**. Se emplearon una celda espectrométrica de vidrio *Karaltay* de 4,5 mL con un camino óptico de 1 cm (*Beijing Karaltay Scientific Instruments Co. Ltd.*, Beijing, China) y una celda espectrométrica de poliestireno óptico *DeltaLab* de 1,5 mL con un camino óptico de 1 cm (*DeltaLab Group*, Barcelona, España). El espectrofotómetro se operó en modo estándar utilizando el software *Agilent Chemstation*. Para capturar imágenes digitales a color (sRGB), se usó la cámara trasera principal de un *smartphone Samsung Galaxy S20 FE* con sensor CMOS de 12 MP (f/1,8, 26 mm, 1/1,76", 1,8 μm , Dual Pixel PDAF, OIS) (*Samsung Electronics Limited*, Seúl, Corea).

3.1.3. Software

Se usó el software de diseño asistido por computadora (CAD, por sus siglas en inglés) *SolidWorks® Premium 2019* (versión SP 0.0, *Dassault Systèmes SolidWorks Corp.*, Velizy-Villacoublay, Francia) y el software de impresión 3D *UltiMaker Cura* (versión 4.13.1, *Ultimaker B.V.*, Utrecht, Países Bajos) para el diseño y fabricación de todos los componentes que conforman el PCD. Las imágenes digitales fueron analizadas con el software de dominio público *ImageJ®* (versión 1.54e, *ImageJ*, *National Institutes of Health*, Maryland, Estados Unidos). Los datos **RGB** y espectrales fueron analizados y graficados utilizando el software *Microsoft Excel®* (versión Microsoft 365, *Microsoft Corporation*, Redmond, Washington, Estados Unidos). El software *MATLAB® R2010a* (versión 7.10.0.499., 64-bit (win64), 05-02-2010, *The MathWorks, Inc.*, Natick, United States) y *ULC 2.0* (versión *ULC 2.0.1 Build 20080117, final/lanzamiento*, *Oleguer Huguet Ibars y Ricard Boqué Martí, QAQO, Universitat Rovira I Virgili*, Cataluña, España) se utilizaron para realizar los cálculos estadísticos en la calibración y validación del método propuesto.

3.2. Reactivos, soluciones, muestras y materiales

Se utilizaron reactivos químicos de grado para análisis y agua ultrapura (*resistividad de $18,3 \Omega \text{ cm}^{-1}$*) para la preparación de soluciones. El material de vidrio y de laboratorio se limpió adecuadamente con un detergente libre de PO_4^{3-} , enjuagándose siempre con agua destilada desionizada y agua ultrapura antes de usarlo.

3.2.1. Reactivos

Se utilizó fosfato monopotásico (KH_2PO_4 , Número CAS 7778-77-0) (Anedra® de Research-AG S.A., Argentina), molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Número CAS 10102-40-6) (Anedra® de Research-AG S.A., Argentina), ácido clorhídrico al 37 % y $1,19 \text{ g mL}^{-1}$ (HCl , Número CAS 7647-01-0) (Anedra® de Research-AG S.A., Argentina), ácido sulfúrico al 98 % y $1,84 \text{ g mL}^{-1}$ (H_2SO_4 , Número CAS 7664-93-9) (J.T. Baker® de Avantor, EE. UU.), tartrato de antimonio y potasio ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Número CAS 28300-74-5) (Anedra® de Research-AG S.A., Argentina), ácido ascórbico L (+) ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, Número CAS 50-81-7), y cloruro estañoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Número CAS 10025-69-1) (Anedra® de Research-AG S.A., Argentina).

3.2.2. Soluciones

En todos los casos en esta Sección, las soluciones de trabajo de *P* se prepararon en el día de su uso a partir de una solución *stock* de *P* que contenía $0,1570 \text{ mg mL}^{-1}$ de *P* (almacenada a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ para minimizar el crecimiento microbiano). La solución *stock* de *P* se preparó diluyendo una cantidad exactamente pesada de monofosfato de potasio (secado por 2 h a $105 \text{ }^\circ\text{C}$) en agua ultrapura.

3.2.2.1. Usadas en la aplicación del método propuesto

Como agente complejante, se usó una solución recién preparada de molibdato de sodio en ácido sulfúrico, con una relación molar de 1:24 en 0,5 L. Como agente reductor, se empleó una solución ácida de SnCl_2 en H_2SO_4 con una relación molar de 1:52 en 0,1 L. A esta solución se agregaron granallas de estaño metálico. Se utilizó también una solución estándar de trabajo de *P* de $0,0310 \text{ mg mL}^{-1}$ de *P* (31,0 ppm de *P*), para preparar una curva de calibración de *P* en un intervalo de concentraciones de 0,0070 a 0,0700 g de P_2O_5 por cada 100 mL de muestra. Las concentraciones de las soluciones en esta Sección se adoptaron a partir del estudio realizado por Amarilla et al. (Amarilla, 2019) a partir del trabajo publicado por Nagul et al. (Nagul et al., 2015)

3.2.2.2. Usadas en la aplicación de la norma AOAC 995.11

Se utilizó una solución ácida de molibdato de sodio en ácido sulfúrico, con una relación molar de 0,017:1 en 0,5 L, y una solución de ácido ascórbico (0,030 M) para crear una solución mixta de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, sirviendo como agente complejante y reductor, respectivamente, en la formación del complejo **PMB**. La solución de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, se preparó con una relación molar de 2,83:1 en 0,1 L. Se utilizó

una solución estándar de trabajo de P que contenía $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de P (10 ppm de P), para construir una curva de calibrado de P en un intervalo de concentraciones desde $0,01$ hasta $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ de P .

3.2.3. Muestras

Se adquirieron ocho muestras diferentes de **bebidas cola** de distintas marcas provenientes de varios comercios de Bahía Blanca (Buenos Aires - Argentina). Esta selección de muestras incluye las variantes: regular, light y sin azúcar de cuatro marcas de **bebidas cola**: dos marcas internacionales (*Coca Cola*[®] y *Pepsi*[®]) y dos marcas nacionales (*Goliat*[®] y *Cunnington*[®]). Todas estas variantes están etiquetadas con el nombre específico no genérico de "*Bebida carbonatada no alcohólica y dietética (según el caso) elaborada a partir de extractos vegetales*". La *Tabla 1* detalla la lista de ingredientes en los rótulos de los envases de las muestras.

Tabla 1. Códigos alfanuméricos utilizados para etiquetar las muestras reales de bebidas cola y los ingredientes indicados en sus rótulos.

Etiquetas de muestras*	Lista de ingredientes**
MBC-1-CO	Agua Carbonatada, Azúcares, COL 150d, ARO, ACI 338 . Contiene Cafeína.
MBC-2-CSA	Agua Carbonatada, COL 150d, ARO, ACI 338 , EDU Aspartamo (24 mg/100 mL) - Acesulfame K (16 mg /100 mL), CONS Benzoato de Sodio, ACREG 331 ii. Contiene: Cafeína.
MBC-3-CL	Agua Carbonatada, COL 150d, ARO, EDU Aspartame (24 mg/100 mL) - Acesulfame K (16 mg/100 mL), ACI 330 - 338 , CONS Benzoato de Sodio. Contiene Cafeína. Fenilcetonúricos: Contiene Fenilalanina.
MBC-4-PO	Agua Carbonatada; Azúcar; Cafeína; COL: Caramelo (INS 150d), ARO: Sabores Naturales; ACI: Ácido Fosfórico (INS 338) ; EDU: Acesulfame K (5,4 mg/100 mL) (INS 950), Sucralosa (2 mg/100 mL) (INS 955).
MBC-5-PL	Agua Carbonatada, Jarabe de Maíz con Alto Contenido de Fructosa (HFCS), Ácido Fosfórico , Ácido Cítrico, Benzoato de Sodio (Conservante de Frescura), Citrato de Sodio, Cafeína, Goma Arábiga, Sabor Natural.
MBC-6-GO	Agua Carbonatada; Endulzante: Jarabe de Maíz con Alto Contenido de Fructosa (HFCS); Colorante: Caramelo IV; Saborizante: Sabor Natural a Cola (Emulsión); Acidulantes: Ácido Fosfórico , Ácido Cítrico; Conservantes: Benzoato de Sodio; Edulcorantes No Nutritivos: Aspartamo (15 mg/100 mL), Acesulfame K (11 mg/100 mL). Fenilcetonúricos: Contiene Fenilalanina.
MBC-7-CNO	Agua Carbonatada; Azúcar o HFCS; COL: 150d; ARO, ACI: 338 ; CONS: Benzoato de Sodio. Contiene Cafeína.
MBC-8-CNSA	Agua Carbonatada, COL: 150d, ARO, EDU: Ciclamato (0,070 %), Aspartame (0,0045 %), Acesulfame K (0,0045 %), Sacarina (0,003 %), ACI: 338 , CONS: Benzoato de Sodio. Contiene Cafeína. Fenilcetonúricos: Contiene Fenilalanina.

*En las etiquetas de las muestras: O: Original (también Regular), SA: Sin Azúcar (también Cero), y L: Light.

** En negrita: Aditivos alimentarios que contienen P. Los acidulantes 330 y 338 corresponden a Ácido Cítrico y Ácido Fosfórico (también ácido ortofosfórico), respectivamente, según el Sistema Internacional de Numeración (INS, por sus siglas en inglés).

3.2.4. Materiales

Se utilizó un filamento de ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés) de color negro con un diámetro de $1,75 \text{ mm}$ (NTH, Chivilcoy, Argentina) para fabricar las piezas del PCD. Adicionalmente, se empleó una lámina comercial de poliestireno translúcido

blanco con dimensiones de $37 \times 27 \times 3,15 \text{ mm}$ como pantalla difusora para la adquisición de imágenes retroiluminadas.

3.3. Procedimientos

3.3.1. Desarrollo y aplicación del método propuesto

3.3.1.1. Desarrollo del sistema imagenoespectroscópico portátil

El sistema portátil para el análisis por espectroscopía de imágenes (*en adelante 'el sistema'*) (ver *Figura. 3*) está constituido por la cámara posterior principal del *smartphone* Samsung Galaxy S20 FE acoplado al PCD equipado con una lámina translúcida de poliestireno blanco utilizada como difusor. Como fuente de iluminación se usó luz ambiente, y para sostener todo el sistema, se utilizó un soporte comercial para *smartphone* montado en un trípode.

