



IMÁGENES DIGITALES EN LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS: ESTUDIO DEL ILUMINANTE.

Grupo de investigación:

Colorimetría de Imágenes Digitales

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

MARÍA PILAR BERLÍN LARQUÉ

DIRECTOR: ÁNGEL LOPEZ MOLINERO

Convocatoria de Septiembre de 2015

Abstract

A digital image based method for colorimetric determination of Calcium with the reagent GBHA has been developed. It measured the reflected intensity of the basic colours, RGB, in images captured by a digital compact camera.

The study by chemometric techniques has allowed to characterize a chromatic character in the system which was based on Principal Components. The chromatic variance has been considered as an important parameter and related with the analytical conditions. In this context, it was evaluated and the significance of different effects could be evidenced.

As a principal goal of this study, the influence of the lighting on the reflected colour evidenced that the combination: green illuminating and green reflected colour provided the highest chromatic variance and consequently the highest analytical potential. The analytical performance of the new method improves the linear range, up to 10mg/l, with a detection limit level of 1,0 mg/l, and reproducibility of 3% DSR.

The method has been applied to the determination of Calcium in pharmaceutical tablets. The results have been statistically and chemometrically evaluated.

Key words:

Digital image colorimetry, RGB colours, chromatic variance, Ca determination, therapeutic pills.

Resumen

Se desarrolla un método de captura de imágenes digitales para la determinación colorimétrica de Calcio mediante su reacción con el reactivo GBHA. La medida de la intensidad reflectada en los colores básicos, RGB, se ha estudiado mediante técnicas quimiométricas, lo que ha permitido definir un carácter cromático en coordenadas basadas en Componentes Principales. La varianza cromática ha sido tratada como un importante parámetro de evaluación analítica. En este contexto, su evaluación ha permitido evidenciar la influencia de diferentes factores analíticos.

El estudio de la influencia del iluminante sobre el color reflejado, ha permitido establecer un mejor método basado en la combinación: iluminante verde y color reflejado verde. Las prestaciones analíticas del nuevo método mejoran el rango lineal, hasta 10 mg/l, con un Límite de detección al nivel de 1,0 mg/l, y una reproducibilidad del 3% DSR.

El método se ha aplicado a la determinación de Calcio en comprimidos farmacéuticos. Los resultados han sido evaluados mediante técnicas estadísticas y quimiométricas.

Palabras clave:

Digital image colorimetry, RGB colours, chromatic variance, Ca determination, therapeutic pills.

Índice

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN: COLORIMETRÍA DE IMÁGENES DIGITALES.....	1
1.1- La colorimetría tricromática	
1.2- Empleo de la colorimetría RGB en investigaciones precedentes	
2. MÉTODOS RÁPIDOS.....	3
3. EL CALCIO.....	3
3.1- Calcio: EL elemento	
3.2- El reactivo: GBHA	
3.3- Determinaciones de Calcio	
3.4-Comprimidos farmacéuticos	
4. OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO.....	5

CAPITULO II: EXPERIMENTAL

1. APARATOS, EQUIPOS Y SOFTWARE.....	6
1.1-Cámaras digitales	
1.2-Captura de imágenes	
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS.....	7
3. OTROS MATERIALES DE LABORATORIO.....	7
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	8
4.1- Preparación de una experiencia tipo: rango dinámico	
4.2-Captura de imágenes	
4.3-Lectura de los colores mediante MatLab	
5. LA MUESTRA.....	9

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SISTEMA CROMOGENICO.....	10
1.1- Características básicas: Estudio cromogénico	
1.2- Interpretación mediante componentes principales, PC's	
1.3- Estudio del rango dinámico en un sistema cerrado	
2. ESTUDIO DE LAS FUENTES DE VARIANZA CROMÁTICA.....	13
2.1- Varianza cromática	
2.2-Fuentes de la varianza cromática	
3. INFLUENCIA DE FACTORES EXPERIMENTALES.....	16
3.1- Estudio de diferentes factores	
3.2- Efecto de la fuente de iluminación	
4. PRESTACIONES ANALÍTICAS Y CALIBRACIÓN.....	19
4.1.- Rango lineal y prestaciones analíticas para iluminación verde y blanca	
4.2.- Rango lineal. Con medida de valores relativos R/T, G/T, B/T	
5. APLICACIÓN DEL MÉTODO. DETERMINACIÓN DE CALCIO EN MUESTRAS REALES.....	22
5.1- Introducción	
5.2- Aplicación del método colorimétrico	
5.2.1- Preparación de la muestra: Experimental	
5.3- Resultados	
6.-EVALUACIÓN DEL MÉTODO.....	24

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFIA

Capítulo I: Introducción y objetivos

1.-INTRODUCCIÓN: COLORIMETRÍA DE IMÁGENES DIGITALES.

Nuevos métodos analíticos basados en imágenes digitales, en particular la Colorimetría de Imágenes Digitales¹, DIC, capturan imágenes mediante: cámaras digitales², 'smart-phones'³, 'i-pad-tablets', 'web-cam'⁴ o incluso 'escáneres'⁵. Son sistemas sencillos que se caracterizan por tener detectores de radiación del tipo CMOS (complementary metal oxide semiconductor), o CCD (charge coupled device), que pueden proporcionar una medida rápida de colores básicos: Rojo, Verde y Azul, RGB

En su aplicación analítica diferenciamos dos principales tipos:

- Basadas en colores intrínsecos, es decir cuando los mismos reactivos o productos experimentan un cambio de color.
- Procesos con el uso de compuestos cromogénicos externos que reaccionan con los analitos, para producir un color o un cambio de color.

Esta metodología se está demostrando muy útil y de una gran y actual implantación ya que permite desarrollar procedimientos de detección y medida rápida para diferentes analitos y campos muy diversos. Tales como iones y metabolitos en fluidos biológicos, compuestos de tipo antiséptico, Fe y Cl en agua del grifo, Ti en plásticos. Así como monitorización continua y automática de reactivos en tiempo real, controlar procesos industriales de electrodeposición, pruebas de campo semi-cuantitativas de compuestos opiáceos ilícitos, anfetaminas, Ni en meteoritos de hierro o contaminantes orgánicos en el agua^{6,7,8}.

Es de interés mencionar también la aplicación en la detección de la emisión de llamas. Con estos métodos se expande la aplicabilidad desde métodos típicamente moleculares hacia métodos de base atómica: métodos DIB-FES. Que se han aplicado a la determinación indirecta de drogas terapéuticas⁹.

Los principios de la determinación analítica cuantitativa mediante imágenes digitales, son:

- Captura de una imagen digital.
- Lectura de la intensidad de la luz reflejada.
- Expresión en colores básicos RGB.
- Relación con la concentración del analito de interés.
-

En este procedimiento la luz que alcanza un pixel del detector CCD-CMOS es luz reflejada desde los objetos coloreados que han sido previamente iluminados. La luz reflejada pasa por diferentes filtros (RGB), siendo así detectada y medida. Finalmente, los datos son escalados y ajustados para compensar las variaciones en las condiciones de captura, tales como las debidas al nivel de exposición-brillo, y la cromaticidad del iluminante (balance del blanco). Estos datos son valores individuales RGB, escalados según la sensibilidad del detector-sensor. Así, sensores que leen mediante 8 bits, dan lugar a respuestas escaladas en el rango: 0-255 unidades: 2^8 . Mayores escalas, y sensibilidades, son posibles. Así, sensores que miden con 24 bits dan lugar a mediadas con escala de 2^{24} : 0-16 777 216.

En estos sistemas los colores pueden ser definidos y codificados como una suma aditiva de los tres filtros: RGB. Así, en un sensor con lectura de 8 bits, el color negro viene definido por la codificación: (0, 0, 0); mientras que el color blanco es definido por: (255, 255, 255).

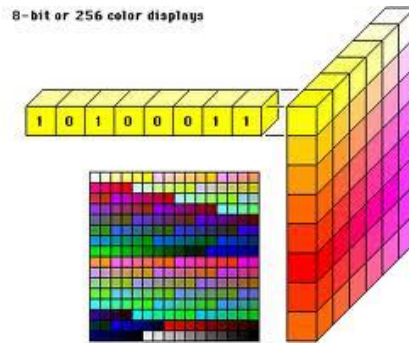


Figura 1: Codificación de un canal de color mediante un sensor de 8 bits

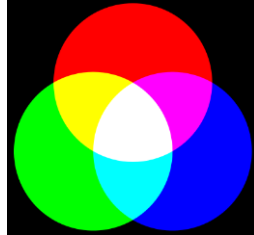


Figura 2: Imagen de una composición aditiva de colores básicos

Los valores RGB medidos son dependientes de muchos factores, incluidos: la fuente del iluminante, la reflectancia de los objetos y los efectos de interpretación de la cámara. Este complejo modelo introduce algún grado de error y diferencias cuando se comparan diferentes capturas-imágenes.

La metodología analítica DIC cuantitativa estudia las relaciones entre las intensidades de los colores básicos con las concentraciones analíticas en las condiciones de comparabilidad u reproducibilidad que dan lugar a resultados fiables.

1.1.- La colorimetría tricromática

El principio de la colorimetría tricromática establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios convenientemente elegidos. En el sistema de coloración definido por la CIE (1931) se toman como colores primarios: los obtenidos a longitudes de onda: 435,8nm (azul), el 546,1nm (verde) y el 700nm (rojo).

Los sistemas de medida de color en las cámaras digitales se basan en el uso de una máscara o filtro-mosaico de colores que se sitúa sobre el sensor, CCD-CMOS. Los filtros transmiten la luz de un solo color primario: R, G o B.

El típico filtro es el conocido como mosaico-máscara de Bayer y que se presenta en la **Figura 3**. Como se puede ver, el filtro está formado por una distribución y disposición sistemática de filtros verdes (50% del total), rojos (25%) y azules (25%).

