

Trabajo de Fin de
Grado.

Determinación de compuestos activos para la reducción de riesgos toxicológicos por consumo de drogas

Universidad de Zaragoza y Consumo
ConCiencia



CONSUMOCONCIENCIA



TÍTULO: Determinación de compuestos activos para la reducción de riesgos toxicológicos por consumo de drogas

Autor: Óscar Castejón Musulén

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Química

Departamento de Química Analítica (Facultad de Ciencias) /
ConsumoConCiencia

Curso Académico 2017-18

Dirección del trabajo:

Josefina Pérez Arantegui

Javier Sánchez Arroyo

Lugar de realización:

Departamento de Química Analítica y ConsumoConCiencia

*Entre las muchas personas a las que debo más que un “gracias”,
por casualidades de la vida, este trabajo se lo debo a dos
“Javieres” y dos “Josefinas”, por las oportunidades, el
apoyo y la ayuda brindada.*

En muchas ocasiones el cine es una ventana a otras realidades y percepciones. En los 90 el cine europeo comenzó a reflejar el cambio de percepción respecto al consumo de sustancias, como muestran los dos ejemplos.

“La gente se cree que esto no es más que miseria y desesperación y muerte y toda esa mierda que no hay que olvidar, pero lo que olvidan es el placer que supone. De lo contrario no lo haríamos. Después de todo no somos gilipollas, joder. Bueno, al menos no tan gilipollas. Coge el mejor orgasmo que hayas tenido, multiplícalo por mil y ni siquiera andarás cerca.”

Renton (Ewan McGregor)-Trainspotting (1996)

“Me apasionan las drogas. He probado todas las que he podido conseguir. Pero nunca lo he hecho para buscar el placer, o para ser feliz, o para afrontar la vida. Las drogas son maravillosas porque te abren la mente. Te hacen comprobar que la verdad no existe, que todo es relativo. La droga te da otra visión, otra dimensión, te hace ver que nada es lo que parece, que nada es, la única realidad es tu realidad y será lo que tú seas capaz de ver.”

Dante W. (Eusebio Poncela)- Martin (Hache) (1997)

“Nada es veneno, todo es veneno. La diferencia está en la dosis.”

Paracelso

Abreviaturas

CCD: Charge-Coupled Device

CMOS: Complementary Metal-Oxide Semiconductor

TEDI: Trans European Drug Information Project

PMA: para-Metoxianfetamina

PMMA: para-Metoximetanfetamina

4-MA: 4-Metilanfetamina

MDMA (extasis): 3,4-Metilendioximetanfetamina

mCPP: meta-Clorfenilpiperazina

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletamina

4-MEC: 4-Metil-N-etilcatinona

DXM: Dextrometorfano

UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime

RGB: Red Green Blue

CMYK: Cyan Magenta Yellow Key

CIE: Comission Internationale de l'Éclairage

ATS: Amphetamine-Type Stimulants

Resumen

En este trabajo se aborda la utilización de cámaras DSLR y su utilización en medidas colorimétricas. Se estudia la calidad de los resultados obtenidos al realizar diferentes tratamientos matemáticos a los datos brutos de color obtenidos por la cámara réflex y se comparan respecto de los obtenidos con un espectrofotómetro midiendo reflectancia.

Las cámaras réflex utilizan detectores CCD o CMOS para la impresión digital de una fotografía. Se pretende utilizar dicho archivo digital generalmente de formato .Raw o .NEF, para obtener una forma rápida y programable de tomar datos a la hora de medir concentraciones en función del color y su intensidad cuando se hace reaccionar el analito con un cierto test.

Con este trabajo se pretende dar los primeros pasos hacia una técnica de análisis colorimétrico rápida y automatizable, además de instrumentalmente barata y sencilla de utilizar. Potencialmente esta metodología de trabajo podría ser una forma interesante de realizar análisis multicomponente de forma simultánea para aquellos casos en los que la sensibilidad, especificidad y gama cromática así lo permitan, como lo son las muestras de drogas, donde ya se conoce el color de diferentes compuestos activos o adulterantes al reaccionar con diferentes ensayos colorimétricos.

Abstract

This paper deals with the use of DSLR cameras and how to use it in colorimetric measurements. It will be studied the quality of the results obtained by performing different mathematical treatments to color data got it with a DSLR camera, and compared those results with the data obtained with a spectrophotometer measuring reflectance.