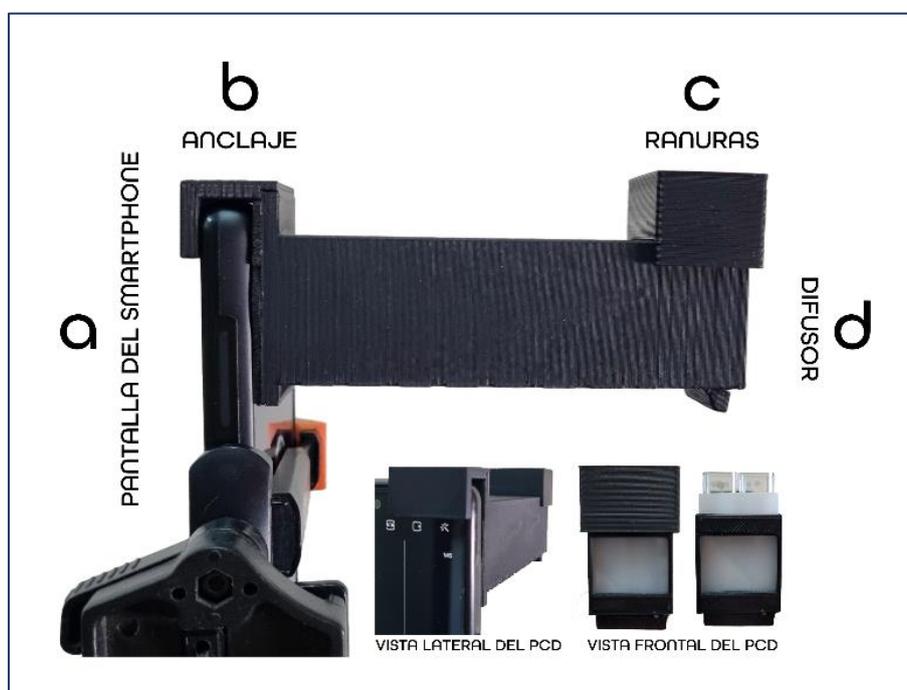


Figura 3. Sistema portátil para el análisis por espectroscopía de imágenes basado en el uso de un *smartphone* acoplado al PCD. (a). Vista lateral del *smartphone*. (b). Anclaje del PCD al borde superior del *smartphone*. (c). Ranuras para las celdas de medición cubiertas con una tapa de PLA. (d). Extremo frontal del PCD con el difusor de poliestireno blanco translúcido.

Como se muestra en la *Fig. 3 (a)*, el PCD está soportado sobre el borde superior del *smartphone* mediante un anclaje impreso en 3D, previamente unido al PCD con un superadhesivo de secado rápido a base de cianoacrilato. Los detalles sobre el diseño, impresión y ensamblaje de las piezas del PCD se proporcionan en la *Sección 3.3.1.1.1*. La pantalla translúcida de poliestireno blanco retroiluminada utilizada como difusor fue hecha a mano cortando una pieza de $37 \times 27 \times 3,15 \text{ mm}$ de la lámina original de poliestireno utilizando una herramienta rotativa mecánica. El difusor se instaló en el PCD

deslizándolo a través de la ranura diseñada para tal fin (ver *Figura 4* en la Sección 3.3.1.1.1.).

3.3.1.1.1. Modelado 3D del PCD

El proceso de modelado 3D del PCD se hizo usando el software *SolidWorks*® CAD para el diseño y el software *UltiMaker*® Cura para la impresión 3D. El PCD fue meticulosamente elaborado, siguiendo las dimensiones delineadas en la *Figura 4* y utilizando las herramientas de esbozo y extrusión del software *SolidWorks*®. La técnica de impresión elegida para producir los componentes del PCD (es decir, el soporte, el cubre-cubetas y el anclaje) fue la deposición de material fundido (FDM, por sus siglas en inglés). Los parámetros de impresión fueron los siguientes: altura de capa de 0,2 mm; grosor de pared de 0,8 mm; densidad de relleno del 20 %; temperatura de la boquilla de 200 °C; temperatura de la cama caliente de 60 °C; enfriamiento activado y una velocidad de impresión de 50,0 mm/s. Todos los componentes del PCD se imprimieron en PLA color negro mate utilizando la impresora 3D *Creativity Ender 3*.

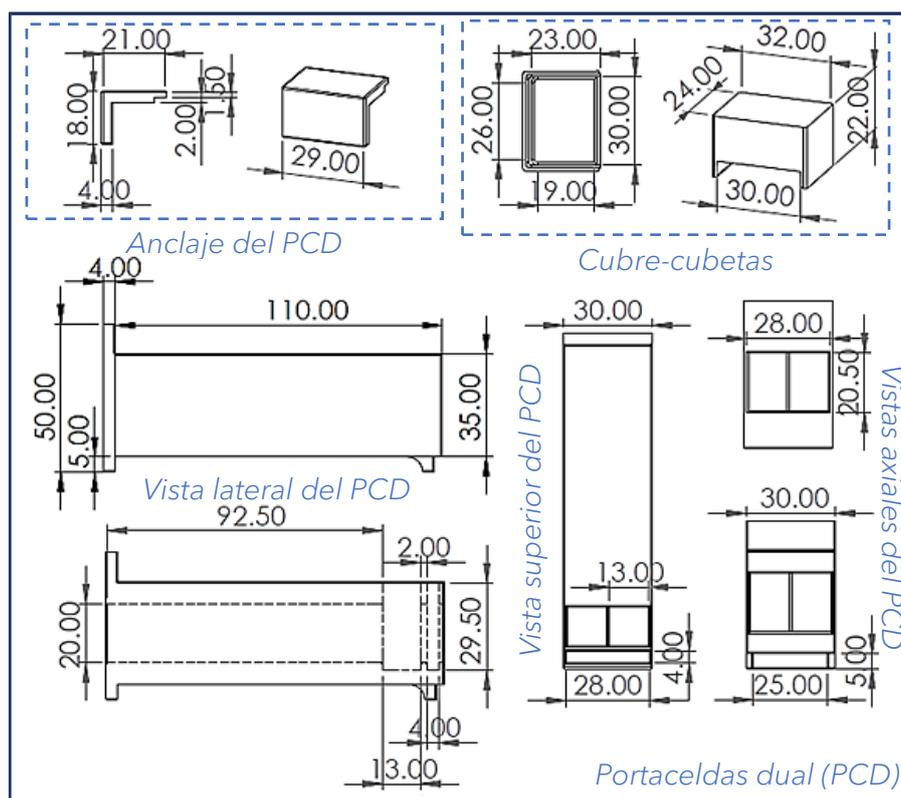


Figura 4. Croquis del portaceldas dual (PCD) diseñado a medida usando el software *SolidWorks*®. Todas las dimensiones se encuentran dadas en milímetros.

3.3.2. Calibración metodológica y análisis de muestras reales

La curva de calibración de P abarcó un intervalo de concentraciones desde 0,0072 hasta 0,0684 g de P_2O_5 por 100 mL de muestra (0,13 a 1,19 mg L^{-1} de P) y se construyó usando el logaritmo natural negativo de la ratio de luminancia (Y) [$-\ln(Y_i / Y_0)$], usado como respuesta analítica, versus la cantidad en g de P_2O_5 por 100 mL de muestra. La curva

de calibración se preparó por triplicado, mezclando cantidades adecuadas de una solución estándar de trabajo de P (ver Sección 3.2.2.1.) con $1000 \mu\text{L}$ de una solución ácida de Mo(VI) en H_2SO_4 ; $200 \mu\text{L}$ de una solución ácida de Sn(II) en H_2SO_4 y añadiendo agua hasta un volumen final de $5,00 \text{ mL}$ (ver concentración de las soluciones en la Sección 3.2.2.1.). Se preparó una solución blanco de reactivos utilizando el mismo procedimiento.

Las soluciones blanco/estándar de P , luego de ser homogeneizadas con un agitador *Vortex* durante 3 s y después de 5 min de espera, fueron transferidas consecutivamente en orden creciente de concentración a una cubeta de poliestireno óptico transparente de 4 mL . Esta cubeta se colocó en la ranura derecha del *PCD*, junto con otra cubeta que contenía agua destilada posicionada en la ranura izquierda. Se capturaron imágenes digitales de ambas cubetas en el *PCD* utilizando los parámetros de captura que se muestran en la *Tabla 2*, Sección 3.3.2.1.1. Las imágenes de las soluciones estándar de P se procesaron secuencialmente, siguiendo el orden de preparación para facilitar su análisis. El procesamiento digital de las imágenes y la correlación del $-\ln(Y)$ con el contenido de P en soluciones en blanco y estándar se ejecutaron siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.3.2.1.2.

Las muestras listadas en la *Tabla 1* (ver en pág. 15) fueron analizadas de forma homóloga a las soluciones estándar de P en la calibración, sustituyendo el volumen de la solución estándar de P por $20 \mu\text{L}$ de cada muestra. Las muestras fueron desgasificadas por 10 min en un baño de ultrasonidos. No se requirió de ningún tratamiento previo a su análisis. Las muestras fueran analizadas por triplicado.

3.3.2.1. Captura y procesamiento de imágenes

3.3.2.1.1. Captura de imágenes

Las imágenes digitales a color del sistema químico en estudio fueron adquiridas utilizando el modo *Pro* de la aplicación de la cámara principal del *Samsung Galaxy S20 FE*, empleando los parámetros de captura que se muestran en la *Tabla 2*. El color percibido en las imágenes digitales adquiridas está representado en el espacio de color *sRGB*. Las mismas tienen 2268 por 4032 píxeles (9 MP) de alto y ancho, respectivamente; y mantienen una relación de aspecto de $9:16$. Fueron tomadas con un retraso de 2 s sin el uso de *flash*. La longitud focal de captura fue de 26 mm , con una compensación automática de exposición y una apertura de $-0,8 \text{ EV}$ y $f/1,8$, correspondientemente. Después de su adquisición, las imágenes fueron transferidas a una computadora para su posterior procesamiento y análisis.

Tabla 2. Configuración de la cámara utilizada para capturar imágenes con el modo *Pro* de la aplicación de cámara del *Samsung Galaxy S20 FE*.

Parámetro	Valor
ISO	80
Velocidad de captura	$1/350 \text{ s}$
Modo de enfoque	Múltiple (auto)
Balance de Blanco (WB)	5700 K
Modo de medición	Matricial

3.3.2.1.2. Procesamiento de imágenes

El procesamiento de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el software *ImageJ*[®]. La medición de los valores **RGB** en las imágenes digitales se realizó mediante una función *Macro* diseñada para el procesamiento por lotes, en la cual se integró el *plugin* de medición **RGB**. Este procedimiento incluyó la importación de las secuencias de imágenes de las soluciones de calibración y de las muestras, y la selección y duplicado de tres regiones de interés (ROI) de 190×340 píxeles para luego almacenarlas y procesarlas posteriormente. Para conocer sobre la programación de la función *Macro* en *ImageJ*[®], [haga clic aquí](#).

Después de medir los valores **RGB** en las imágenes de color *sRGB*, como se describió anteriormente, estos se procesaron y transformaron adecuadamente en valores de la colorimetría *CIE* utilizando el software *Microsoft Excel*[®]. La conversión de los valores *sRGB* no lineales a datos **RGB** lineales, implicó la aplicación del ajuste lineal de niveles, la normalización y la inversión de la *corrección gamma* (ver ecuaciones *Ecs. 1, 2 y 3*, en la *Sección 4.1.2.3*). Posteriormente, los datos normalizados y linealizados fueron transformados en valores de la colorimetría *CIE XYZ* empleando la *Ec. 4* (ver *Sección 4.1.2.3*).