Así pues, a cada píxel-fotodiodo del sensor le llega la luz correspondiente a un tono de color, para posteriormente deducir el color total, en cada píxel, con la integración de la luminosidad que aportan 4 píxeles diferentes próximos. Es decir, la señal cromática de una cámara, es dependiente de la configuración de la máscara y los algoritmos-procesos de interpolación de los colores individuales.

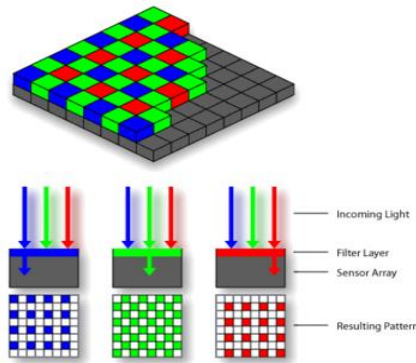


Figura 3: Mosaico típico de Bayer utilizado en las cámaras digitales, en el cuál se muestra la predominancia de los puntos verdes.

1.2.- Empleo de la colorimetría RGB en investigaciones precedentes

Nuestro grupo se ha orientado a la caracterización de los principios de la DIC, mediante el uso de técnicas quimiométricas avanzadas. Así mismo, se han desarrollado metodologías analíticas aplicables en diferentes ámbitos a través de medidas RGB. Así, se ha trabajado entre otros en:

- La determinación de Ti (IV) mediante la formación de un peroxo-complejo mediante la reacción con agua oxigenada¹⁰.
- La determinación de Ag (I) en biocidas mediante la formación de complejos coloreados con la Rodanina.
- La determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Este método ha permitido seguir procesos avanzados de oxidación de materia orgánica natural y no natural. Las características se basan en la formación de un complejo coloreados con Ti (IV) ¹¹.

2.-MÉTODOS RÁPIDOS

De la tendencia de adaptación al uso, necesidad, de los métodos experimentales nacen los métodos rápidos de análisis, que buscan ofrecer un resultado cuantitativo en el menor tiempo posible.

Entre los procedimientos rápidos, se incluyen `métodos listos para usar': "ready for use" y métodos de campo. Estos son adecuados para la vigilancia rápida en diversos ámbitos como son el análisis clínico o el medio-ambiental, para los que se necesitan un gran número de determinaciones, muy repetitivas y en un corto periodo de tiempo. El papel estratégico de este tipo de métodos ha sido reconocido por ISO y los fabricantes más importantes de productos químicos.

Podemos decir que los métodos desarrollados mediante DIC caen dentro de este tipo de metodología rápida.

3.-EL CALCIO Y EL REACTIVO CROMOGENICO

3.1.- Ca (II): el elemento

El Calcio es el mineral con mayor presencia en el organismo y el cuarto componente del cuerpo después del agua, las proteínas y las grasas. El Calcio corporal total, se aproxima a los 1200 gramos, lo que es equivalente a decir 1,5 a 2% de nuestro peso corporal. De este, casi un 99% se concentra en

los huesos y dientes, y el 1% restante se distribuye en el torrente sanguíneo, los líquidos intersticiales y las células musculares.

Tanto su carencia como su exceso son perjudiciales para la salud, ya que participa en la coagulación, en la correcta permeabilidad de las membranas y a su vez adquiere fundamental importancia como regulador nervioso y neuromuscular, modulando la contracción muscular (incluida la frecuencia cardíaca), la absorción y secreción intestinal y la liberación de hormonas.

Los alimentos con mayor contenido en Calcio son los productos lácteos, los frutos secos, las sardinas y las anchoas; ya en menor proporción en legumbres y vegetales verdes oscuros (espinaca, acelga, brócoli).

En la actualidad, la importancia otorgada al físico y la salud, y la calidad y control de los alimentos, hace que el control de los minerales, tales como el Calcio, entre otros nutrientes, sea una vía de investigación de gran importancia. El control del contenido del Calcio en leche es incluso un reclamo publicitario.

3.2.-El reactivo: GBHA

El Glyoxal bis(2-hydroxanil): GBHA, forma un complejo de color rojo poco soluble con Calcio en medio alcalino. La formación del complejo se describe en la **Figura 4**:

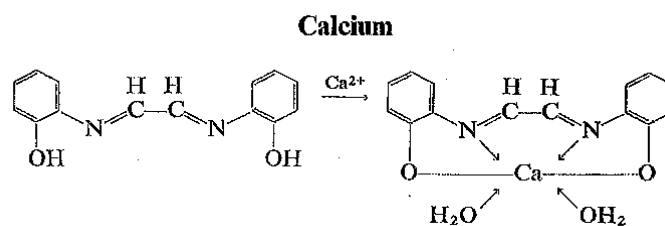


Figura 4: Reacción GBHA-Ca (II)

La disolución de GBHA en metanol es incolora. Tan pronto se añade el hidróxido de sodio, los grupos hidroxilo se disocian y la disolución adquiere color amarillo intenso. La óptima alcalinidad de la reacción con Calcio se establece para una concentración 0,04M NaOH, lo cual da lugar a la formación del complejo de color rojizo.

Su máxima absorción se presenta a 516nm, con una absorptividad molar de $1,8 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y una absorptividad específica 0,45. Su espectro de absorción se presenta en la **Figura 5**:

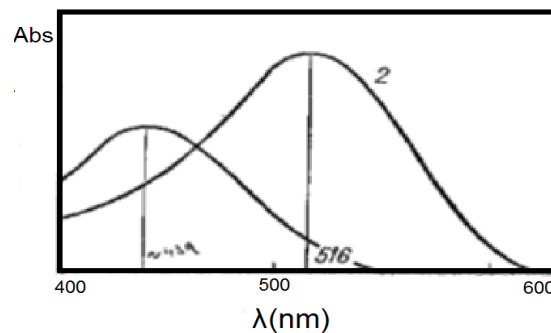


Figura 5: (1) Espectro de absorción de GBHA libre
(2) Espectro de absorción del complejo GBHA-Ca (II)

El GBHA reacciona con otros metales bivalentes (Ejemplos: Bario y Estroncio). El magnesio y los metales alcalinos no interfieren. Debido a la interferencia analítica de los metales del grupo I-III, deben de ser separados o bien enmascarados.

3.3.- Determinaciones de Calcio

Las determinaciones de rutina del Calcio se llevan a cabo por diferentes métodos analíticos según el tipo de muestra y su contenido. Podemos describir desde métodos clásicos: gravimétricos-volumétricos hasta instrumentales basados en absorción molecular o emisión atómica.

Destacamos el uso de procedimientos estandarizados basados en normas internacionales, como:

- Valoración complexométrica para la determinación de Calcio en agua con contenidos de este en el rango de 2-100mg/l¹².
- Determinación gravimétrica por precipitación de oxalato, y que puede ser fácilmente implementado por titulación con permanganato del precipitado de oxalato de Calcio.
- Métodos de espectrometría atómica mediante absorción atómica en llama (FAAS) o en emisión en ICP-OES. Siendo FAAS un método muy selectivo y sensible¹³.
- Técnicas de espectrometría molecular representan una alternativa muy habitual¹⁴.

Recientemente hemos publicado en nuestro grupo un trabajo para la determinación cuantitativa de Calcio en agua mediante un método basado en el uso de la DIC². El método se basa en el desarrollo de un sistema cromático por reacción del Ca (II) con el reactivo GBHA. La relación directa entre el color reflejado y la concentración de Ca (II) en disolución se establece de manera fácil y rápida. El método ha permitido determinar la dureza cálcica en un rango de 0-2 mg/l, en diversos tipos de agua de bebida.

3.4.- Comprimidos farmacéuticos

MASTICAL son pastillas masticables con un alto contenido en Ca. Es recomendado para el tratamiento de la deficiencia de Calcio y como suplemento en el tratamiento de la osteoporosis. También se prescribe como aglutinante de fosfato en pacientes con niveles elevados de fosfato en sangre.



4.- OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

- ✓ Identificar el perfil cromático de un método colorimétrico tras la captura de imágenes digitales con cámaras comerciales compactas.
- ✓ Caracterizar la varianza cromática del sistema y las influencias sobre la misma.
- ✓ Estudiar la influencia de la fuente de iluminación sobre la lectura de un color reflejado y sobre sus prestaciones analíticas.
- ✓ Optimizar las condiciones para desarrollar un *método de determinación de Ca (II) con el reactivo GBHA*, según la fuente de iluminación.
- ✓ Aplicar el método en el control de calidad de productos de interés, como medicamentos farmacéuticos.