DSLR cameras use CCD o CMOS detectors to digital impression of a photograph. The aim is to use that digital file, generally in .Raw or .NEF format, to obtain a fast and programmable way to take data when concentrations are measured according to color and intensity when the analyte reacts in a certain test.

The aim of this work is to take the first steps towards a quick and automated colorimetric analytical technique, besides being instrumentally cheap and simple to use. Potentially this methodology could be an interesting way to perform multicomponent analysis, simultaneously for those cases in which the sensitivity, specificity and chromatic range allow it, as drug samples, where the different colors are already known for different active or adulterating compounds.

Índice

	Página
Abreviaturas	iv
Resumen	vi
Abstract	vi
1. Introducción	1
1.1. Los ensayos	2
1.2. El color y su medida	4
2. Objetivos	6
3. Materiales y métodos	7
3.1. Preparación de los reactivos	7
3.2. Reconstrucción de espectros	8
3.3. Medidas de color	8
3.4. La caja de iluminación (<i>The LightBox</i>)	9
4. Resultados y discusión	10
4.1. Calibración de progresiones de color de los ensayos	10
4.1.1. Ibuprofeno (Marquis y Mandelin)	10
4.1.2. Prolina (Simon)	15
4.2. Muestras	19
5. Conclusiones	22
6. Bibliografía	24
7. Anexos	26
7.1. Estimación de espectros con Excel	26
7.2. Tratamiento digital de las fotografías	29
7.3. Tablas y Resultados (Ampliación) para un ensayo	32

1. Introducción

En el siglo XIX el término “adicción” comienza a tener un significado unido al consumo de sustancias que producen síndrome de abstinencia y tolerancia, con efectos dañinos. Hasta entonces prevalecía el significado proveniente del Latín “addico”, que significa “entregado” tanto en sentido positivo como negativo.¹ Ahora en el siglo XXI estudiamos el mismo comportamiento compulsivo en casos desligados completamente del uso o consumo de sustancias tradicionalmente categorizadas como drogas, presentándose también síndromes de abstinencia.

El psicólogo Bruce K. Alexander, profesor emérito de psicología de la universidad canadiense Simon Fraser, realizó durante su carrera un profundo estudio de la adicción y sus precursores. Entre ellos, modificó el ensayo de drogas tradicional en ratas, la caja de Skinner, el cual consistía en poner dos bebederos de agua, uno adulterado con alguna sustancia y otro sin adulterar. Las ratas enjauladas bebían agua adulterada hasta la sobredosis y por consiguiente la muerte. El profesor Alexander modificó la jaula por “el parque de ratas”, que seguía siendo una jaula, pero mucho más grande, lleno de objetos para que jugasen y otras ratas para que pudiesen copular, manteniendo los dos bebederos. En el parque de ratas alguna de las ratas consumían agua adulterada de forma esporádica, pero no de forma compulsiva como sí ocurría en el ensayo tradicional. Estos resultados no encajan en la visión tradicional de la adicción, ya que tradicionalmente son las sustancias químicas las que modifican la química cerebral produciéndose la adicción. Si bien el consumo de sustancias farmacológicamente activas puede producir, y produce, cambios en la química cerebral, parece que los precursores de la adicción tienen una base psicosocial.²

Actualmente, las políticas de reducción de riesgos y daños por el consumo de sustancias son una práctica bastante extendida en toda Europa. Es en este ámbito donde actualmente las herramientas de análisis son indispensables, tanto para la detección de sustancias peligrosas en una muestra o conjunto de ellas, como para determinar la concentración de compuesto farmacológicamente activo. Este tipo de actividad está recogida en el Plan de Acción sobre drogas, enmarcado en la Estrategia Nacional sobre Drogas 2017-2024, donde en su punto 10.3 Reducción de daños aparece “*todas aquellas políticas, estrategias y programas que tienen como finalidad disminuir los efectos negativos del consumo de sustancias (sin que reducir su consumo sea necesariamente un objetivo) [...] Las estrategias de reducción de daños fomentan conductas más seguras, reducen los factores de riesgo*