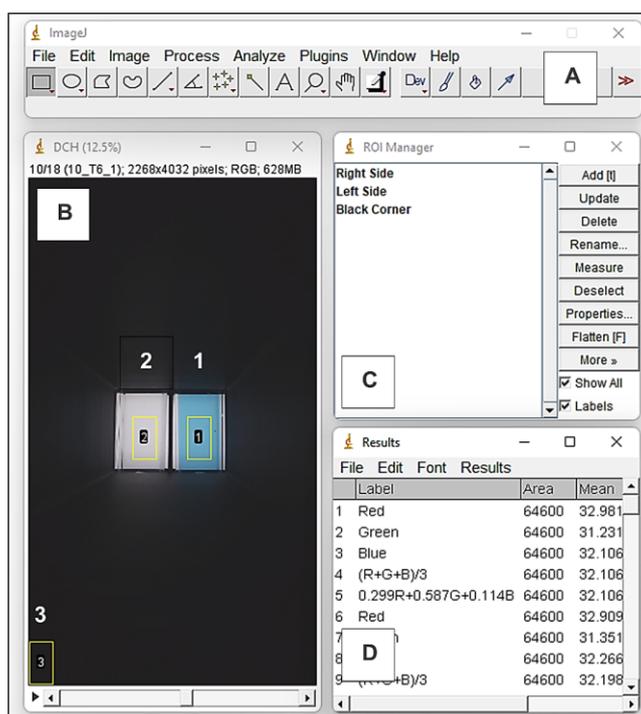


Figura 5. Flujo de trabajo de *ImageJ*[®] para medir los valores RGB en imágenes digitales a color en formato *sRGB*. A: Interfaz del software *ImageJ*[®]; B: Ventana de secuencia de imágenes *sRGB* importadas; C: Ventana del administrador de ROI (ROI 1: Cubeta derecha, ROI 2: Cubeta izquierda (referencia blanca), ROI 3: Referencia negra); D: Ventana de valores RGB medidos.

La concentración de *P* de las soluciones estándar y muestras (valores denotados como Y_i), se determinó relacionando el $-\ln(Y_i / Y_0)$ en el espacio de color *CIE XYZ* de estas soluciones frente a la del blanco de referencia (valor denotado como Y_0). Este proceso

implicó el cálculo de los valores de luminancia obtenidos a partir de la *ROI* en la celda de medición derecha (Y_i) (*ROI 1, Fig. 5*), que contenía las soluciones estándar de *P*/muestras y el blanco de reactivos, y aquellos de la celda de medición izquierda, que contenía agua ultrapura y se usó como blanco de referencia (Y_0) (*ROI 2, Fig. 5*). Los valores **RGB** medidos en la *ROI* izquierda (*ROI 2, Fig. 5*), denominados también $sRGB_M$ en la *Ec. 1* (Sección 4.1.2.3.), representan el área más iluminada de las imágenes digitales. Para establecer los valores **RGB** mínimos medidos en las imágenes, denotados también como $sRGB_m$ en la *Ec. 1* (Sección 4.1.2.3.), se eligió una *ROI* en la esquina inferior izquierda (*ROI 3, Fig. 5*) de las imágenes digitales, abarcando el área más oscura de estas. Esta *ROI* se usó como negro de referencia para el ajuste lineal de niveles (ver Sección 4.1.2.3.). La relación Y_i / Y_0 se comparó con la concentración de *P* en las soluciones estándar y el blanco de reactivos para construir la curva de calibración correspondiente, como se mencionó anteriormente. Posteriormente, se predijo la concentración de *P* en las muestras de **bebidas cola** usando esta misma relación, y los resultados se expresaron en *g* de P_2O_5 por 100 mL de muestra.

3.3.2.2. Aplicación de la norma AOAC 995.11

La norma oficial AOAC 995.11 se aplicó a las muestras inscritas en la *Tabla 1* (ver en pág. 14) para contrastar los resultados obtenidos mediante el método propuesto. El procedimiento descrito en esta norma implicó la preparación de soluciones estándar de *P*, utilizando las cantidades necesarias de la solución estándar de trabajo de *P* (ver Sección 3.2.2.2.), para construir una curva de calibración en un intervalo de concentraciones desde 0,0180 hasta 0,1081 g de P_2O_5 por cada 100 mL de muestra (0,314 a 1,886 ppm de *P*). Los espectros UV-Vis de las soluciones estándar y muestras con **PMB** se midieron después de calentarlas vigorosamente durante 10 min, y se usó la absorbancia máxima en el intervalo de 700 a 800 nm como respuesta analítica.

4. Resultados y discusión

4.1. Desarrollo y aplicación del método propuesto

4.1.1. Sistema imagenoespectroscópico portátil

Para la captura de las imágenes digitales a color del sistema químico en estudio usando el sistema descrito en la *Figura 3* (Sección 3.3.1.1) se empleó la cámara principal trasera de un *smartphone Samsung Galaxy S20 FE*, equipada con un objetivo de ángulo normal. Para evitar distorsiones ópticas en las capturas del sistema químico, se prescindió del uso de la cámara gran angular del *smartphone*.

La captura de las imágenes se realizó por retroiluminación con luz natural, utilizando los ajustes de captura de la cámara especificados en la *Tabla 2* (Sección 3.3.2.1.1.). Se optó por utilizar la luz natural como iluminante para evitar el uso de fuentes de iluminación adicionales que requirieran alimentación eléctrica externa, mejorar la portabilidad del sistema y posibilitar su uso en exteriores. Además, para suavizar y homogeneizar la luz ambiente proveniente del exterior, se incorporó un difusor de poliestireno translúcido blanco de 3,15 mm de grosor. Este se insertó en la ranura del *PCD* diseñada para tal fin.

El sistema fue estratégicamente ubicado frente a una ventana bien iluminada del laboratorio orientada hacia el este. Para fijar su posición se utilizó un trípode fotográfico y un soporte para *smartphones*. Las capturas fueron hechas siempre aproximadamente a las 12:00 horas ART (UTC -3), con el objetivo de asegurar una iluminación adecuada y consistente. Las imágenes se almacenaron por defecto en formato JPEG y el espacio de color sRGB. Posteriormente, fueron transferidas a una computadora para su procesamiento y análisis.

4.1.1.1. Diseño del PCD

El croquis del *PCD* que se muestra en la *Figura 4* (ver Sección 3.3.1.1.1.) fue diseñado a medida para lograr la portabilidad y robustez deseadas. Asimismo, para obtener imágenes siempre enfocadas de las cubetas de medición de poliestireno óptico en el encuadre de la imagen, se consideró la distancia mínima de enfoque del objetivo de ángulo normal de la cámara del *smartphone*, la cual es de 7 cm aprox. Este valor no es proporcionado por el fabricante del teléfono.

Las distancias delineadas en la *Figura 4* se establecieron para ajustar el diseño del *PCD* a las dimensiones del panel de cámaras trasero del *smartphone* y a la distancia mínima de enfoque de la cámara. Este ajuste, junto con el uso de un cubre-cubetas, permitió eliminar las filtraciones de luz en el interior del *PCD* que luego pudieran afectar las mediciones de color. Además, ajustar el diseño del *PCD* de esta manera permitió optimizar el uso del material de impresión (PLA), reduciendo su desperdicio. Las medidas del panel trasero del *smartphone* se realizaron usando un calibre digital, mientras que las

demás medidas del *PCD* se hicieron utilizando la herramienta de regla del software *CAD SolidWorks*®.

Para facilitar y agilizar el acople del *PCD* al extremo superior del *smartphone*, se adicionó al diseño un anclaje en forma de gancho que se adhirió al *PCD* con superpegamento.

4.1.2. Formación, captura y procesamiento de imágenes, y colorimetría CIE

4.1.2.1. Formación de imagen

El proceso de formación de imágenes es fundamental para comprender cómo sensores, tales como los semiconductores de óxido de metal complementario (*CMOS*, por sus siglas en inglés), responden a la radiación. Estos sensores, así como los conos y bastones en la retina del sistema de visión humana, son especialmente sensibles a la luz visible (en el rango de 380 a 700 nm) del espectro electromagnético. Los *CMOS* muestran una respuesta favorable a la radiación visible gracias a que usan un material fotosensible en su composición, sílice. Este material semiconductor convierte la energía de los fotones de la luz en corriente eléctrica, y a la eficacia con la que logra hacer esta conversión se la denomina eficiencia cuántica. Esta propiedad determina en gran medida la sensibilidad de los *CMOS*, aunque la eficiencia cuántica de los filtros de color que se usan en estos también influye sobre ella. (Distante & Distante, 2020; Padeste, 2007)

La superficie de los sensores suele estar conformada por arreglos lineales o matriciales de fotositios, también denominados píxeles. Estos, capturan los electrones de los fotones de luz que incide sobre la superficie expuesta del sensor. A la medida de la cantidad de luz incidente se le denomina luminancia, la cual está afectada también por el tiempo de exposición. Así entonces, una imagen, se puede entender como la representación gráfica de la luminancia. Esta representación no solo depende del número, tamaño y capacidad de los fotositios, sino también de factores como el ruido y la cuantización, así como del tipo de filtros y su disposición sobre el sensor. La capacidad de los fotositios se relaciona con su tamaño y determina su nivel de saturación. Esta establece la carga máxima de fotones antes de que la respuesta del sensor se vuelva no lineal (alrededor del 80 % de saturación). Cuanto mayor sea la absorción de fotones de los fotositios, mayores serán el rango dinámico y la profundidad de bits del sensor. El rango dinámico del sensor, definido como la relación entre la capacidad de carga y el ruido registrado, varía entre sensores (*CMOS*, *CCD* u otros). (Bull & Zhang, 2021; Kaufmann M., 2012; Sússtrunk, 2007c)

Cuando se representa un objeto en una posición específica de una imagen, la irradiancia espectral en el sensor es proporcional al producto de la reflectancia y la distribución espectral de potencia relativa (*SPD*, por sus siglas en inglés) de la fuente de iluminación (iluminante). Las propiedades físicas de la superficie del objeto, así como la iluminación y el ángulo de visión de este pueden desestimarse cuando se usa la *SPD* en lugar de medidas físicas de la radiancia. Así, la *SPD* es suficiente para medir el estímulo de color

o señal, y resulta adecuada para la formación de imágenes a color en distintas condiciones de iluminación.(Süsstrunk, 2007c)

Los sensores pueden incorporar diferentes filtros o canales, cada uno con sensibilidades particulares. En imágenes tricromáticas, la respuesta de color es un vector con tres componentes distintas en una ubicación específica dentro del sistema sensor. Convencionalmente, las denominaciones **RGB** indican las respuestas de color para sensores con máxima sensibilidad en los segmentos de longitud de onda larga (*R para red*), media (*G para green*) y corta (*B para blue*) del espectro visible. En otros sensores, las designaciones XYZ representan las respuestas de color según las funciones de ajuste de color de la colorimetría CIE (del francés, *Commission Internationale de l'Eclairage*), como en el espacio de color CIE XYZ (CIE 1931). Aquí, Y representa la luminancia, mientras que X y Z describen todas las posibles cromaticidades.(Süsstrunk, 2007c)

La colorimetría CIE comprende el estudio y estandarización de la percepción del color del sistema de visión humano u otros similares, así como también abarca el desarrollo de modelos y metodologías para la medición y descripción precisa del color. Además, proporciona un enfoque estructurado para comunicar eficazmente información sobre el color en una amplia variedad de aplicaciones, incluidas la imagenoespectroscopía y otras.(Schanda J., 2007)

4.1.2.2. Captura de imagen

La captura de imágenes digitales se asemeja al proceso de formación de imágenes del sistema de visión humano. En este, la luz entra en el ojo, se convierte en señales neurales que son procesadas por el cerebro y finalmente percibidas como información visual, imágenes. Ambos sistemas se valen de la conversión de la luz en señales para su procesamiento, almacenamiento e interpretación, aunque utilicen mecanismos diferentes para lograrlo.