Capítulo II: Experimental

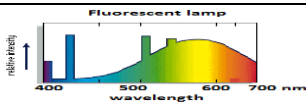
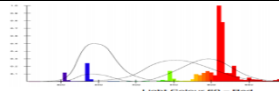
1.-APARATOS, EQUIPOS Y SOFTWARE

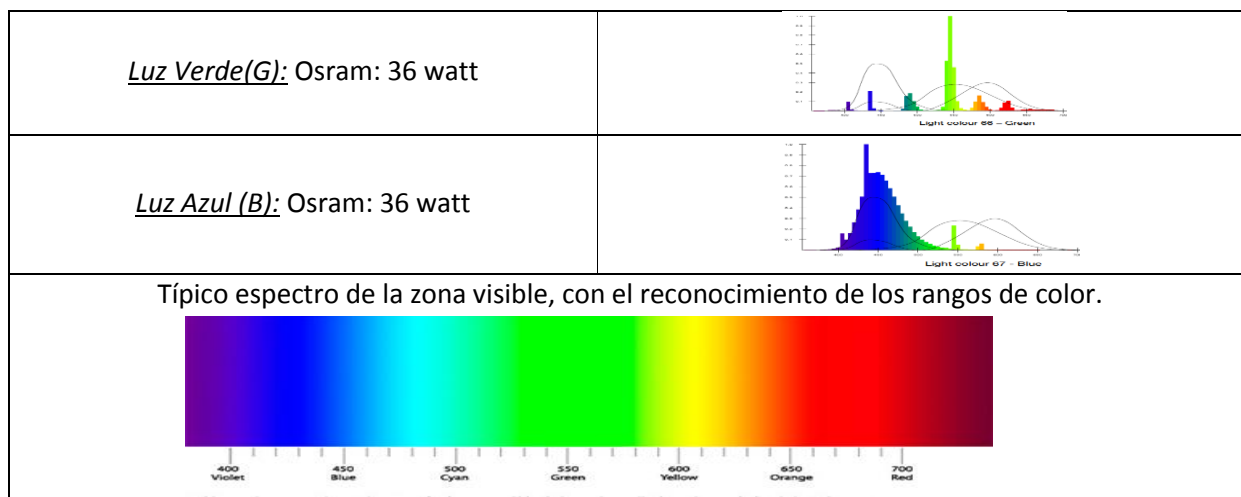
1.1-Cámaras digitales

Cámara digital OLYMPUS SP-510UZ	
Resolución	7,1 megapíxeles
Sensor `CCD´	1 /2.5”
	
Cámara digital CANON: Compacta: Power Shot SX230 HS	
Resolución	12,1 megapíxeles
Sensor `CMOS´	
	
Condiciones captura de imágenes	
Luz	Iluminación indirecta y artificial con lámparas fluorescentes. Colores: blanca, roja, verde y azul.
Distancia focal	30 y 35 cm
Exposición	Fondo blanco y negro
Disposición tubos de ensayo	Semicircular y lineal
Condiciones de registro	
Programas informáticos	MatLab 2011b y Microsoft Excel 2010
Imágenes en formato .jpg pasadas a ordenador y tratadas con MatLab y Microsoft Excel	

1.2-Captura de imágenes

“Work-Box”: Sistema y proceso de captura	
	
	

Lámparas fluorescentes: Luz blanca, roja verde y azul	
Luz	Espectro emisión
<u>Luz blanca (W)</u> : Sylvania(Osram), 36 watt, White cool : 6000K	
<u>Luz Roja (R)</u> : Philips: 36 watt	



2.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

Todos los reactivos fueron de grado analítico. El agua desionizada, también de grado analítico, fue obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore Elix 70. Sus características son dadas en la **Tabla 1**.



CARACTERÍSTICAS DEL AGUA ELIX	
Resistencia	>5MΩ·cm (typically 10-15MΩ·cm)
Conductividad	<0,2μS/cm (typically 0,067-0,10μS/cm)
TOC Típica	<30ppb
Recuento bacteriano	<10cfu/ml

Tabla 1: Características del sistema de purificación

- Disolución de Ca(II) de 100 mg/l: Se disuelven 62,5mg de CaCO₃ con 2-3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se llevan a 250ml con agua desionizada, en matraz aforado.
- Disolución de GBHA 0,06% w/v: se disuelven 30mg de GBHA en 50ml de metanol, en matraz aforado.
- Disolución de NaOH, 1M: se prepara disolviendo 4g de NaOH en 100ml de agua desionizada con agitación.

3- OTROS MATERIALES DE LABORATORIO

- Tubos de ensayo de vidrio de fondo redondo "NORMAX" de 12x75x8mm.
- Micropipetas Pipet-Lite 'RAININ' 5-50 μl, 20-200 μl, 100 μl – 1 ml y 0,5-5 ml.
- Matraces aforados de 50, 100 y 250ml.

4.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1-Preparación de una experiencia tipo: rango dinámico

Sobre un tubo de ensayo de 5 ml, se adicionan directamente los reactivos que aparecen en la **Tabla 2:**

Exp	Disolución NaOH 1M	Disolución [Ca (II)] 100 mg/l	Disolución GBHA 0,06% w/v	Desionizada H ₂ O	V total	[NaOH]	[GBHA]	[Ca(II)]
	μl	μl	ml	ml	ml	mol/l	% w/v	mg/l
Blanco	0	0	0	4	4	0,04	2,5·10 ⁻⁴	0
Blanco R	1	0	2	1,84	4			0
	2	10		1,83	4			0,250
	3	20		1,82	4			0,500
	4	30		1,81	4			0,749
	5	50		1,79	4			1,249
	6	70		1,77	4			1,748
	7	90		1,75	4			2,248
	8	110		1,73	4			2,748
	9	150		1,69	4			3,747
	10	200		1,64	4			4,996
	11	300		1,54	4			7,493
	12	400		1,44	4			9,991
	13	450		1,39	4			11,240
	14	500		1,34	4			12,489
	15	600		1,24	4	14,987		

Tabla 2: Condiciones para la preparación de la experiencia de rango dinámico

4.2.- Captura de imágenes

Sobre la `work-box` se sitúan los tubos de ensayo, a una distancia adecuada. Se utilizan fondos blancos y negros; se aplica iluminación indirecta y artificial, de diferentes colores, según el experimento.

La fotografía se captura con la cámara en “modo automático” y sin flash. Antes de tomar las imágenes, se pre-enfoca tomando como referencia el fondo blanco, para sistematizar los “balances de colores automáticos” y obtener lecturas reproducibles.

Se disponen los tubos de ensayo en forma semicircular de modo que estén a la misma distancia focal (30 o 35 cm), **Figura 6**. También se estudian en disposición alineada a 30 cm de la cámara.

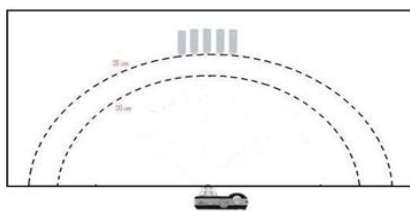


Figura 6: Disposición de los tubos de ensayo para la toma fotográfica

4.3.-Lectura de los colores mediante MatLab

Las imágenes en formato “.jpg” se transfieren al ordenador mediante la aplicación Microsoft Photo Editor. En cada imagen se miden las intensidades de los colores básicos RGB mediante *Matlab* y con un programa desarrollado por nosotros. La lectura final se obtiene como media de 1500 píxeles diferentes, que se reparten a lo largo de cada tubo de ensayo. El tratamiento matemático de los datos se realiza posteriormente mediante Microsoft Excel. En la **Tabla 3** se ofrecen las características más significativas del proceso.

Volcado de imágenes al ordenador	MicroSoft Windows 8, con Microsoft Photo Editor	
Lectura/ programa	MatLab 2011b	
Archivos	nombre = imread(‘archivo’)	
Matriz de datos RGB	‘nombre’= matriz de 1200x1600x3 (5760000 bits)	
Visualización de la imagen	Imshow(‘nombre’)	
Medida de la intensidad del color	A través de un programa diseñado por nuestro grupo de investigación	
Datos de la lectura	matriz de patrones	‘p’, patrones x 1500 puntos/patrón x 3 intensidad(RGB)/punto
	matriz de muestras:	‘m’, muestras x 1500 puntos/muestra x 3 intensidad(RGB)/punto
Tratamiento de los datos	Se exportan directamente a Excel	
Zona tipo para la lectura de colores RGB		

Tabla 3: Procedimiento para la medida de colores y tratamiento de datos en la imagen digital.

5.-LA MUESTRA

MASTICAL se dispone en comprimidos con un contenido en etiqueta de 500 mg de Calcio, como CaCO₃, vitamina D₃ (colecalférol), aspartamo, isomalta, sorbitol sacarosa, almidón de maíz modificado y otros excipientes. La muestra se disolverá de acuerdo a los siguientes procedimientos:

- Procedimiento 1: Se trata con agua y ácido clorhídrico concentrado.
- Procedimiento 2: Se trabaja de igual manera que en el procedimiento 1, pero además se añade ácido nítrico para total mineralización.

El procedimiento en detalle se describe en **Aplicación del método colorimétrico**.

Capítulo III: Resultados y discusión

1.- SISTEMA CROMOGENICO.

1.1.-Características básicas. Estudio cromogénico.

La formación del complejo Ca (II)-GBHA en medio alcalino da lugar a una coloración rojo-anaranjado. Las características cromáticas de este sistema se muestran en la **Figura 7**. En la misma se recoge una experiencia de un amplio rango dinámico de Ca (II), y pone manifiesto un incremento del color rojo conforme aumenta la concentración de Calcio.

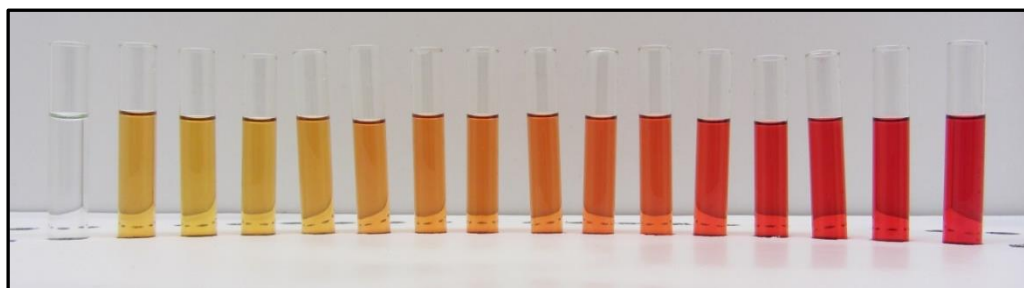


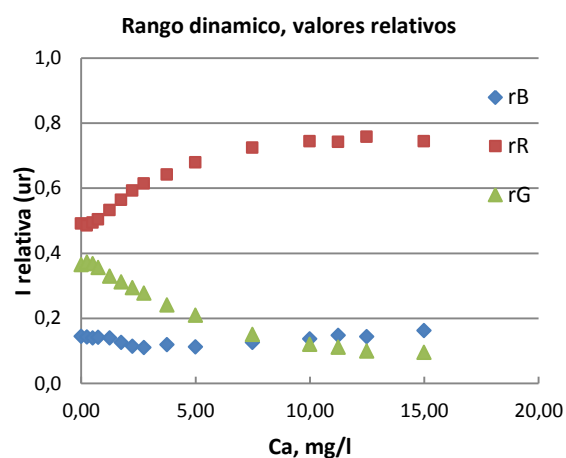
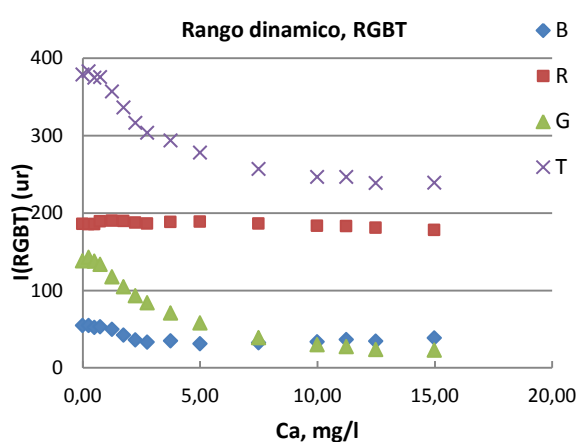
Figura 7: Rango dinámico de Calcio.