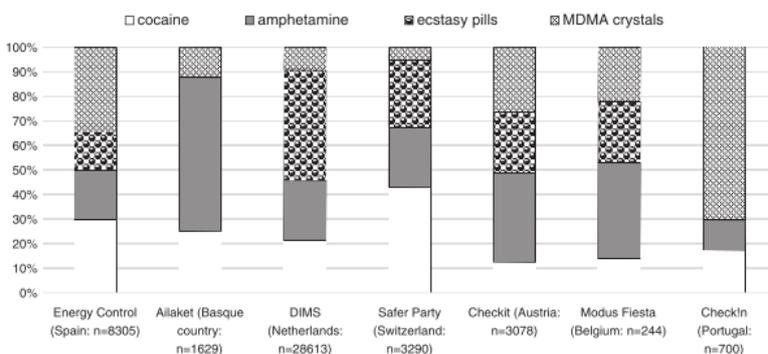


Figura 1. Porcentaje de análisis realizados de cada sustancia en los distintos países en el proyecto TEDI.³

prevenibles...”. Es decir, se busca minimizar los perjuicios para la salud que pueden evitarse en el consumo de sustancias ilegales. Al igual que el control de metanol en la producción de bebidas alcohólicas no ha solucionado el problema del alcoholismo, sí que

evita muertes e intoxicaciones graves. Algunas organizaciones pretenden abordar un enfoque similar adaptado a la actualidad. Es interesante ver los resultados publicados por el proyecto TEDI (Trans European Drug Information Project) (<http://www.safernightlife.org/tedi>), donde distintos servicios de análisis de drogas comparten sus datos y monitorean la situación de la composición en el mercado de las distintas sustancias en los distintos países (Fig. 1), por la demanda de un usuario de un análisis de composición de cierta muestra, lo que permite generar sistemas de alerta temprana de adulterantes de riesgo como el PMA. Por ejemplo, al estudiar el contenido de algunos adulterantes en muestras de cocaína, se encuentra que casi un tercio de las muestras contienen levamisol y se encuentra cafeína (20% de las muestras), fenacetina, lidocaína o procaína. En muestras de anfetamina analizadas en España, más del 80% de ellas contienen cafeína y algunas 4-MA. En cuanto al éxtasis (tanto en polvo como en pastilla) se encuentra con cierta regularidad mefredrona, metilona, mCPP, 2C-B, 4-MEC, DXM.³

Dentro del campo del análisis de sustancias encontramos métodos que buscan determinar la cantidad de cierta sustancia o sustancias dentro del organismo, determinando uno o varios de los metabolitos de la sustancia, ya sea en sangre, orina, saliva o pelo. En estos análisis destacan las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y los inmunoensayos. Para el análisis de la muestra original sólida, las técnicas cromatográficas son la base de los procedimientos analíticos forenses, siendo procedimientos normalizados y estandarizados, los cuales están recopilados en manuales temáticos publicados por la oficina de Naciones Unidas contra las Drogas y el Crimen.⁴

1.1. Los ensayos

En los manuales proporcionados por la UNODC, también está recogido el análisis cualitativo mediante ensayos colorimétricos (Tabla 1).⁵ Estos están basados en reacciones químicas que dan lugar a un producto coloreado, o a un cambio de color, bien sea por la síntesis de algún cromóforo de carácter orgánico o por la formación de un complejo metálico.⁶⁻

10

	Medio Ácido	Medio Básico
Especies Orgánicas	Marquis, Ehrlich, Mecke, Liebermann, Duquenois-Levine	Zimmerman, Fast blue BB
Complejos Iónicos y Especies Orgánicas	Froehde, Mandelin	Simon
Complejos Metálicos	Dille-Koppanyi, Cloruro férrico	Zwicker, Chen-Kao

Tabla 1. Ensayos colorimétricos en función del medio y el tipo de cromóforo generado.

Por ejemplo, en el caso del test Marquis, basado en una disolución de formaldehído en ácido sulfúrico concentrado, el mecanismo transcurre por una sustitución electrófila en posición orto, meta o para en función de los sustituyentes del anillo, de forma que se concatenan los anillos aromáticos (Fig. 2) y se produce un cromóforo donde la longitud de onda de absorción máxima será función de los sustituyentes del anillo (desplazamiento batocrómico).⁶⁻¹⁰

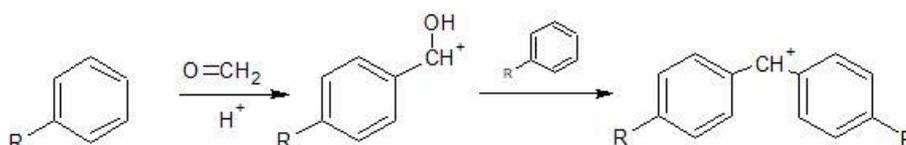


Figura 2. Mecanismo de reacción del reactivo Marquis.