Las cámaras de los *smartphones*, como la cámara trasera del *Samsung Galaxy S20 FE* u otras similares, capturan imágenes digitales a través de un proceso simple: la luz entra en la lente, pasa a través de la apertura que controla la cantidad de luz que llega al sensor, y el obturador determina el tiempo de exposición de este. Cuando la luz golpea el sensor (típicamente un sensor *CMOS*), genera señales eléctricas proporcionales a la intensidad de la luz entrante. Estas señales son digitalizadas y procesadas por el procesador de señales de imagen del *smartphone* (*ISP*, por sus siglas en inglés), realizando una serie de tareas para mejorar la calidad de la imagen capturada, incluyendo la corrección de color, entre otras. Finalmente, la imagen procesada se almacena en la memoria del dispositivo (frecuentemente en formato *JPEG*) y se muestra en la pantalla del teléfono.(Tang et al., 2023)

La corrección de color implica ajustar los colores capturados por el sensor para garantizar su precisión y consistencia en la imagen final, aunque cambien las condiciones de iluminación, las configuraciones de la cámara o las características del sensor y la lente.

Las cámaras de los *smartphones* utilizan diversos algoritmos para corregir el color, incluyendo el ajuste del balance de blancos (*WB*, por sus siglas en inglés) para mantener los tonos neutros. La *corrección gamma*, el mapeo de colores, así como el ajuste fino de tonos, niveles de saturación y contraste, también se emplean para lograr imágenes visualmente atractivas y naturales que representen fielmente los colores en la imagen sin distorsión o imprecisiones. (Zhang et al., 2023)

Después de que la imagen es capturada por el sensor y procesada por el *ISP*, un sistema estructurado se encarga de la representación del color, su codificación y almacenamiento. Esto implica el uso de sistemas de representación del color, tales como el **RGB** o *XYZ*, para definir los rangos de color -*gamut*- (ver Figura 6), así como de códigos para su representación numérica y para su interpretación y definición del método de almacenamiento. En los espacios de color, como el *sRGB*, se asignan valores numéricos a los colores dentro de dicho espacio. Esto permite la codificación del color dentro del archivo de la imagen, especificando el formato de archivo (*JPEG*, *PNG* u otro), el espacio de color y el método de codificación, como por ejemplo el *sRGB* con 8 bits por canal para imágenes *JPEG*. (Süsstrunk, 2007a, 2007b)

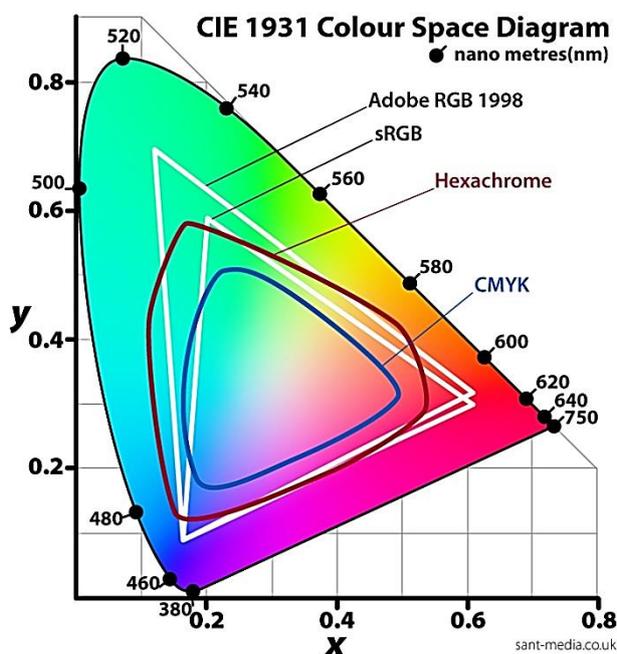


Figura 6. Comparación de diferentes espacios de color, incluyendo los espacios de color CIE XYZ (CIE 1931) y *sRGB*. Esta foto de Autor desconocido está bajo licencia [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

4.1.2.2.1. Parámetros de captura de la imagen

Las cámaras de los *smartphones*, como la del *Samsung Galaxy S20 FE* utilizada en este trabajo, ofrecen a los usuarios una variedad de parámetros ajustables para controlar la exposición al capturar imágenes. Estos parámetros incluyen el *ISO* (sensibilidad del sensor), la velocidad de obturación (medida en fracciones de segundos, *milisegundos*), la apertura (medida en *f-stops*), la compensación de exposición, el enfoque y el *WB* (medido en *Kelvin*), así como los modos de medición (matricial, puntual o ponderado al centro) y otras funcionalidades. Es importante destacar que tanto el *ISO*, la velocidad de obturación y la apertura conforman la base del triángulo de exposición (ver Figura 7) –un concepto fundamental en fotografía (también aplicable a la imagenología digital) que describe la relación entre estos parámetros y determina el nivel de exposición de una imagen. (Peterson, 2016)

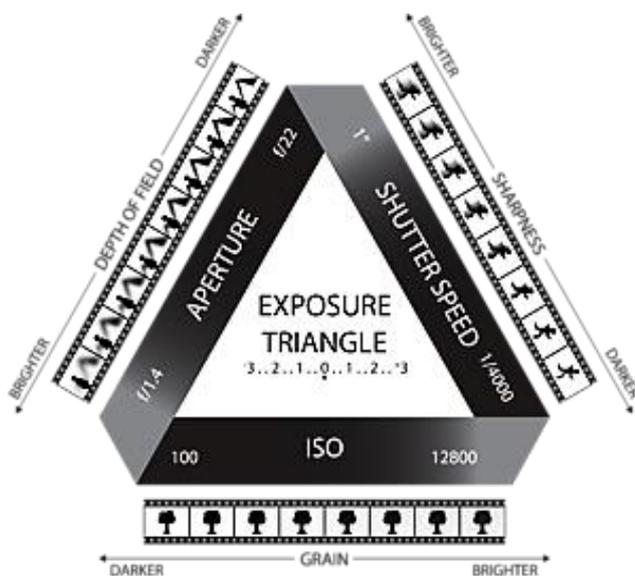


Figura 7. Triángulo de exposición descrito por Bryan Peterson en 1990 en "Understanding Exposure". Esta foto de Autor Desconocido está bajo licencia CC BY-
 exposición. Los demás parámetros de captura se registran como etiquetas de metadatos dentro del archivo de la imagen. Estos incluyen el WB, que ajusta la temperatura del color para asegurar una representación precisa de este, y el modo de medición, que determina cómo la cámara evalúa la luz, influyendo en los niveles de exposición.(Barnett, 2007; Wüller, 2007)

El ISO, que determina la sensibilidad del sensor a la luz, afecta tanto al ruido como al brillo general de la imagen. La velocidad de obturación controla el desenfoque y el tiempo de exposición, permitiendo congelar la acción o capturar el movimiento. Estos ajustes operan en conjunto dentro del triángulo de exposición, donde cambios en un ajuste requieren cambios compensatorios en otros para mantener una exposición equilibrada y lograr resultados precisos en la reproducción del color en la imagen. Esta tríada, influyente en la exposición, impacta directamente en los valores de color crudos capturados durante la

El ajuste adecuado de todos estos parámetros es crucial para evitar problemas durante la exposición, como el recorte de negros o blancos (pérdida de detalle en sombras o realces), la subexposición (resultando en imágenes oscuras) o la sobreexposición (causando imágenes brillantes y lavadas), tal como se ilustra en la Figura 8. Además, comprender el funcionamiento de estos parámetros y ajustarlos correctamente, resulta clave para mejorar significativamente la calidad de las imágenes y asegurar la medición precisa del color.

En relación con la configuración de los parámetros de captura de la cámara del Samsung Galaxy S20 FE, que se detallan en la Tabla 2 (Sección 3.3.2.1.1.), su selección se llevó a cabo considerando el principio del triángulo de exposición descrito por Peterson. Este principio busca generar imágenes con una exposición adecuada (un histograma equilibrado) y la calidad deseada, evitando el recorte de negros o blancos (con una velocidad de captura de ~2,8 ms), reduciendo el ruido (usando un ISO 80) y manteniendo colores perceptiblemente aceptables (con un WB de 5700 K).

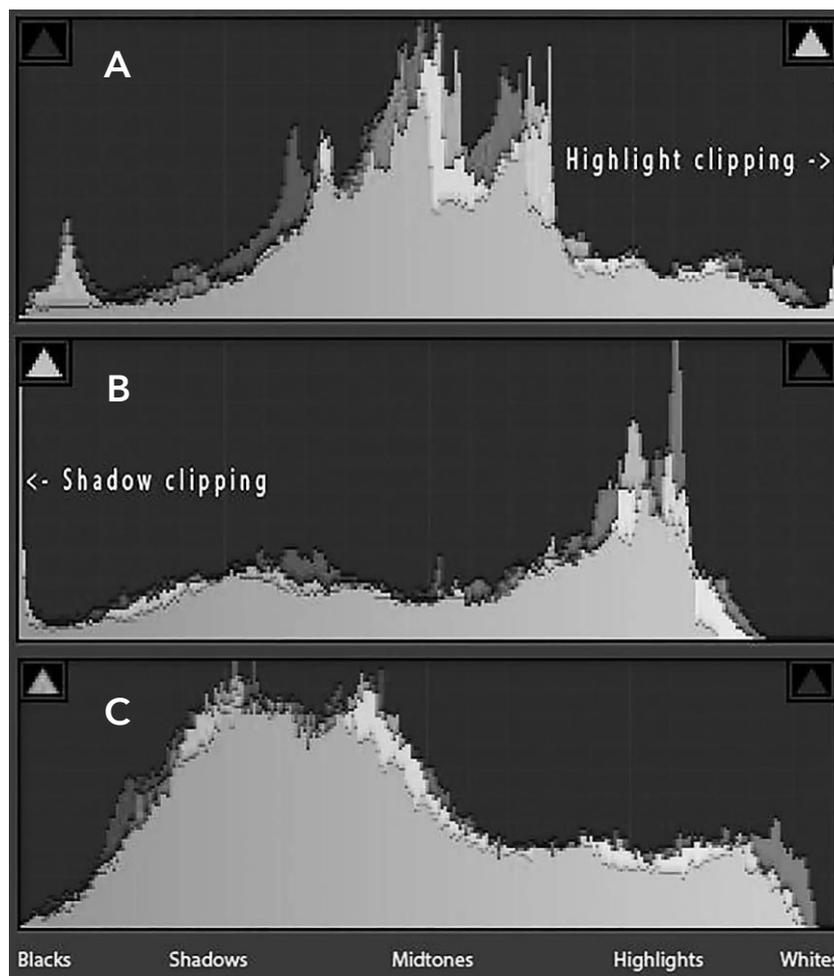


Figura 8. Comparación de la distribución tonal en histogramas para un recorte de altas luces (A), recorte de sombras (B) e imagen equilibrada (C). Esta foto de Autor Desconocido está bajo licencia CC BY-SA. Fuente: www.adobe.com.