Las condiciones del experimento se recogen en la **Tabla 4**. Recogen los datos principales de la **Tabla 2**, anterior, y se han adaptado teniendo en cuenta trabajos anteriores⁶

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ca(II), mg/l	agua	blanco	0,25	0,50	0,75	1,25	1,75	2,75	3,75	5,00	7,49	9,99	11,24	12,49	14,99

Tabla 4: Rango de concentración en el experimento de rango dinámico.

Las tendencias en la intensidad de los colores básicos, medidos sobre la imagen y según el procedimiento de lectura dado en el **Capítulo II: Experimental**, se recogen en las siguientes **Gráficas 1 y 2**. Se ofrecen en valores absolutos de RGB y T, siendo $T = R + G + B$ y en valores relativos: R/T, G/T y B/T.



Gráficas 1 y 2: Condiciones de captura: Cámara Canon, Fondo Blanco, Iluminación blanca, Disposición semicircular a 30cm, Box abierto y con luz parásita

Los perfiles de los colores ponen de manifiesto, en líneas generales, que:

- El color rojo aumenta con la concentración de analito, en el caso de valores relativos.
- El color verde disminuye, y de modo acusado, tanto para valores absolutos como para los relativos.

Se pudo comprobar que a partir de 15 mg/l de Ca(II) el complejo precipita.

1.2.- Interpretación mediante componentes principales, PC's.

La reducción de las variables cromáticas mediante Análisis de Componentes Principales, permite reconocer las tendencias latentes-intrínsecas del sistema cromático, y también la significación de las variables, a través de su representación vectorial. Los resultados se ofrecen en la **Figura 8** y **Tabla 5**.

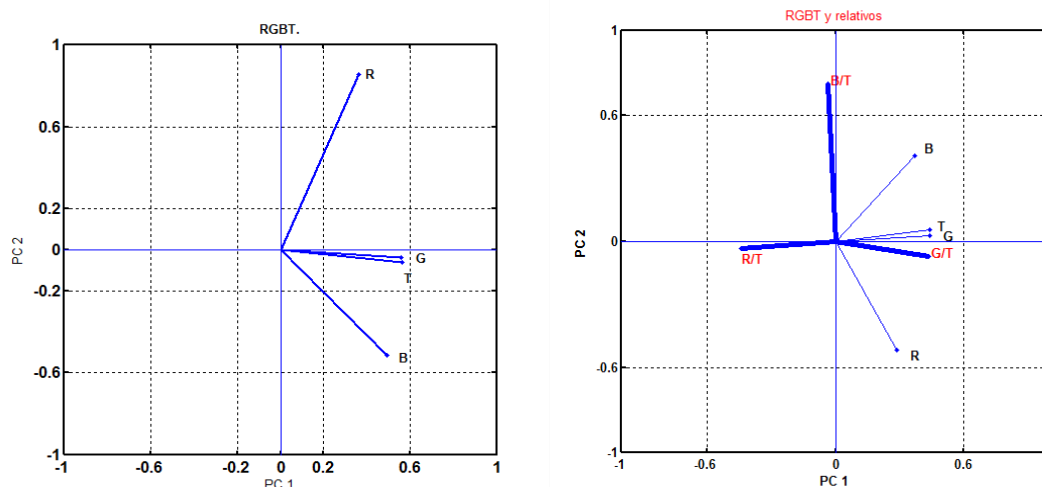


Figura 8: Comparación de las variables absolutas ,RGBT, y las variables relativas ,R/T, G/T, B/T, sobre los componentes PC1 y PC2. Las variables siempre han sido normalizadas.

New Component PC	Eigenvalue	% Explained variance	% Acumulated Variance	Loadings of initial color variables			
				B	R	G	T
1	3,14	78,39	78,39	0,491	0,361	0,559	0,562
2	0,80	20,01	98,39	-0,516	0,854	-0,036	-0,061
3	0,06	1,61	100,00	0,691	0,373	-0,537	-0,309
4	0,00	0,00	100,00	-0,123	-0,046	-0,631	0,765
Matriz covarianza-varianza							
	B	R	G	T			
B	80,96	6,64	353,33	440,93			
R	6,64	11,30	92,17	110,11			
G	353,33	92,17	2123,84	2569,33			
T	440,93	110,11	2569,33	3120,37			

Tabla 5: Características de la reducción de variables cromáticas a PC's. SISTEMA ABIERTO

Los resultados demuestran:

- Colores absolutos, RGB: Las tendencias-informaciones de RGB son distintas. No obstante los colores B y G presentan una clara proximidad y por tanto una mayor similitud en su información. El componente T, se muestra más influido por la información de G.
- Colores relativos, $r_R = R/T$, $r_G = G/T$, $r_B = B/T$: Es significativa la amplia dispersión entre estos vectores. Lo cual se atribuye a que su información cromática está más distribuida entre las tres componentes. A diferencia de lo que ocurre en variables absolutas que son menos diferenciadas.

La **Tabla 5** de reducción a PC's muestra como la varianza del sistema en RGB se justifica hasta el 98,4% en solo dos componentes principales, siendo el más significativo el PC1 con un 78,4%.

El PC1 está correlacionado con B y G mientras que el PC2 está muy correlacionado R.

La matriz de covarianza-varianza, señala al color G como el que mayor varianza cromática del sistema presenta (no se incluye a T que sería una componente dependiente), y por tanto, con una gran potencialidad en su sensibilidad analítica.

1.3.-Estudio del rango dinámico en un sistema cerrado.

Se ha llevado a cabo otra experiencia similar a la previa de rango dinámico pero evitando la radiación parasita. Es decir, se han capturado las imágenes en un modo casi cerrado, trabajando en campana extractora, con fondo negro, y reduciendo la iluminación del exterior.

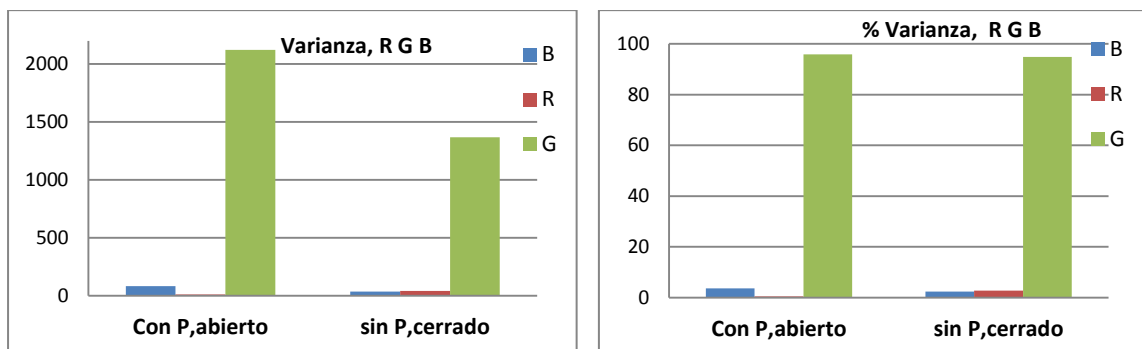
Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que se reduce la varianza cromática del sistema; lo cual es congruente. Se demuestra además que las variables tienden a agruparse-simplificarse. Y así los vectores G y B tienden a igualarse. En la **Tabla 6** y **Figura 9** se recogen los resultados.

Matriz covarianza-varianza				
	B	R	G	T
B	47,350	-24,260	224,080	247,169
R	-24,260	37,751	-127,555	-114,064
G	224,080	-127,555	1384,753	1481,277
T	247,169	-114,064	1481,277	1614,382

Tabla 6: Características de la reducción de variables cromáticas a PC's. SISTEMA CERRADO.

Figura 9: Variables absolutas RGB y T.

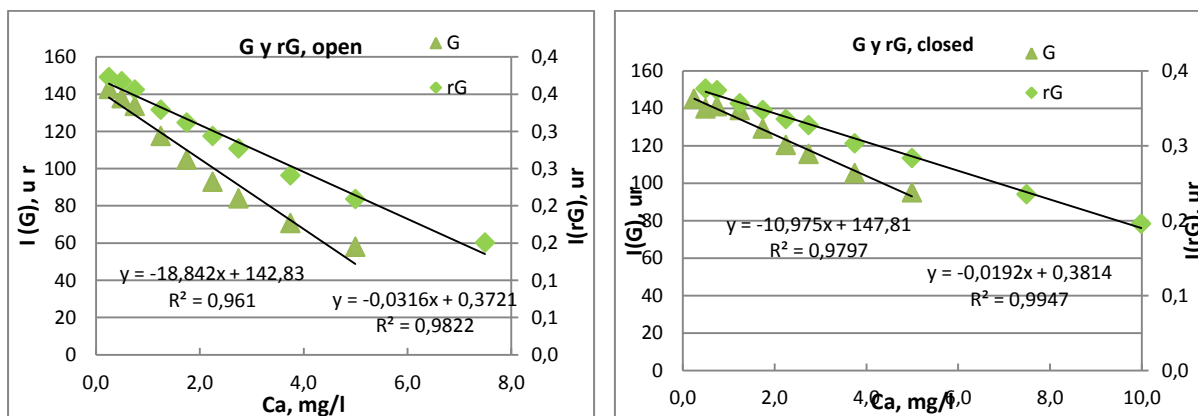
Se ha podido demostrar que la varianza cromática en el sistema cerrado disminuye al 65% de la que hay en el sistema abierto. Es decir, se deja de captar una importante proporción de radiación parásita. Sin embargo, la distribución cromática entre los componentes no se modifica.