Se producirán por tanto transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ con un máximo en torno a los 300 nm, por lo que se espera que, de forma general, la absorción se producirá en la zona del azul. El test Marquis es un ensayo con un amplio rango de compuestos con los que la reacción produce color.

Por otro lado, el test Mandelin se basa en una disolución de vanadato de amonio en ácido sulfúrico concentrado. Es un test fundado en las características redox del vanadio (V).

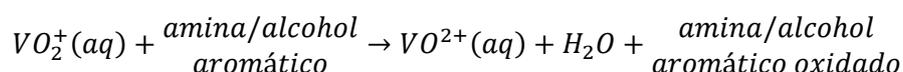


Figura 3. Mecanismo de reacción del reactivo Mandelin.

De forma general, Mandelin se utiliza para detectar aminas o alcoholes aromáticos (Fig. 3), aunque otros compuestos oxidables pueden producir reacción. El VO_2^+ es de un color amarillo claro, estable solo en medio ácido. Al reducirse se forma VO^{2+} de color azul, que a pH muy ácido (en torno a 1) se forma $(VO)_2(OH)_2^{2+}$, que precipita en forma de $VO(OH)_2$ de color pardo cuando el pH se aproxima a 6-7. El V^{3+} es de color verde, al igual que sus hidroxidos, mientras que el V_2O_3 es negro. Por tanto, a menudo el color resultante de la reacción será una combinación de los colores de los distintos estados de oxidación del vanadio, como marrón, púrpura, anaranjado, amarillo o verde.¹¹

El test de Simon es una reacción específica para aminas secundarias (Fig. 4), formado por dos reactivos. El primero es una disolución de nitroprusiato de sodio en una disolución acuosa de acetaldehído, y el segundo, una disolución básica de carbonato de sodio. El color vendrá dado por el complejo de hierro final. Para el caso de aminas primarias, se puede sustituir el acetaldehído por acetona.⁶⁻¹⁰

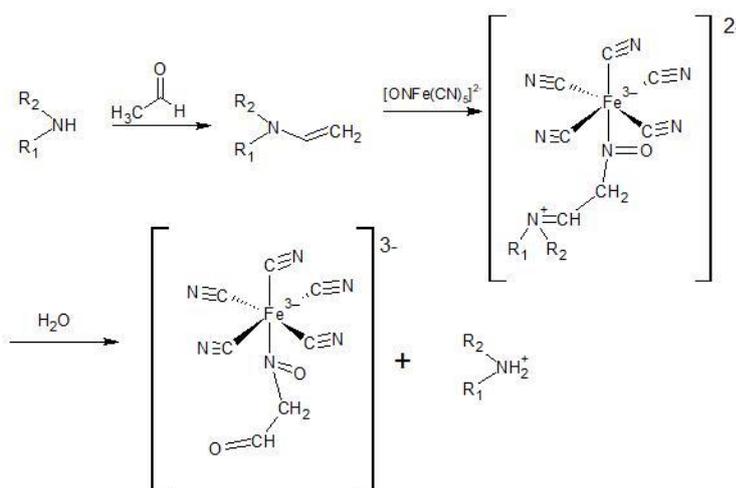


Figura 4. Mecanismo de reacción del test Simon.

Las bases de Schiff son el producto de la condensación de una amina y una cetona o aldehído, dando lugar a un grupo

azometino. Esta clase de compuestos son de fácil preparación y posibilitan modificaciones en su estructura, por lo que son moléculas muy versátiles en distintas síntesis, entre ellas la preparación de algunos precursores de drogas.¹²

1.2. El color y su medida

El color es una percepción subjetiva, por lo que desarrollar estrategias que permitan estandarizar los resultados colorimétricos obtenidos por estos ensayos es una vía interesante de investigación. La problemática reside en la especificidad de los diferentes ensayos, ya que distintos compuestos utilizados como agentes de corte o adulterantes son capaces de dar reacción con alguno o varios de estos reactivos, como: cafeína, benzocaína, ibuprofeno, lidocaína,... Una opción es utilizar la escala Munsell para la caracterización de un color dado, de forma que no quede sujeto a la subjetividad del analista e independiente de su formación.⁷