4.1.2.3. Procesamiento de imágenes y colorimetría CIE

El procesamiento de imágenes implica realizar operaciones en una imagen para mejorarla u obtener información importante, mientras que el análisis de imágenes consiste en obtener información cualitativa y cuantitativa a partir de estas para extraer conclusiones significativas que permitan diferenciar objetos o regiones. Este proceso abarca varios pasos, desde la segmentación para definir segmentos o *ROI* dentro de la imagen, hasta el mejoramiento de estas mediante la manipulación o ajuste del color y la luminancia para mejorar la calidad visual y la representación del color. Durante el procesamiento de imágenes, es común ajustar parámetros como el contraste mediante técnicas como el estiramiento o el ajuste lineal de niveles, junto con la aplicación de transformaciones colorimétricas, como las funciones de la colorimetría *CIE*, que permiten mejorar el color y la información cuantitativa de manera efectiva. (Bagaria, 2022; Süssstrunk, 2007b; Tan & Jiang, 2019)

Por su parte, el ajuste lineal de niveles (Tan & Jiang, 2019) se aplica generalmente cuando una imagen tiene bajo contraste o cuando se necesita expandir el rango dinámico de la

imagen para utilizar todo el intervalo de valores de los píxeles en ella. Este procedimiento también permite aumentar la diferencia entre las áreas oscuras y claras de una imagen, como las obtenidas utilizando el sistema propuesto (ver Fig. 3, Sección 3.3.1.1.).

En este trabajo, además de realizar el ajuste lineal de niveles, aplicamos la normalización de datos (según las Ecs. 1 y 2, respectivamente) a los valores **RGB** medidos como se menciona en la Sección 3.3.2.1.2. Este procedimiento se aplica para escalar los valores **RGB** medidos, típicamente en un rango entre 0 y 255, a un intervalo entre 0 y 1 al dividirlos por 255. Esta operación convierte los valores **RGB** originales, representados como enteros de 8 bits, a una representación normalizada en punto flotante. Para procesar estos valores se empleó el software de procesamiento de datos *Microsoft Excel*[®]. Estos procedimientos matemáticos se llevaron a cabo para evaluar el impacto de aplicar operaciones típicas de procesamiento de imágenes en el rendimiento analítico del método imagenocolorimétrico presentado en este trabajo. La evaluación se realizó tanto de manera individual como en combinación con otras operaciones descritas posteriormente, observando su impacto a través de los cambios en los parámetros de regresión de las curvas de calibración y en otras métricas de desempeño del método propuesto.

$$\text{Valor } sRGB \text{ ajustado} = 0 + ((sRGB - sRGB_m)/(sRGB_M - sRGB_m)) \times (255 - 0) \quad \text{Ec. 1}$$

En la Ec. 1, $sRGB$ representa los datos de color medidos en la ROI de la solución de blanco de reactivos/solución estándar de P o muestra en cada imagen, y $sRGB_m$ y $sRGB_M$ denotan los valores **RGB** mínimo y máximo medidos en las ROI de negro y blanco de referencia, respectivamente (ver Fig. 5, Sección 3.3.2.1.2.).

$$\text{Valor } sRGB \text{ normalizado} = (A - RGB \text{ data}/255) \quad \text{Ec. 2}$$

En la Ec. 2, $A - sRGB$ representa el valor **RGB** ajustado usando la Ec. 1.

La información de color en las imágenes digitales se codifica comúnmente según el espacio de color $sRGB$, un estándar que asigna valores numéricos a los colores. En las imágenes $sRGB$, los valores **RGB** se someten a una *codificación gamma* que implica la aplicación de una curva o *función de corrección gamma* (típicamente con un exponente de $1/2,4$). Esta codificación compensa la respuesta no lineal de la visión humana a los cambios en la intensidad lumínica. A diferencia del sensor de una cámara digital, como el *CMOS*, que percibe la intensidad lumínica de forma lineal, esta codificación no lineal mejora la distribución de los valores tonales en la imagen, especialmente en las sombras y los medios tonos, lo que a su vez mejora el contraste, la saturación del color y la reproducción consistente en diversos dispositivos. (Süsstrunk, 2007a)

Para revertir la *corrección gamma* de los valores **RGB** medidos en las imágenes (es decir, para linealizar los valores **RGB**), se debe aplicar una inversión de la *función gamma*. (Süsstrunk, 2007a) En este estudio, la *corrección gamma* aplicada a los valores

sRGB se invirtió empleando la Ec. 3, linealizando los valores **RGB** previamente ajustados y normalizados utilizando las Ecs. 1 y 2, respectivamente.

$$\text{Valor RGB linealizado} = \begin{cases} ((\text{Valor } N\text{-sRGB} + 0,055)/1,055)^{2,4}; & \text{si valor sRGB} > 0.04045 \\ N\text{-sRGB value}/12,92; & \text{caso contrario} \end{cases} \quad \text{Ec. 3}$$

En la Ec. 3, N-sRGB es el dato sRGB medido y normalizado usando la Ec. 2.

Dado que sRGB representa el color en un espacio no lineal, los valores **RGB** obtenidos de imágenes digitales sRGB deben ser convertidos a un espacio de color lineal apropiado, como por ejemplo el espacio de color CIE XYZ de la colorimetría CIE, después de aplicar previamente la inversión de la corrección gamma. (Schanda J., 2007) De esta manera, se garantiza una interpretación precisa del color y un análisis colorimétrico adecuado de las imágenes sujetas a estudio en este trabajo.

Los valores **RGB**, linealizados y normalizados utilizando las Ecs. 3 y 2, correspondientemente, se transformaron en valores CIE XYZ empleando la Ec. 4. Para esto se usó el software Microsoft Excel®.

$$\text{Valor CIE XYZ} = \begin{cases} X = LN-R * 0.4124564 + LN-G * 0.3575761 + LN-B * 0.1804375 \\ Y = LN-R * 0.2126729 + LN-G * 0.7151522 + LN-B * 0.0721750 \\ Z = LN-R * 0.0193339 + LN-G * 0.1191920 + LN-B * 0.9503041 \end{cases} \quad \text{Ec.4}$$

En la Ec. 4, LN-RGB representa los valores **RGB** linealizados y normalizados, mientras que Y denota la luminancia medida dentro del espacio de color CIE XYZ.

4.1.3. Calibración metodológica

La luminancia Y, seleccionada como la señal analítica en el método propuesto, se obtuvo tras procesar adecuadamente los datos **RGB** medidos a partir de las imágenes sRGB del sistema químico estudiado, tal como se describió en la sección anterior. La relación entre la respuesta analítica, $-\ln(Y_i / Y_0)$, y el contenido de P_{total} en las soluciones estándar, expresada como g de P_2O_5 por 100 mL de muestra (ver Sección 3.3.2.), se evaluó utilizando el método de regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios (OLS) a través del software Microsoft Excel®.

4.1.3.1. Parámetros de la regresión y cifras de mérito

Para estimar el efecto de las operaciones de procesamiento de imágenes mencionadas en la Sección 4.1.2.3. sobre la relación entre el $-\ln(Y_i / Y_0)$ y la concentración de P_{total} en las soluciones estándar, se observaron los parámetros de la regresión del modelo lineal y las cifras de mérito del método analítico (CDM). Tales parámetros y cifras incluyen la sensibilidad de calibración (estimada a través de la pendiente de la curva), la sensibilidad analítica (determinada por la relación entre la sensibilidad de calibración y el ruido instrumental), el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ) y el coeficiente de correlación lineal (R^2). El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon como 3,3 veces S_0 y 10 veces S_0 , respectivamente,

donde S_0 representa la desviación estándar de la concentración predicha para un blanco de reactivos, siguiendo las pautas establecidas por la IUPAC y la ISO. (Currie, 1995, 1999)

Tabla 3. Cifras de mérito del MOR AOAC 995.11 y del método propuesto al utilizar diferentes operaciones para procesar la respuesta analítica.

Datos RGB usados en la calibración metodológica									
CDM ^a	N-sRGB	A-sRGB	LN-RGB	AL-RGB	LA-RGB	CIE XYZ ¹	CIE XYZ ²	CIE XYZ ³	MOR ⁴
S^b	7,37	9,46	12,7	15,5	13,4	13,7	17,2	14,5	15,4
SD_s^c	0,12	0,16	0,24	0,30	0,24	0,22	0,27	0,23	0,19
$S_{y/x}^d$	0,013	0,018	0,027	0,034	0,027	0,025	0,031	0,026	0,029
γ^e	550	529	477	458	498	547	562	566	541
LOD^f	0,0019	0,0020	0,0022	0,0023	0,0021	0,0020	0,0019	0,0019	0,0027
LOQ^g	0,0059	0,0061	0,0068	0,0071	0,0065	0,0059	0,0058	0,0057	0,0081
R^{2h}	0,994	0,994	0,992	0,992	0,993	0,994	0,995	0,995	0,998
QC_{mean}^i	7,8	7,3	7,2	6,9	6,9	6,7	6,2	6,5	7,5

^a Cifras de mérito; ^b Sensibilidad de la calibración (Pendiente) ($g P_2O_5 \times 100 mL^{-1}$); ^c Desviación estándar de la pendiente ($g P_2O_5 \times 100 mL^{-1}$); ^d Desviación estándar de los residuales de la regresión lineal ($g P_2O_5 \times 100 mL^{-1}$); ^e Sensibilidad analítica (S/S_y) ($g P_2O_5 \times 100 mL^{-1}$); ^f Límite de detección ($g P_2O_5 \times 100 mL^{-1}$); ^g Límite de cuantificación ($g P_2O_5 \times 100 mL^{-1}$); ^h Coeficiente de correlación; ⁱ Coeficiente de calidad; ¹ Calculado desde LN-RGB data; ² Calculado desde AL-RGB data; ³ Calculado desde LA-RGB data; ⁴ Método oficial de referencia, AOAC 995.11

La Tabla 3 presenta las CDM del método propuesto al emplear los datos de color normalizados (N-sRGB), ajustados (A-sRGB), linealizados (LN-RGB), y de la colorimetría CIE (CIE XYZ) como fuente de la respuesta analítica en la calibración metodológica. Las curvas de calibrado se construyeron considerando un intervalo lineal entre 0,0072 y 0,0684 g de P_2O_5 por 100 mL de muestra. Al utilizar el método oficial de referencia (MOR) según la norma AOAC 995.11, el intervalo lineal fue de 0,0180 a 0,1081 g de P_2O_5 por 100 mL de muestra. Los datos de color CIE XYZ en la Tabla 3, derivados directamente de los datos LN-RGB, se calcularon también a partir de los datos N-RGB inicialmente ajustados o linealizados, como se indica en el pie de la tabla. Además, se presentan las CDM del MOR en la misma tabla.

Las CDM de los métodos que se basan en los fenómenos de absorción o de transmisión de la luz se ven principalmente influenciados por la relación que existe entre la respuesta analítica y la concentración del analito. En el caso de los métodos imagenoespectroscópicos, estas características no solo pueden ser afectadas por estos fenómenos, sino también por las operaciones de procesamiento de imágenes aplicadas para transformar la información de color obtenida de tales imágenes.

Como se muestra en la Tabla 3, la curva de calibrado basada en la estimación de Y (calculada como el promedio de los valores RGB) a partir de los datos N-sRGB exhibe la menor sensibilidad de calibración (S) con respecto a la concentración de PMB en las soluciones estándar de P, en comparación con las curvas construidas utilizando las demás operaciones aplicadas a los datos de color RGB en este estudio, así como con el MOR. Esta falta de sensibilidad de calibración surge de las características inherentes de la no linealidad de los datos de color dentro del espacio de color sRGB. Esta característica persiste incluso cuando se emplean los datos RGB ajustados (A-sRGB), aunque con un ligero aumento en el valor de S debido al ajuste. Esto indica que el ajuste lineal de niveles

mejora el rango tonal de los colores en la imagen, así como el brillo y contraste, más no revierte las operaciones no lineales (como la corrección *gamma*) que se aplican en su procesamiento y almacenamiento.