Gráficas 3 y 4: Comparación de las prestaciones analíticas entre la captura abierta y la cerrada

Las diferencias entre las dos formas de capturar la imagen se manifiestan directamente sobre las prestaciones analíticas. El estudio de solo el rango lineal del color G, evidencia este efecto.

Los resultados se presentan en las gráficas de regresión lineal (**Gráficas 5 y 6**).



Gráficas 5 y 6: Rango lineal para G y rG. En sistemas abierto y cerrado

Es decir, la regresión lineal (sobre G o G/T) en un sistema abierto, tiene una mayor sensibilidad, con mayores pendientes, pero disminuye los rangos de concentración. Por el contrario, en la captura cerrada, el rango lineal se hace menos sensible (hay menos radiación) pero se alarga el rango.

Es importante destacar que el efecto de radiación parásita afecta a los colores reflejados de una manera similar a como ocurre en las medidas espectrofométricas de absorción molecular cuando hay absorción de radiación parásita. Es sabido que la Ley General de absorción de radiación, ley de Beer, demuestra cómo hay desviaciones en presencia de radiación parásita de modo que tienden a disminuir los rangos lineales.

2.- ESTUDIO DE LAS FUENTES DE VARIANZA CROMÁTICA

2.1.-Varianza cromática

Se ofrecen los resultados totales de la reducción de la información cromática a Componentes Principales, PC's, de la experiencia de rango dinámico en condiciones de sistema cerrado.

New Component PC	Eigenvalue	% Explained variance	% Acumulated Variance	Loadings of initial color variables			
				B	R	G	T
1	3,22	80,53	80,53	0,526	-0,383	0,541	0,533
2	0,63	15,87	96,40	0,107	0,911	0,201	0,344
3	0,14	3,59	100,00	0,834	0,108	-0,467	-0,273
4	0,00	0,00	100,00	-0,124	-0,111	-0,670	0,723
Matriz covarianza-varianza							
	B	R	G	T			
B	47,35	-24,26	224,08	247,17			
R	-24,26	37,75	-127,55	-11,06			
G	224,08	-127,55	1384,75	1481,28			
T	247,17	-114,06	1481,28	1614,38			

Tabla 7: Características de la reducción de variables cromáticas a PC's. SISTEMA CERRADO.

La reducción a PC's muestra como la varianza del sistema en RGB se justifica hasta el 96,4% en solo dos componentes principales, siendo el más significativo el PC1 con un 80,5%.

El PC1 está correlacionado con B y G (también T) mientras que el PC2 está muy correlacionado R.

La matriz de covarianza-varianza, señala al color G como el que mayor varianza cromática del sistema. Y por tanto, con una gran potencialidad en su sensibilidad analítica.

2.2-Fuentes de varianza cromática

La varianza cromática total en este experimento puede ser atribuida a tres fuentes principales:

- El analito que produce la variación de color, Ca (II).
- La cámara o efecto instrumental.
- El método analítico.

Es decir:

$$S_{tot}^2 = S_{cámara}^2 + S_{método}^2 + S_{Ca}^2$$

En la **Figura 10** se ofrece una imagen con los componentes mencionados y los procesos de medida:

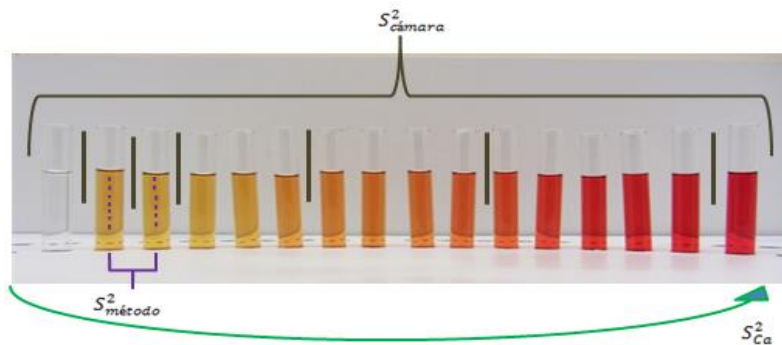


Figura 10: Fuentes de la varianza cromática

La varianza debida al analito, Ca (II), S_{Ca}^2 : Se justifica por el cambio de color producido por el analito. Debe de ser el principal factor desde el punto de vista analítico.

La varianza producida por la cámara, $S_{cámara}^2$: Será debida a la irreproducibilidad instrumental de las medidas de la cámara.

La varianza del método, $S_{método}^2$, puede ser asociada a la variación de color dentro de cada tubo de ensayo y justificada por la preparación de la muestra.

La varianza cromática total y las varianzas de cada factor se obtienen experimentalmente de la imagen del rango dinámico, por ejemplo **Figura 7**.

Los resultados de la aplicación de un análisis ANOVA permiten justificar la influencia de cada uno de los factores y distinguirla según el tipo de color. Los resultados se pueden ver en la **Tabla 8**.

Varianza		u.r	%
Analito + Cámara		1469,82	
Analito		1462,23	95,76
B	42,78		2,80
R	35,80		2,34
G	1383,65		90,61
Cámara		7,58	0,50
B	4,56		0,30
R	1,93		0,13
G	1,10		0,07
Método		57,17	3,74
B	11,84		0,78
R	29,95		1,96
G	15,38		1,01
Total		1526,98	100,00

Tabla 8: Componentes de la varianza. SISTEMA CERRADO.

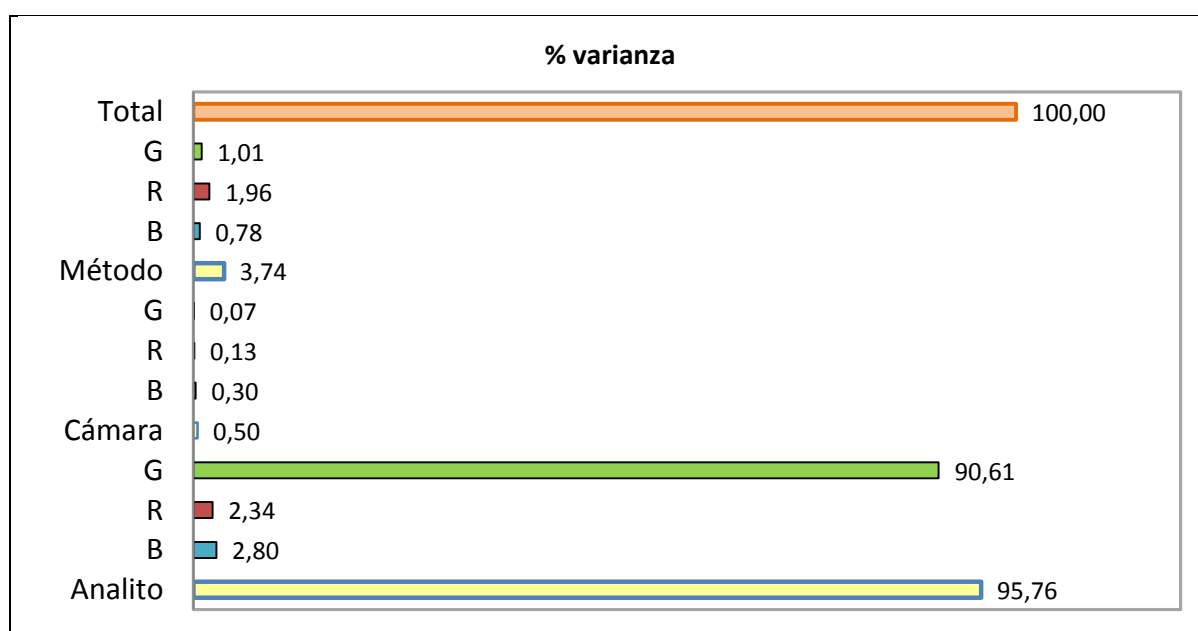


Figura 11: Diagrama de bloques de la participación de los componentes de la varianza cromática.

La descripción general de la varianza de los componentes mostró que el 95,8% de la varianza cromática en la imagen fotográfica, podría justificarse por los cambios del analito. Esto representa un importante apoyo para la aplicación en el análisis cuantitativo. Los resultados también mostraron que el efecto de la cámara, justifica el 0,5%, y el efecto del método, un 3.7%. Es decir, influyen de manera mínima.

Además se demuestra que en la varianza producida por el analito el color que más influye es el color G, con una contribución del 90,6%, siendo la contribución de los colores R y B del 2,3% y 2,8% respectivamente.

Es decir, según cálculos estadísticos se puede demostrar que el método DIC, incluso trabajando en condiciones muy simples en la captura y procesado de la imagen fotográfica, produce una varianza cromática significativa debida al analito. Y que en este sistema cromático es atribuida en su mayoría al color G. El resto de efectos influyen en menor medida.

3.-INFLUENCIA DE FACTORES EXPERIMENTALES

3.1.- Estudio de diferentes factores.