Actualmente, el análisis de imágenes digitales aporta una nueva técnica de detección y cuantificación del color. Basados en la premisa de que existe una proporción entre los datos RGB recogidos por una cámara digital y la concentración de cierto cromóforo, al menos para un intervalo de bajas concentraciones, podemos entonces realizar ciertos tratamientos matemáticos que nos permitan determinar dichas relaciones. Por ejemplo, utilizando el test de Simon para cuantificar anfetamina y metanfetamina en diferentes muestras se obtienen rangos lineales de 0,25 (mg/mL) hasta 2,50 (mg/mL).¹³⁻¹⁴

Teniendo en cuenta que los valores triestímulo de color, bien sean en formato RGB (Red, Green, Blue) o en CIE XYZ (CIE, Commission Internationale de l'Éclairage), definen el espacio de color tridimensional en función del espectro de reflectancia y del poder del iluminante para cada longitud de onda, para un vector triestímulo dado se podrá aproximar el espectro de reflectancia de dicho color si la función del iluminante es conocida.¹⁵

Donde $R(\lambda)$ es el espectro de reflectancia, $I(\lambda)$ es el espectro del iluminante y las funciones $\bar{x}, \bar{y}, \bar{z}$ son las proporcionadas por CIELAB. Existen diferentes alternativas desde un punto de vista matemático y computacional para abordar este problema, como métodos

$$X = k \cdot \int_{360 \text{ nm}}^{720 \text{ nm}} R(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \bar{x}(\lambda) \cdot d\lambda \quad (\text{Ec. 1})$$

$$Y = k \cdot \int_{360 \text{ nm}}^{720 \text{ nm}} R(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \cdot d\lambda \quad (\text{Ec. 2})$$

$$Z = k \cdot \int_{360 \text{ nm}}^{720 \text{ nm}} R(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \bar{z}(\lambda) \cdot d\lambda \quad (\text{Ec. 3})$$

$$k = \frac{100}{\int_{360 \text{ nm}}^{720 \text{ nm}} I(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \cdot d\lambda} \quad (\text{Ec. 4})$$

iterativos o utilizar pseudo-inversión de matrices (ampliación Anexo 7.1).¹⁶⁻²⁰

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = (M)^T \cdot R(\lambda) \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde M es una matriz de 3 columnas, cada una es el producto de la función de iluminación ($I(\lambda)$) y la función $\bar{x}(\lambda), \bar{y}(\lambda)$ o $\bar{z}(\lambda)$. Debido a que

la matriz M no es cuadrada, no se puede despejar la función (que se trata como un vector) de reflectancia, y no es posible encontrar la solución exacta de forma analítica. Sin embargo, actualmente existen métodos como los iterativos o de pseudo-inversión de matrices, que permiten aproximar este vector, o al menos uno que cumpla con los valores XYZ.

El espectro de reflectancia recoge la intensidad de la luz recibida a cada longitud de onda respecto de la intensidad emitida, por lo que se obtiene un registro del porcentaje de luz reflejada (Fig. 5). Dentro de la luz reflejada hay dos componentes, la reflectancia difusa y la especular. La especular es la fracción de luz que incide con un ángulo superior al ángulo crítico, por lo que se produce la reflexión total de la luz, ésta no es absorbida por la muestra, y es reflejada íntegramente. Por otro lado, la reflectancia difusa es la luz que, tras múltiples reflexiones dentro del medio, sufre la absorción de parte de la radiación a ciertas longitudes de onda, generando la percepción de color.

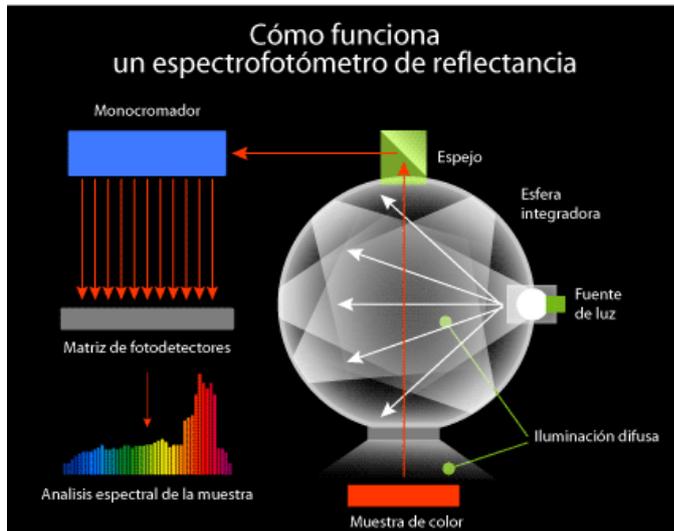


Figura 5: Esquema de funcionamiento de un Reflectómetro.
Fuente_ http://www.gusgsm.com/funciona_espectrofotometro_reflectancia (Julio 2018)