Por su parte, la curva de calibración basada en los valores de Y de los datos *LN-RGB* (con corrección *gamma* invertida) muestra un valor de S más alto y cercano al valor de S del *MOR*, al igual que aquellas con valores de Y derivados de *LN-RGB*, tales como *AL-RGB*, *LA-RGB* y *CIE XYZ*. La inversión de la corrección *gamma* (ver Ec. 3, Sección 4.1.2.3.) revierte la función de potenciación aplicada a los valores de los píxeles para ajustar la percepción no lineal del brillo (*luminancia*) en el sensor *CMOS* de la cámara. Por lo tanto, se espera que los datos *LN-RGB* y sus derivados produzcan un valor de S mayor y más comparable en relación con las otras operaciones no lineales y con el *MOR*, respectivamente. Esta mejora se atribuye a la capacidad de la inversión de la corrección *gamma* para linealizar los valores de Y , haciéndolos similares a los de un archivo de imagen *RAW* o a la medición espectroscópica de la transmitancia/absorbancia de la luz por un fotodetector. Esto se refleja finalmente en la proporcionalidad de estas curvas con respecto a la ley de *Lambert-Beer* y en su comparabilidad con el *MOR*.

Es notable también que la curva de los datos *AL-RGB* exhibe un valor de S similar al del *MOR*, lo que indica que la aplicación del ajuste lineal de niveles antes de la inversión de la corrección *gamma* afecta favorablemente la sensibilidad de calibración del método. La operación de ajuste lineal de niveles influye en el brillo y contraste al estrechar el histograma y la distribución de los valores en este. Esto mejora el contraste tonal en regiones de la imagen sin o con poca saturación, intensificando la oscuridad de los píxeles oscuros y el brillo de los píxeles claros, pero conservando al mismo tiempo las diferencias relativas de Y entre los píxeles en la imagen.

En el enfoque colorimétrico *CIE XYZ*, no solo se revierte la corrección *gamma*, sino que también se utilizan coeficientes de transformación matricial que representan constantes dependientes de la cromaticidad. Estas constantes están asociadas con los primarios imaginarios de la caracterización espectral dentro del sistema de color *XYZ*, a diferencia del *RGB*, que se basa en la aditividad de tres colores primarios. El espacio de color *CIE XYZ* abarca todos los estímulos de color visualmente perceptibles, incluyendo aquellos en espacios de color como el *sRGB*. Por lo tanto, el *CIE XYZ* sirve como una referencia estándar colorimétrica debido a su amplio rango, independencia del dispositivo y características perceptualmente uniformes.

Se espera que las curvas derivadas del *CIE XYZ* exhiban una mayor sensibilidad de calibración que las alternativas no colorimétricas. Sin embargo, dentro de los tratamientos colorimétricos *CIE XYZ* aplicados a los valores *RGB* medidos, las curvas derivadas de los datos *LA-RGB* muestran *CDM* significativamente más altas. Esto se debe a las ventajas inherentes de aplicar previamente un ajuste lineal de niveles y la consecuente y necesaria linealización mediante la inversión de la corrección *gamma* antes de la transformación matricial del sistema *XYZ*.

Como resultado, la implementación de mejoras en el contraste, linealización y transformación al espacio colorimétrico *CIE XYZ* en datos *sRGB* demuestra mejoras sustanciales en las propiedades analíticas del método imagenocolorimétrico (S , γ , LOD , LOQ y R^2) basado en el procesamiento de imágenes digitales para determinar el contenido de P_{total} mediante la formación del complejo **PMB**.

En la *Tabla 3*, los valores de QC_{mean} representan el coeficiente de calidad (QC_{mean}) definido y propuesto por *Vankeerberghen y Smeyers-Verbeke* (*Vankeerberghen & Smeyers-Verbeke, 1992*) para evaluar la calidad de las curvas de calibración. Entre las curvas que utilizan los datos *N-RGB* y *CIE XYZ* derivados de *LA-RGB*, la primera muestra el valor de QC_{mean} más alto (7,8), mientras que la última muestra el más bajo (6,2). Estos valores difieren notablemente del valor de QC_{mean} del *MOR*, que es de 7,5, que se establece como umbral de referencia definido por el usuario según *Vankeerberghen et al.*

Estos resultados indican que los datos *N-RGB* producen curvas de calibración de menor calidad en comparación con el *MOR*, ya que, según *Vankeerberghen et al.*, valores de QC_{mean} por encima del umbral de referencia implican una disminución en la calidad de la calibración. Sin embargo, los datos *CIE XYZ* derivados de *AL-RGB* generan curvas de calibración con valores de QC_{mean} satisfactorios. Según *Vankeerberghen et al.*, las curvas de calibración con valores de QC_{mean} por debajo del umbral especificado por el usuario pueden considerarse de calidad satisfactoria, lo que elimina la necesidad de investigar errores. (*De Beer et al., 2012; Riu & Rius, 1996*) Por este motivo, se eligió la curva de calibración obtenida a partir de los datos *CIE XYZ* derivados de *AL-RGB* para analizar el contenido de P_{total} en muestras reales de **bebidas cola**.

4.1.4. Análisis de muestras reales

Para evaluar la eficacia del método imagenocolorimétrico desarrollado en este trabajo para predecir la concentración de P_{total} en **bebidas cola**, se seleccionó un conjunto de ocho muestras reales de distintas marcas de bebidas comerciales. Estas bebidas declaran dentro de las listas de ingredientes en sus rótulos (*ver Tabla 1, pág. 15*), la inclusión de ácido fosfórico como acidulante, identificado por la nomenclatura *ACI* o *INS 338*. El Código Alimentario Argentino (*CAA*) no exige la declaración del contenido de P_{total} en bebidas, lo que hace que la cantidad de este en las muestras sea desconocida. Sin embargo, el *CAA* sí establece un umbral máximo de 0,07 g de P_2O_5 por 100 mL de bebida para la adición de *ACI* o *INS 338*. (*ANMAT, 2023*)

La *Tabla 4* (*ver página siguiente*) presenta los resultados de la aplicación del método imagenocolorimétrico para la evaluación del contenido de P_{total} en muestras reales de **bebidas cola**, empleando las operaciones de procesamiento de imágenes *AL-RGB* y *CIE XYZ derivado de AL-RGB*. También se muestran los resultados obtenidos mediante el *MOR* para su comparación. Es importante destacar que el contenido de P_{total} medido en todas las muestras estuvo por debajo del límite máximo de 0.07 g de P_2O_5 por 100 mL de muestra estipulado por el *CAA*.

Tabla 4. Evaluación comparativa de la determinación del contenido de fósforo utilizando colorimetría CIE XYZ y el MOR AOAC 995.11.

Contenido de fósforo en g de P ₂ O ₅ cada 100 mL de bebida (Conc. media ± SD)*			
Código de muestra**	AL-RGB	CIE XYZ	MOR***
MBC-1-CO	0,0449 ± 0,0031	0,0429 ± 0,0031	0,0437 ± 0,0004
MBC-2-CSA	0,0443 ± 0,0022	0,0429 ± 0,0019	0,0406 ± 0,0010
MBC-3-CL	0,0412 ± 0,0014	0,0396 ± 0,0012	0,0414 ± 0,0007
MBC-4-PO	0,0429 ± 0,0034	0,0412 ± 0,0030	0,0444 ± 0,0008
MBC-5-PL	0,0412 ± 0,0052	0,0394 ± 0,0046	0,0383 ± 0,0002
MBC-6-GO	0,0580 ± 0,0010	0,0571 ± 0,0017	0,0566 ± 0,0012
MBC-7-CNO	0,0526 ± 0,0059	0,0503 ± 0,0058	0,0442 ± 0,0027
MBC-8-CNSA	0,0587 ± 0,0024	0,0566 ± 0,0022	0,0552 ± 0,0010

* La concentración media y su desviación estándar fueron computadas basándose en la medición de 3 réplicas.

** En los códigos de las muestras: O: Original (también Regular), SA: Sin Azúcar (también Cero), y L: Light.

*** Método oficial de referencia AOAC 995.11

4.2. Validación del método propuesto

Para evaluar la exactitud de los resultados obtenidos mediante el método imagenocolorimétrico propuesto en este trabajo (ver Tabla 4), se realizó un estudio comparativo con los resultados obtenidos mediante el MOR (AOAC 995.11). Este método oficial de referencia es reconocido internacionalmente en el campo del análisis de alimentos por la rigurosidad y confiabilidad de su metodología, por esto se seleccionó como referencia metrológica adecuada para evaluar el desempeño analítico del método propuesto.

La comparación entre dichos resultados se llevó a cabo mediante una subrutina implementada en el software *MATLAB*®. Esta subrutina involucra la ejecución de una prueba de confianza conjunta para los coeficientes de regresión basada en el método de calibración de mínimos cuadrados bivariados (*BLS*). El *BLS* resulta una prueba adecuada para el análisis de regresión, ya que ajusta los errores presentes en ambas variables, (Riu & Rius, 1996) las cuales se relacionan con la concentración de P_{total} en las muestras, determinada a partir de las metodologías basadas en los datos *AL-RGB* y *CIE XYZ* derivado de *AL-RGB*, por una parte; y, por otra, con el MOR.

Para evaluar la desviación de los coeficientes de regresión de los valores teóricos de intersección 0 y pendiente 1, se puede emplear la prueba de intervalo de confianza conjunta tanto para la pendiente como para la intersección. Esta prueba confirma si el punto teórico de intersección 0 y pendiente 1 se encuentra dentro de la región de confianza conjunta en forma de elipse centrada alrededor de los valores de pendiente e intersección de la línea de regresión lineal. (Llamas et al., 2009; Martínez et al., 2000)

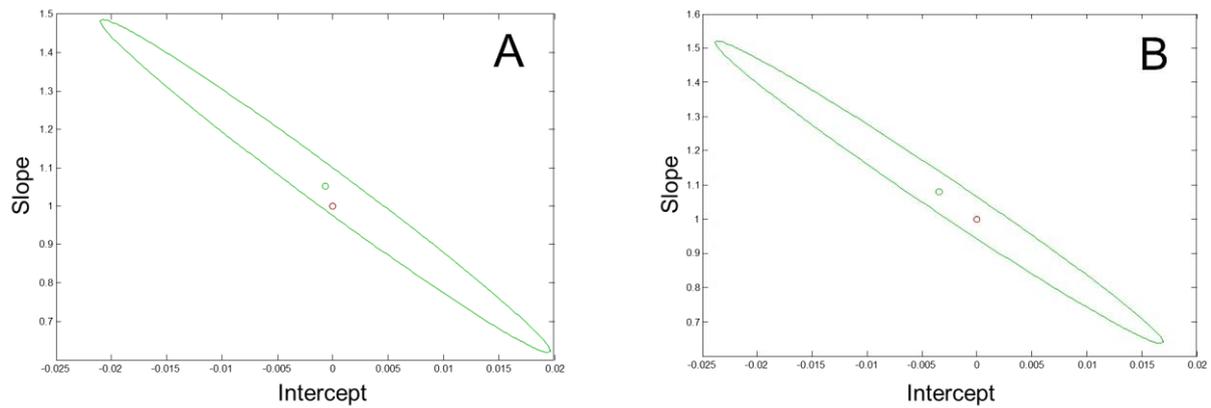


Figura 9. Regiones elípticas de confianza conjunta para la regresión de mínimos cuadrados bivariados (BLS) a un nivel de significancia del 5 %: Comparación de coeficientes empíricos (●) con la hipótesis nula teórica de intersección 0 y pendiente 1 (○) para AL-RGB vs. MOR (A), y CIE XYZ vs. MOR (B) con $Y=1,05X-0,01$ y $Y=1,08X-0,01$, respectivamente.