Se ha llevado a cabo un estudio de la influencia de:

- Las características de la **cámara**:
 - Principalmente se estudia el número de píxeles.
 - Se estudian distintos tipos de cámaras.
 - Se ha estudiado el uso de cámara réflex, con formato de lectura: 'raw'. Es decir RGB data sin procesar.
- **Disposición** de los tubos de ensayo:
 - Se han estudiado colocar los tubos de ensayo a la misma distancia focal.
 - O de modo que estén alineados entre si formando una línea recta.
- **Distancia** de enfoque:
 - Se han situado los tubos de ensayo a 30 ó 35cm de la cámara.

Los estudios se han realizado sobre experiencias de rango dinámico y capturando las imágenes en diferentes condiciones, con sistemas abiertos y cerrados.

Los resultados se han caracterizado mediante métodos similares a los expuestos anteriormente:

- Caracterización de valores absolutos y relativos.
- Transformación a Componentes Principales.
- Análisis de la varianza.

Los resultados más significativos de los estudios anteriores se recogen en la **Tabla 9**:

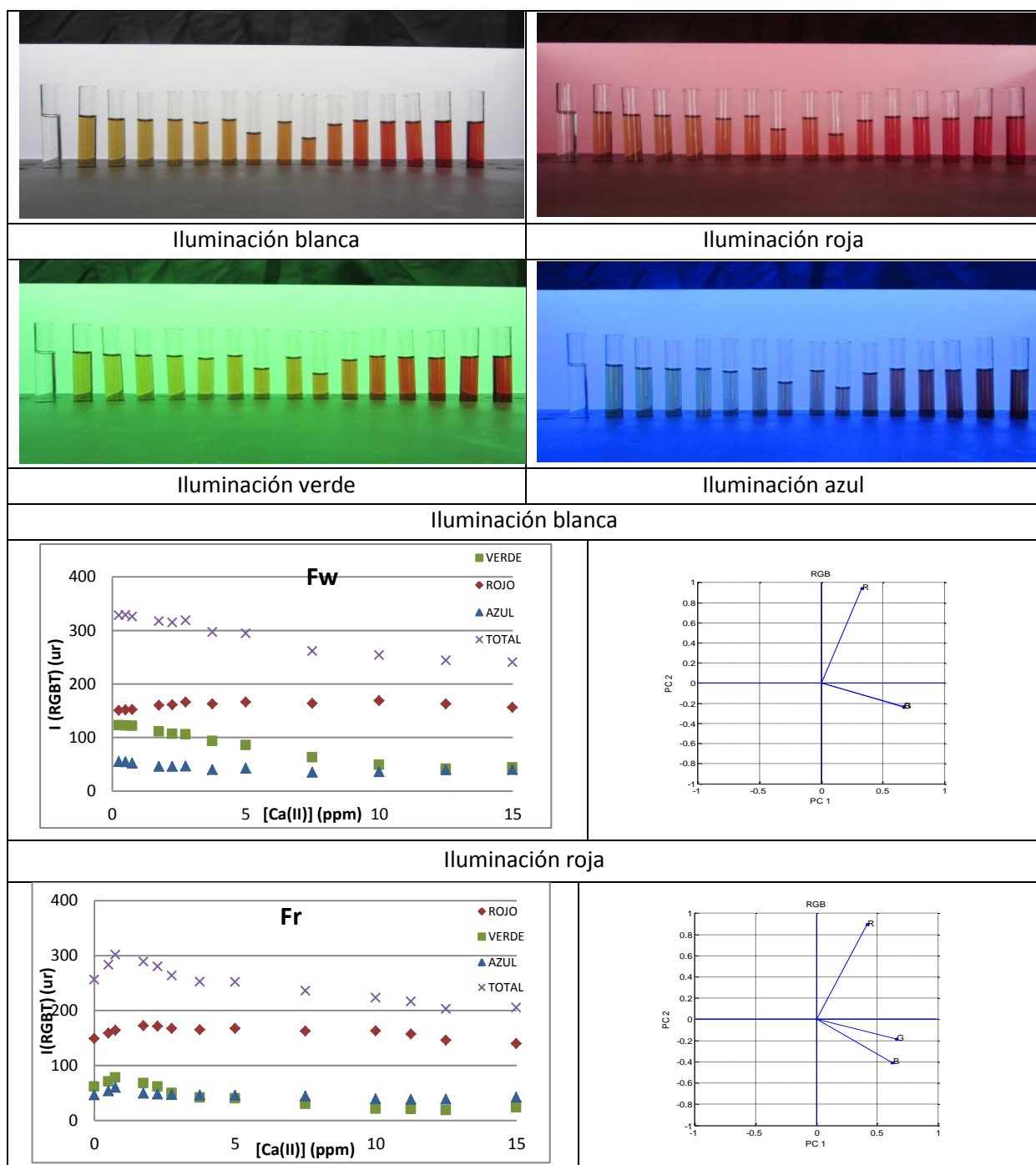
Efecto de la cámara	Cámara Canon (12,1MP)	Favorable
	Cámara Olympus (7,1MP)	
Disposición	Circular	Favorable
	Lineal	
Distancia enfoque	30cm	Favorable
	35cm	
Fondo	Blanco	
	Negro	Favorable
Luz parásita	Sin luz parásita: cerrado	Favorable
	Con luz parásita: abierto	

Tabla 9: Efectos experimentales estudiados y las mejores condiciones

3.2.- Efecto de la fuente de iluminación.

Se ha estudiado la influencia del tipo/color de iluminación en los valores de las intensidades de los colores RGB. Para ello se lleva a cabo una misma experiencia pero iluminando con cuatro lámparas de distintos colores. Sus características aparecen descritas en el **Capítulo II: Experimental, apartado 1.2.**

Se capturan las imágenes de una experiencia de rango dinámico (hasta 15mg/l de Ca (II)), en las condiciones: distancia focal 30cm, disposición semicircular, en sistema cerrado y fondo negro y con cámara Canon. Los resultados se presentan en la siguiente **Tabla 10:**



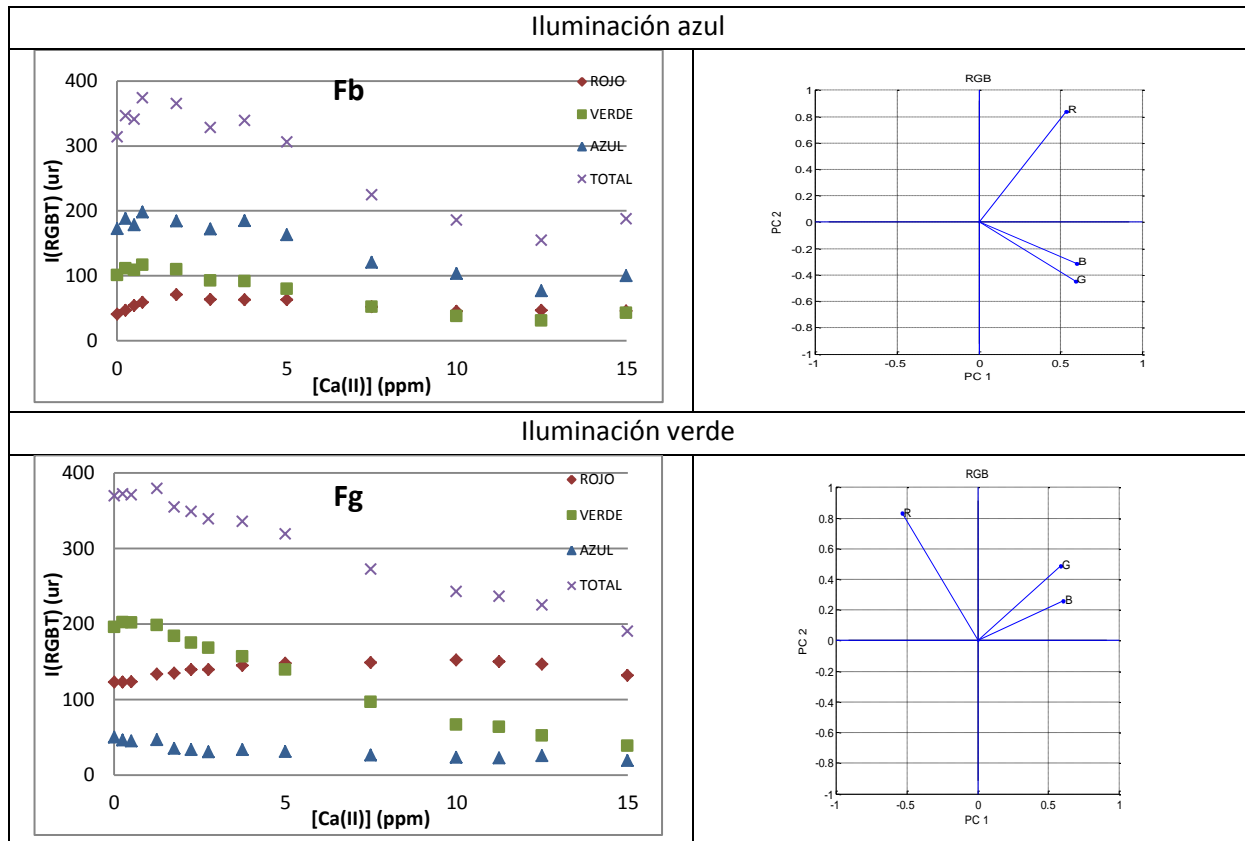


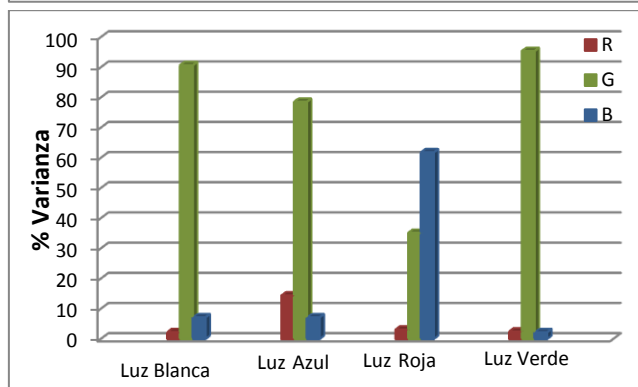
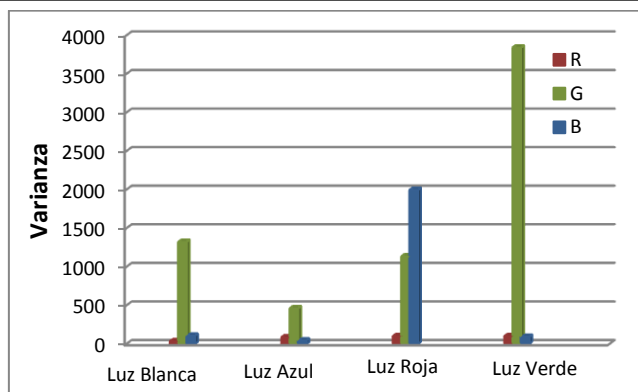
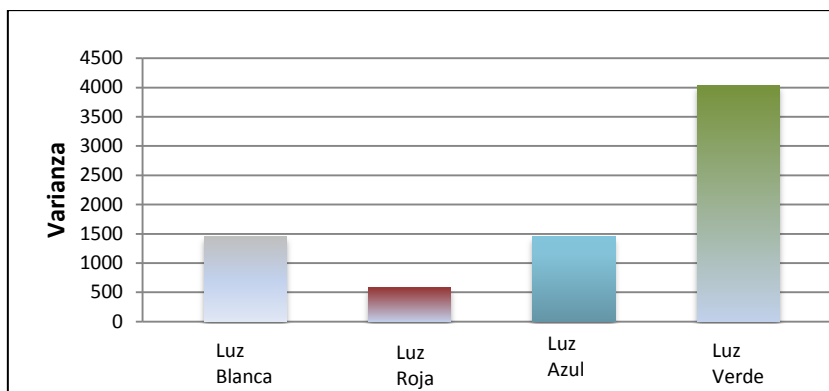
Tabla 10: Imágenes de las experiencias con diferentes iluminaciones. Gráficas intensidad frente [Ca(II)]. Representación PC's

Los resultados mostrados permiten deducir las tendencias de las variables RGB y las influencias de la iluminación. Como idea general el iluminante favorece la reflexión en su color.

- Se pone de manifiesto en las gráficas de PC's que con luz blanca se distinguen dos colores como principales: por una parte el color rojo (R). Y en segundo término, la asociación de verde (G) y azul (B) que se superponen. Se ha podido demostrar que el color verde es el que más contribuye (90,65%)
- Con el resto de iluminaciones, sin embargo, se muestran mayores diferencias entre los tres colores, siendo el color G, el que contribuye.

Según el estudio de componentes principales, las variables RGB, podrían reducirse a solo dos PC's, de modo que con solo dos de ellos se interpreta, prácticamente el 97-99% de la variación inicial de los datos, o cromaticidad del sistema.

- En las siguientes **Gráficas (7,8,9)** se compara la varianza cromática según la iluminación:
 - Expresada en términos absolutos
 - Incluyendo la varianza de los colores básicos
 - Expresando la varianza en % de participación y por colores básicos



Gráficas 7,8,9: Varianza cromática según el tipo de iluminación

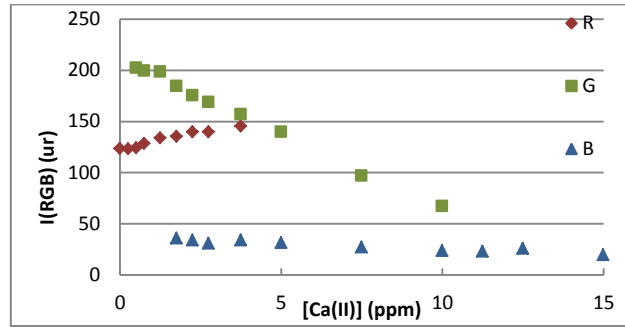
Se demuestra que la iluminación verde desarrolla la mayor varianza en el sistema cromático. Pero además, el color reflejado G recoge la mayor variación de color; excepto para la iluminación roja en la que el color B es el que recoge la mayor variación.

Es por tanto clave el color G, tanto como reflejado como en iluminación.

4.-PRESTACIONES ANALÍTICAS Y CALIBRACION

4.1- Rango lineal y prestaciones analíticas para Iluminación verde y blanca

Trabajando en las condiciones más favorables: Cámara Canon, Iluminación Verde, Captura en sistema cerrado-sin luz parásita y disposición semicircular, se ha caracterizado el rango lineal del sistema cromático. Los resultados se obtienen a partir de las experiencias de rango dinámico en las que se reduce oportunamente el intervalo de ajuste. En la **Gráfica 10** se puede ver la tendencia que se resume en que los perfiles de color R aumentan su luminosidad mientras que para G y B se reduce, haciéndolo B ligeramente.



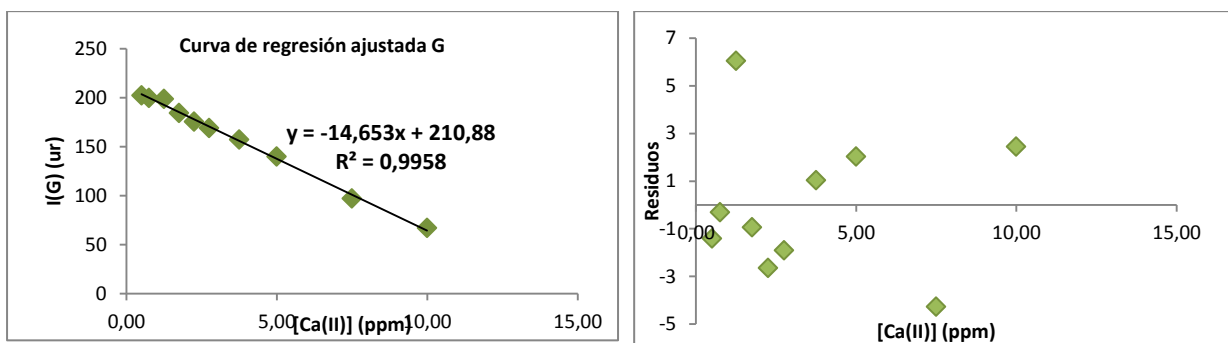
Gráfica 10: Rangos lineales para RGB con iluminación verde (G)

El ajuste detallado y el estudio estadístico de la recta de regresión sobre RGB, por mínimos cuadrados, se ofrece a continuación para los tres colores RGB:

[Ca(II)],mg/)	R, ur.	G, ur.	B, ur.
0,00	123,42		
0,25	123,23		
0,50	123,88	202,14	
0,75	128,35	199,58	
1,25	133,87	198,62	
1,75	135,15	184,31	35,66
2,25	139,75	175,28	33,91
2,75	139,69	168,71	30,81
3,75	145,16	157,00	33,85
5,00		139,70	31,50
7,49		96,80	26,87
9,99		66,92	23,59
11,24			22,97
12,49			25,71
14,99			19,56

Tabla 11: Rango lineal para RGB en unidades relativas,ur

En el caso de G, el detalle del ajuste, realizado en Excel y con análisis de datos, se muestra en la **Tabla 12**.



Gráfica 11: Gráfico de los residuales G

ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN	
Coefficiente de correlación múltiple	0,998
Coefficiente de determinación R ²	0,996
R ² ajustado	0,995
Error típico (DSR)	3,154
Observaciones	10

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de los cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	18721,55	18721,55	1881,61	8,79958·10 ⁻¹¹
Residuos	8	79,60	9,95		
Total	9	18801,14			

	Coefficiente	Error típico	Estadístico t	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada origen	210,88	1,56	135,27	207,28	214,47
pendiente	-14,65	0,34	-43,38	-15,43	-13,87

Tabla 12: Ajuste estadístico para color G.

La calidad de la regresión se verificó mediante el estudio estadístico de los residuos. Este estudio se muestra en la **Gráfica 11** y en **Tabla 13**.

OBSERVACIÓN	PRONOSTICO Y	RESIDUOS	RESIDUOS ESTANDARES
1	203,56	-1,42	-0,48
2	199,90	-0,32	-0,11
3	192,58	6,04	2,03
4	185,26	-0,95	-0,32
5	177,94	-2,66	-0,89
6	170,62	-1,91	-0,64
7	155,98	1,02	0,34
8	137,68	2,03	0,68
9	101,08	-4,28	-1,44
10	64,48	2,44	0,82

Tabla 13: Estudio estadístico de los residuos para G

De los resultados anteriores se deduce que:

- Sensibilidad, como la pendiente de la recta: 14,653 ur· l/mg
- Sensibilidad analítica, definida como ‘sensibilidad/error típico’, es 4,645 l/mg
- Límite Máximo de Linealidad , LML: 9,991 mg/l
- Desviación estándar del método, como error típico: 3,154 ur
- Límite de detección, LD: 0,41 mg/l, calculado como: LD= (3·x 0,01x G_{blanco})/pdte recta.
- Límite de cuantificación ,LQ: 1,38 mg/l, como: LQ=10·LD/3
- Intervalo lineal de la regresión; 1,38-9,99mg/l

En la **Tabla 14**, se ofrecen otros resultados analíticos en condiciones alternativas y sirven de comparación- Siempre realizados de modo sistemático y similar al anterior.