La Figura 9 muestra las regiones de confianza conjunta en forma de elipse resultantes de la aplicación del método de calibración BLS, contrastando los resultados entre los enfoques AL-RGB y CIE XYZ, y el MOR. Puede notarse que las pendientes de las curvas de regresión para ambas aproximaciones se acercaron estrechamente a 1 (1,05 para AL-RGB y 1,08 para CIE XYZ), lo que sugiere una correlación sólida. Además, las intersecciones estuvieron cerca de 0 (0,01 en ambos casos), lo que indica un sesgo mínimo. El coeficiente de correlación para estas relaciones lineales superó 0,99, proporcionando evidencia adicional de la fuerte correlación entre los conjuntos de datos. Estos resultados indican que las metodologías propuestas proporcionan resultados que se alinean correctamente con las concentraciones determinadas por el MOR, con un sesgo estadísticamente no significativo para los valores obtenidos a través del método propuesto.

5. Conclusiones

En esta tesina se desarrolló un método imagenocolorimétrico alternativo basado en un sistema de captura y procesamiento de imágenes para la determinación indirecta del contenido de P_{total} en **bebidas cola**, mediante la reacción de formación del complejo **PMB** y su subsiguiente medición colorimétrica utilizando colorimetría *CIE*.

El uso de una solución de cloruro estañoso ($SnCl_2$) en ácido sulfúrico (H_2SO_4) como agente reductor del *12-PMA*, precursor en la formación del complejo **PMB**, resultó ser una alternativa más rápida y eficiente que el reactivo de *Murphy-Riley* utilizado en la metodología del *MOR*. Esto permitió maximizar la respuesta analítica del método y realizar la determinación del complejo en un tiempo sustancialmente más corto que con el *MOR* (5 min).

Además, se desarrolló un dispositivo portátil de impresión 3D (*PCD*) acoplable a un *smartphone* convencional que permitió la implementación de la espectroscopía de imágenes como sistema de detección. El uso de imágenes retroiluminadas con luz ambiente difusa, resultó ser una alternativa eficiente, confiable y económica en términos energéticos, en comparación con iluminantes electrodependientes de uso común, como las luces *LED* u otros, para la medición de la luminancia como señal analítica.

El empleo conjunto de técnicas de procesamiento de imágenes digitales, como el ajuste lineal de niveles, la inversión de la *corrección gamma* y la colorimetría *CIE*, permitió obtener curvas de calibrado con un desempeño analítico destacable, mostrando sensibilidades de calibración y analíticas superiores a las del *MOR*, así como valores de *LOD* y *LOQ* inferiores a los obtenidos con este método. Los coeficientes de linealidad también resultaron ser comparables.

El método imagenocolorimétrico propuesto permitió la determinación del contenido de P_{total} en muestras de ocho marcas comerciales diferentes de **bebidas cola** con una precisión adecuada y una exactitud comparable a la del *MOR*, tal como se evidenció por los resultados de la prueba de confianza conjunta para los coeficientes de regresión, basada en el método de calibración de mínimos cuadrados bivariados (*BLS*).

6. Bibliografía

- Amarilla, C. D. (2019). Optimización del método de azul de molibdeno para la determinación de fosfatos en bebidas [Tesina de Licenciatura en Química]. Universidad Nacional del Sur.
- Anderson, J. J. B., Rondano, P., & Holmes, A. (1996). Roles of Diet and Physical Activity in the Prevention of Osteoporosis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 25(sup103), 65-74. <https://doi.org/10.3109/03009749609103752>
- ANMAT. (2023). Capítulo XII. Bebidas hídricas, agua y agua gasificada". Bebidas Analcohólicas. Artículos 996c, 1000, y Resolución (ex MSyAS) N° 587/97. In Código Alimentario Argentino - CAA.
- AOAC INTERNATIONAL. (2016). Official method 995.11: Phosphorus (total) in foods, Colorimetric method. (20th ed., Vol. 1). AOAC INTERNATIONAL.
- Bagaria, A. (2022). Review on Color Image Processing Techniques (pp. 285-290). https://doi.org/10.1007/978-3-030-92905-3_37
- Barbosa, J., Consalter, R., Pauletti, V., & Motta, A. (2016). Uso de imagens digitais obtidas com câmeras para analisar plantas. *Revista de Ciências Agrárias*, 39(1), 15-24. <https://doi.org/10.19084/RCA15006>
- Barnett, G. (2007). Digital Camera Raw. In *The Focal Encyclopedia of Photography* (pp. 401-403). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-80740-9.50067-2>
- Barreto, J. A., dos Santos de Assis, R., Santos, L. B., Cassella, R. J., & Lemos, V. A. (2020). Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples. *Microchemical Journal*, 157, 105064. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105064>
- Barros, J. A. V. A., Oliveira, F. M. de, Santos, G. de O., Wisniewski, C., & Luccas, P. O. (2017). Digital Image Analysis for the Colorimetric Determination of Aluminum, Total Iron, Nitrite and Soluble Phosphorus in Waters. *Analytical Letters*, 50(2), 414-430. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1182542>
- Bell, R. D., & Doisy, E. A. (1920). Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood. *Journal of Biological Chemistry*, 44(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86271-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86271-8)
- Ben da Costa, A., Pappis, C., Librelotto, M., Baumann, L., Parckert, A., Santos, R., Teixeira, I., Helfer, G. A., & Lobo, E. A. (2019). Point-of-use determination of fluoride and phosphorus in water through a smartphone using the PhotoMetrix® app. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 6(25). <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.TN-25-2019>
- Bird, R. P., & Eskin, N. A. M. (2021). The emerging role of phosphorus in human health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 96, 27-88. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2021.02.001>
- Bringhurst, F. R., Demay, M. B., & Kronenberg, H. M. (2011). Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. In *Williams Textbook of Endocrinology* (pp. 1237-1304). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0324-5.00028-6>

- Bull, D. R., & Zhang, F. (2021). The human visual system. In *Intelligent Image and Video Compression* (pp. 17-58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820353-8.00011-6>
- Byrne, L., Barker, J., Pennarun-Thomas, G., Diamond, D., & Edwards, S. (2000). Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(8), 517-522. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(00\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00019-4)
- Calvo, M. S., & Uribarri, J. (2013a). Contributions to Total Phosphorus Intake: All Sources Considered. *Seminars in Dialysis*, 26(1), 54-61. <https://doi.org/10.1111/sdi.12042>
- Calvo, M. S., & Uribarri, J. (2013b). Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 6-15. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.053934>
- Chen, Y.-R., Chao, K., & Kim, M. S. (2002). Machine vision technology for agricultural applications. *Computers and Electronics in Agriculture*, 36(2-3), 173-191. [https://doi.org/10.1016/S0168-1699\(02\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1699(02)00100-X)
- Cheng, Y., Wang, H., Zhuo, Y., Song, D., Li, C., Zhu, A., & Long, F. (2022). Reusable smartphone-facilitated mobile fluorescence biosensor for rapid and sensitive on-site quantitative detection of trace pollutants. *Biosensors and Bioelectronics*, 199, 113863. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113863>
- Cho, Y.-H., & Nielsen, S. S. (2017). Phosphorus Determination by Murphy-Riley Method (pp. 153-156). https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_17
- Cupisti, A., Benini, O., Ferretti, V., Gianfaldoni, D., & Kalantar-Zadeh, K. (2012). Novel Differential Measurement of Natural and Added Phosphorus in Cooked Ham With or Without Preservatives. *Journal of Renal Nutrition*, 22(6), 533-540. <https://doi.org/10.1053/J.JRN.2011.12.010>
- Cupisti, A., & Kalantar-Zadeh, K. (2013). Management of Natural and Added Dietary Phosphorus Burden in Kidney Disease. *Seminars in Nephrology*, 33(2), 180-190. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.12.018>
- Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, 67(10), 1699-1723. <https://doi.org/10.1351/pac199567101699>
- Currie, L. A. (1999). Detection and quantification limits: origins and historical overview¹Adapted from the Proceedings of the 1996 Joint Statistical Meetings (American Statistical Association, 1997). Original title: "Foundations and future of detection and quantification limits". Contribution of the National Institute of Standards and Technology; not subject to copyright.¹. *Analytica Chimica Acta*, 391(2), 127-134. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00105-1)
- da Silva, E. A. B., & Mendonça, G. V. (2005). Digital Image Processing. In *The Electrical Engineering Handbook* (pp. 891-910). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012170960-0/50064-5>
- De Beer, J. O., Naert, C., & Deconinck, E. (2012). The quality coefficient as performance assessment parameter of straight line calibration curves in relationship with the number of

- calibration points. *Accreditation and Quality Assurance*, 17(3), 265-274. <https://doi.org/10.1007/s00769-011-0871-1>
- de Oliveira Morais, P. A., de Souza, D. M., Madari, B. E., Soares, A. da S., & de Oliveira, A. E. (2019). Using image analysis to estimate the soil organic carbon content. *Microchemical Journal*, 147, 775-781. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.070>
- Dempster, J. (2001). Image Analysis. In *The Laboratory Computer* (pp. 261-298). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012209551-1/50042-8>
- Deniges, M. G. (1920). Reaction de coloration extremement sensible des phosphates et des arseniates. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences*, 171, 802-804.
- Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. (1997). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/5776>
- Distante, A., & Distante, C. (2020). Image Formation Process. In *Handbook of Image Processing and Computer Vision* (pp. 1-56). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38148-6_1
- Dominguez, M. A., & Centurión, M. E. (2015). Application of digital images to determine color in honey samples from Argentina. *Microchemical Journal*, 118, 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.08.002>
- Eriksson, M., & Iqbal, Z. (2014). Two measurement modes for mobile phone optical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 195, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.005>
- Gaiao, E. da N., Martins, V. L., Lyra, W. da S., Almeida, L. F. de, Silva, E. C. da, & Araújo, M. C. U. (2006). Digital image-based titrations. *Analytica Chimica Acta*, 570(2), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.048>
- Geladi, P., Bengtsson, E., Esbensen, K., & Grahn, H. (1992). Image analysis in chemistry I. Properties of images, greylevel operations, the multivariate image. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11(1), 41-53. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)80118-P](https://doi.org/10.1016/0165-9936(92)80118-P)
- Geladi, P., Wold, S., & Esbensen, K. (1986). Image analysis and chemical information in images. *Analytica Chimica Acta*, 191, 473-480. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86335-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86335-7)
- Gliszczynska-Świgło, A., & Rybicka, I. (2021). Fast and sensitive method for phosphorus determination in dairy products. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 16(3), 213-218. <https://doi.org/10.1007/s00003-021-01329-x>
- Gupta, R. P. (2018). *Remote Sensing Geology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-55876-8>
- Gutiérrez, O. M. (2020). Phosphorus. In *Present Knowledge in Nutrition* (pp. 335-348). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-66162-1.00020-2>
- Heaney, R. P. (2004). Phosphorus Nutrition and the Treatment of Osteoporosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 79(1), 91-97. <https://doi.org/10.4065/79.1.91>
- Helfer, G. A., Magnus, V. S., Böck, F. C., Teichmann, A., Ferrão, M. F., & Costa, A. B. da. (2016). PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis

- Using Colorimetry on Mobile Devices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>
- Iheagwara, O. S., Ing, T. S., Kjellstrand, C. M., & Lew, S. Q. (2013). Phosphorus, phosphorous, and phosphate. *Hemodialysis International*, 17(4), 479-482. <https://doi.org/10.1111/hdi.12010>
- Jain, R., Jha, R. R., Kumari, A., & Khatri, I. (2021). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with digital image colorimetry for paracetamol analysis. *Microchemical Journal*, 162, 105870. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105870>
- Kaufmann M. (2012). Linear-light and perceptual uniformity. In *Digital Video and HD* (pp. 27-36). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391926-7.50003-5>
- Khalaf, E. M., Sanaan Jabbar, H., Mireya Romero-Parra, R., Raheem Lateef Al-Awsi, G., Setia Budi, H., Altamimi, A. S., Abdulfadhil Gatea, M., Falih, K. T., Singh, K., & Alkhuzai, K. A. (2023). Smartphone-assisted microfluidic sensor as an intelligent device for on-site determination of food contaminants: Developments and applications. *Microchemical Journal*, 190, 108692. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108692>
- Kim, M. S., Chen, Y.-R., Cho, B.-K., Chao, K., Yang, C.-C., Lefcourt, A. M., & Chan, D. (2007). Hyperspectral reflectance and fluorescence line-scan imaging for online defect and fecal contamination inspection of apples. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 1(3), 151-159. <https://doi.org/10.1007/s11694-007-9017-x>
- Köllo, M., Kudrjašova, M., Kulp, M., & Aav, R. (2013). Methylphosphonic acid as a ³¹P-NMR standard for the quantitative determination of phosphorus in carbonated beverages. *Analytical Methods*, 5(16), 4005. <https://doi.org/10.1039/c3ay40743h>
- Levenson, D. I., & Bockman, R. S. (2009). A Review of Calcium Preparations. *Nutrition Reviews*, 52(7), 221-232. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01427.x>
- Llamas, N. E., Garrido, M., Nezio, M. S. Di, & Band, B. S. F. (2009). Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares. *Analytica Chimica Acta*, 655(1-2), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.001>
- Lozano-Calero, D., Martín-Palomeque, P., & Madueño-Loriguillo, S. (1996). Determination of Phosphorus in Cola Drinks. *Journal of Chemical Education*, 73(12), 1173. <https://doi.org/10.1021/ed073p1173>
- Luiz, V. H. M., Lima, L. S., Rossini, E. L., Pezza, L., & Pezza, H. R. (2019). Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis. *Microchemical Journal*, 147, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.006>
- Mahajan, L., Saxena, S., & Sarma, P. U. (2018). Phosphorus Compounds: Their Discovery in Biological World. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(3), 243-245. <https://doi.org/10.1007/s12291-018-0775-5>
- Martínez, À., Riu, J., Busto, O., Guasch, J., & Xavier Rius, F. (2000). Validation of bias in multianalyte determination methods. *Analytica Chimica Acta*, 406(2), 257-278. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00766-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00766-7)

- Masawat, P., Harfield, A., Srihirun, N., & Namwong, A. (2017). Green Determination of Total Iron in Water by Digital Image Colorimetry. *Analytical Letters*, 50(1), 173-185. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1174869>
- Mehl, P. M., Chen, Y.-R., Kim, M. S., & Chan, D. E. (2004). Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple surface defects and contaminations. *Journal of Food Engineering*, 61(1), 67-81. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00188-2)
- Morais, P. A. de O., Souza, D. M. de, Carvalho, M. T. de M., Madari, B. E., & de Oliveira, A. E. (2019). Predicting soil texture using image analysis. *Microchemical Journal*, 146, 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.009>
- Murphy, J. (1983). Determination of phosphoric acid in cola beverages: a colorimetric and pH titration experiment for general chemistry. *Journal of Chemical Education*, 60(5), 420. <https://doi.org/10.1021/ed060p420>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P., & Kolev, S. D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, 890, 60-82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>
- Padeste, R. (2007). Imaging Systems. In *The Focal Encyclopedia of Photography* (pp. 364-370). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-80740-9.50058-1>
- Passaretti Filho, J. (2015). Análise de imagens para fins analíticos: aplicações ambientais e tecnológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Peterson, B. (2016). *Understanding Exposure* (Fourth Edition). Amphoto Books.
- Phansi, P., Janthama, S., Cerdà, V., & Nacapricha, D. (2022). Determination of phosphorus in water and chemical fertilizer samples using a simple drawing microfluidic paper-based analytical device. *Analytical Sciences*, 38(10), 1323-1332. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00162-y>
- Picard, K., Griffiths, M., Senior, P. A., Mager, D. R., & Richard, C. (2023). Phosphorus Additives and Their Impact on Phosphorus Content in Foods—An Analysis of the USDA's Branded Foods Product Database. *Journal of Renal Nutrition*, 33(3), 443-449. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2022.12.007>
- Pulliainen, T. K., & Wallin, H. C. (1996). Determination of Total Phosphorus in Foods by Colorimetry: Summary of NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 79(6), 1408-1410. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.6.1408>
- Puno, J. C., Sybingco, E., Dadios, E., Valenzuela, I., & Cuello, J. (2017). Determination of soil nutrients and pH level using image processing and artificial neural network. 2017IEEE 9th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management (HNICEM), 1-6. <https://doi.org/10.1109/HNICEM.2017.8269472>

- Reinhold, J. G., Faradji, B., Abadi, P., & Ismail-Beigi, F. (1976). Decreased Absorption of Calcium, Magnesium, Zinc and Phosphorus by Humans due to Increased Fiber and Phosphorus Consumption as Wheat Bread. *The Journal of Nutrition*, 106(4), 493-503. <https://doi.org/10.1093/jn/106.4.493>
- Riu, J., & Rius, F. X. (1996). Assessing the Accuracy of Analytical Methods Using Linear Regression with Errors in Both Axes. *Analytical Chemistry*, 68(11), 1851-1857. <https://doi.org/10.1021/ac951217s>
- Santos de Souza, V., Santos Silva, S. M., Maia, L. C., Monteiro, D. dos S., & Vasconcelos Souza, A. L. (2023). Development of a methodology for phosphorus determination in soils, water, and biofertilizer using digital image analysis - DIA. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 240, 104929. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2023.104929>
- Schanda J. (2007). *Colorimetry* (J. Schanda, Ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470175637>
- Schults, E. V., Monogarova, O. V., & Oskolok, K. V. (2019). Digital Colorimetry: Analytical Possibilities and Prospects of Use. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 74(2), 55-62. <https://doi.org/10.3103/S002713141902007X>
- Schweizer, S. M., & Moura, J. M. F. (2001). Efficient detection in hyperspectral imagery. *IEEE Transactions on Image Processing*, 10(4), 584-597. <https://doi.org/10.1109/83.913593>
- Shafi Al-Jorani, Y., & Hussien Al-Sowdani, K. (2020). Designing and constructing a micro flow injection system (μ FIA) for phosphate determination in soft drinks. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 871(1), 012032. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/871/1/012032>
- Smith, A. (2007). *The Oxford Companion to American Food and Drink*. Oxford University Press.
- Süsstrunk, S. (2007a). Color Spaces, Color Encodings, and Color Image Encodings. In *The Focal Encyclopedia of Photography* (pp. 394-398). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-80740-9.50064-7>
- Süsstrunk, S. (2007b). Colorimetry. In *The Focal Encyclopedia of Photography* (pp. 388-393). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-80740-9.50063-5>
- Süsstrunk, S. (2007c). Image Formation. In *The Focal Encyclopedia of Photography* (pp. 382-388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-80740-9.50062-3>
- Tan, L., & Jiang, J. (2019). Image Processing Basics. In *Digital Signal Processing* (pp. 649-726). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815071-9.00013-0>
- Tang, Y., Chang, K., Huang, M., & Li, B. (2023). BMISP: Bidirectional mapping of image signal processing pipeline. *Signal Processing*, 212, 109135. <https://doi.org/10.1016/j.sigpro.2023.109135>
- Teegarden, D., Lyle, R. M., McCabe, G. P., McCabe, L. D., Proulx, W. R., Michon, K., Knight, A. P., Johnston, C. C., & Weaver, C. M. (1998). Dietary calcium, protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(3), 749-754. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.3.749>

- Tomaska, L. D., & Brooke-Taylor, S. (2014). Food Additives: Food Additives - General. In Encyclopedia of Food Safety (pp. 449-454). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00234-1>
- Tonogai, Y., & Iwaida, M. (1981). Rapid Determination of Ortho- and Polyphosphates in Soft Drinks. *Journal of Food Protection*, 44(11), 835-838. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.11.835>
- Truog, E., & Meyer, A. H. (1929). Improvements in the deniges colorimetric method for phosphorus and arsenic. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 1(3), 136-139. <https://doi.org/10.1021/ac50067a011>
- Uriarte, D., Vidal, E., Canals, A., Domini, C. E., & Garrido, M. (2021). Simple-to-use and portable device for free chlorine determination based on microwave-assisted synthesized carbon dots and smartphone images. *Talanta*, 229, 122298. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122298>
- Valeria Springer, Avila, F., & Avena, M. (2020). A Simple Strategy for Methylene Blue Determination in Human and Veterinary Dosage Forms by Digital Imaging. *Journal of Analytical Chemistry*, 75(7), 958-964. <https://doi.org/10.1134/S1061934820070151>
- Vankeerberghen, P., & Smeyers-Verbeke, J. (1992). The quality coefficient as a tool in decisions about the quality of calibration in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 15(2-3), 195-202. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(92\)85009-R](https://doi.org/10.1016/0169-7439(92)85009-R)
- Vidal, E., Lorenzetti, A. S., Garcia, C. D., & Domini, C. E. (2021). Use of universal 3D-Printed smartphone spectrophotometer to develop a time-based analysis for hypochlorite. *Analytica Chimica Acta*, 1151, 338249. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338249>
- Vohra, P., & Kratzer, F. H. (1966). Influence of Various Phosphates and Other Complexing Agents on the Availability of Zinc for Turkey Poults. *The Journal of Nutrition*, 89(1), 106-112. <https://doi.org/10.1093/jn/89.1.106>
- Wickham, E. (2014). Phosphorus Content in Commonly Consumed Beverages. *Journal of Renal Nutrition*, 24(1), e1-e4. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2013.10.002>
- Wüller, D. (2007). Digital Camera Testing. In *The Focal Encyclopedia of Photography* (pp. 377-382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-80740-9.50061-1>
- Yu, H., Tan, Y., & Cunningham, B. T. (2014). Smartphone Fluorescence Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 86(17), 8805-8813. <https://doi.org/10.1021/ac502080t>
- Zhang, G., Song, S., Panescu, J., Shapiro, N., Dannemiller, K. C., & Qin, R. (2023). A novel systems solution for accurate colorimetric measurement through smartphone-based augmented reality. *PLOS ONE*, 18(6), e0287099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287099>