	Iluminación Verde			Iluminación Blanca		
	R	G	B	R	G	B
Sensibilidad (ur·l/mg)	6,328	14,653	1,091	1,349	8,717	1,684
LML (mg/l)	3,747	9,991	14,987	3,747	9,991	9,991
Desviación estándar (ur)	1,945	3,154	1,812	0,360	3,437	2,781
LD (mg/l)	0,585	0,414	0,981	3,540	0,436	0,811
LC (mg/l)	1,950	1,380	3,720	1,799	1,452	2,704
Intervalo lineal (mg/l)	1,950- 3,747	1,380- 9,991	3,720- 14,987	1,799- 3,747	1,452- 9,991	2,704- 9,991

Tabla 14: Prestaciones analíticas para RGB con iluminación verde y blanca

Se comprueba que el color G, en ambas iluminaciones, destaca por su mayor sensibilidad y menor LD. Siendo óptimo para la iluminación verde, g, y la medida de G reflejado: mayor sensibilidad, menor error, menor LD, y mayor rango de linealidad

4.2.-Rango lineal. Con medida de valores relativos R/T, G/T y B/T

De la misma manera que antes se han obtenido las prestaciones del método utilizando las variables R/T, G/T y B/T. Podemos realizar en análisis de la regresión. Los resultados se resumen en la **Tabla 15**.

	R/T	G/T	B/T
Sensibilidad (ur·l/mg)	0,0122	0,0269	0,0024
LML (mg/l)	3,747	9,991	14,987
Desviación estándar (ur)	0,004	0,009	0,002
LD (mg/l)	0,661	0,3758	0,8125
LC (mg/l)	2,204	1,2527	2,708
Intervalo lineal (mg/l)	0,661-2,204	0,3758-9,991	0,8125-14,987

Tabla 15: Prestaciones analíticas con señales relativas

Se observa, al igual que antes, que el color G/T es el que posee mayores prestaciones analíticas. Destaca por un aumento del rango lineal.

5. APLICACIÓN DEL MÉTODO. DETERMINACIÓN DE CALCIO EN MUESTRAS REALES

5.1 Introducción

En este capítulo se presentan los estudios llevados a cabo en la aplicación del método DIC a la determinación de Calcio en muestras reales, así como su evaluación estadística.

5.2 Aplicación del método colorimétrico

La muestra analizada fueron comprimidos farmacéuticos, MASTICAL 500s, para el tratamiento de la Osteoporosis

5.2.1 Preparación de muestra: Experimental

- Procedimiento 1: Se pesa una pastilla, 1,733 g. Se trata con 10 ml de agua y 2 ml de ácido clorhídrico concentrado hasta disolución. Se calienta y evapora para eliminar el exceso de ácido. Y se diluye con agua hasta volumen del matraz de 1,0 l . Muestras denominadas: F1
- Procedimiento 2: Se trabaja de igual manera que en el procedimiento 1, pero además se añaden 3ml de ácido nítrico para mineralización. Se calienta y luego se elimina el exceso de ácido. Muestras denominadas: F2.
- Trazabilidad para la la medida experimental:

	V. Disol. muestra, ml	Número de lecturas	V. Dilución, Volumen cubeta, ml
F1	0,015	1500	4
	0,018		
F2	0,015		
	0,018		

Tabla 16: Trazabilidad

5.3.- Resultados

Las **Figura 12** muestra la imagen digital de la experiencia. Está integrada por:

- La calibración: tubos de ensayo del 1 al 7.
- Las muestras de comprimidos farmacéuticos: F1 tubos 8 y 9, y F2 tubos 10 y 11.

Las imágenes se obtuvieron con las cuatro fuentes de iluminación, midiendo todas las variables, absolutas y relativas, y en las condiciones óptimas: Cámara Canon, sobre un fondo negro, a 30cm de distancia semicircular, sin luz parásita y con las distintas fuentes de iluminación. En la **Tabla 17**, se presentan los mejores resultados aplicando la iluminación verde, G.

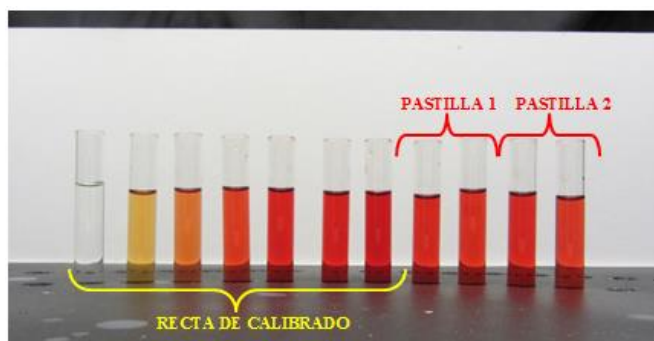


Figura 12: Toma fotográfica de la recta de calibrado y las muestras F1 y F2

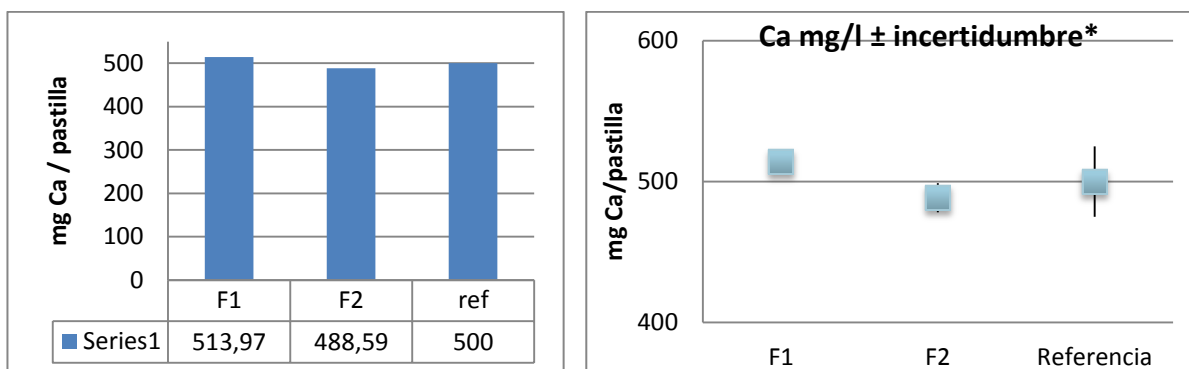
Los mejores resultados se obtienen con el volumen de 0,018 ml. Los resultados en las muestras reales y según la trazabilidad del procedimiento son:

Iluminación: G					
	[Ca(II)] en muestra, mg de Ca/comprimido			Contenido conocido, 500 mg de Ca/comprimido Ca; como CaCO ₃	% Error
	V,ml	Media (n=2)	Desvest		
F1	0,018	513,97	3,96	500,00	+2,97
F2		488,59	10,33		-2,28

Tabla 17: Resultados obtenidos

6.-EVALUACION ESTADISTICA DEL MÉTODO.

Se comparan los resultados obtenidos frente a los declarados, en la **Gráfica 12**.



* incertidumbre: ± s.d., ref =± 5%

Gráfica 12: Evaluación estadística del método

Se aplica el test t para evaluar las diferencias:

Valor declarado, u	500mg/l	
Valor experimental	F1	F2
Valor medio (mg/l), Xm	513,97	488,59
Desviación estándar relativa, s	3,96	10,33
Número de muestras, n	2	
Probabilidad	0,05	
t(tablas)	12,71	
$t_{exp} = (u - X_m) \cdot \sqrt{n} / s$	4,99	1,56
	$t_{exp} < t_{tabla}$	$t_{exp} < t_{tabla}$

Tabla 18: Comparación de resultados frente al valor declarado

Se puede considerar que las diferencias de los métodos frente al valor declarado pueden ser justificadas por una distribución aleatoria. Por tanto, en las condiciones aplicadas, el método no presenta errores sistemáticos.

Capítulo IV:

Conclusiones y bibliografía

Conclusiones

Como principales conclusiones del trabajo se destaca:

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de Ca (II) mediante una cámara digital compacta.
- Se ha caracterizado el comportamiento cromático del sistema GBHA-Ca(II) en condiciones óptimas y mediante colores básicos RGB en un rango dinámico de 0-15 mg/l.
- Se comprueba que con el color reflejado G y la iluminación g se obtienen los resultados con mayor sensibilidad y mayor rango lineal.
- Se ha estudiado la varianza cromática del método demostrando que es justificada en un 96% por el analito. Mientras que el método influye en el 3,5% y la cámara 0,5%
- El método se ha aplicado a la determinación de Calcio en comprimidos farmacéuticos.
- Se ha evaluado frente al valor declarado.
- Con todo ello, se ha puesto a punto un método rápido y eficaz, para la determinación de Calcio que posibilita el control de calidad de manera eficiente a bajo coste.

Bibliografía

¹ A. López Molinero, et al, *Talanta*, (2013, 103, 236–244)

² A. López Molinero, et al, *Microchem J* (2010, 96, 380-385)

³ M. Eriksson, *Sensors and Actuators B* (2013, 185,354-362)

⁴ E. da Nobrega, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006, 570, 283-290)

⁵ M. Kompany-Zareh, *Anal. Chim. Acta* (2004, 521, 231-236)

⁶ Métodos rápidos Macherey- Nagel, Disponible en: <http://www.mn-net.com>

⁷ Kit de ensayo y métodos fotométricos, Merck-Millipore, Disponible en:

<https://www.merckmillipore.com>

⁸ Y. Suzuki, *Anal. Sci*, (2006, 22, 411)

⁹ W. S. Lyra, et al, *Anal. Methods*,(2011,3,1975-1979).

¹⁰ D. Liñán, *Postgrado de Iniciación a la Investigación*, Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias (2006)

¹¹ J. Jiménez, *Postgrado de Iniciación a la Investigación*, Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias (2009)

¹² AENOR, Madrid, UNE-ISO 6059:2014; Calidad del agua. Determinación de la suma de Calcio y Magnesio. Método volumétrico con AEDT

¹³ AENOR, Madrid, UNE-EN-ISO 7980:200; Calidad del agua. Determinación de Calcio y Magnesio. Método por espectrometría de absorción atómica (ISO 7980: 1986)

¹⁴ Z. Marczenko; *Separation and Spectrophotometric Determination of elements*, Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, Chichester, 1986