El color percibido puede ser producido de dos maneras: que únicamente sea reflejada una pequeña parte del espectro en torno a una cierta longitud de onda, dando lugar al color correspondiente a dicho intervalo de longitudes de onda, o que se absorba una pequeña parte del espectro a cierta longitud de onda, produciendo el color complementario a la longitud de onda absorbida. En base a estos dos comportamientos se establecen los modelos RGB y CMYK (Cian, Magenta, Amarillo y Negro). El modelo RGB está basado en síntesis aditiva (Fig. 6) de color, es decir, por medio de la suma de los tres colores primarios rojo, azul y verde se puede obtener cualquier otro color, siendo la suma de todos el color blanco. CMYK es un modelo sustractivo, opuesto a RGB, que trabaja con los colores primarios cian, magenta, amarillo y negro. Los colores primarios de un modelo son los colores secundarios del otro modelo, y viceversa.



Figura 6: Sistema de color aditivo RGB

Para tratar de una forma cuantitativa los espectros de reflectancia difusa, el modelo propuesto por Kubelka-Munk es la aproximación más utilizada para interpretar dicho espectro. Este modelo contempla dos flujos de luz, uno hacia el seno del medio y uno de retorno en sentido opuesto. En ambos componentes se produce tanto difusión como absorción de luz, modificando la intensidad de la luz saliente.²¹⁻²²

$$K - M = \frac{K}{S} = \left(\frac{(1-R_\infty)^2}{2 \cdot R_\infty} \right) \quad (Ec. 6)$$

2. Objetivos.

El presente trabajo pretende realizar una primera aproximación a la cuantificación y caracterización de muestras de drogas, mediante el estudio del color producido por los reactivos utilizados en los ensayos cualitativos, desarrollando las herramientas químicas y matemáticas necesarias para ello, así como implementarlas de forma sencilla en un programa en Visual Basic para Excel, de forma que pueda ser usado por personas sin formación técnico-científica específica, manteniendo conclusiones válidas.

Se quiere hacer uso del detector CCD (charge-coupled device), o CMOS (complementary metal oxide semiconductor), presente en las actuales cámaras DSLR, popularmente conocidas como cámaras reflex, como instrumento para medir y cuantificar mediante el color.

Si bien el problema que se quiere abordar es la casuística concreta de las muestras que contienen estimulantes de tipo anfetamínico (ATS), para lo cual se van a escoger tres ensayos (Marquis, Mandelin y Simon), el estudio y tratamiento del color no queda limitado a este campo, pudiéndose realizar metodologías similares convenientemente adaptadas al problema concreto que se pretenda abordar.

No se pretende con este trabajo vanalizar o reducir la percepción de riesgo en el consumo de sustancias. Se pretende ofrecer acceso a información que está íntimamente ligada con problemas de salud asociados a dichos consumos. No abordamos el problema de la adicción, mucho más amplio y multidisciplinar, tan solo queremos ofrecer una herramienta químico-técnica, económicamente barata y accesible, para que aquellas personas consumidoras que lo deseen tengan acceso a una herramienta de autocuidados.

Por último, este trabajo se ha realizado con la asociación Consumo ConCiencia, organización aragonesa homologada a organizaciones como Ai Laket (Euskadi) o Energy Control (Cataluña), ambas colaboradoras del proyecto TEDI, que pretenden abordar la reducción de riesgos ofreciendo talleres, formación, información y análisis de sustancias.

3. Materiales y métodos.

En este trabajo se han utilizado tubos de ensayo, micropipetas de 200-1000 μL y de 20-200 μL , placa de toques, balanza analítica y los siguientes reactivos químicos (todos ellos de calidad analítica): formaldehído 35-40% m/v estabilizado en metanol (Panreac), carbonato de sodio anhidro (Scharlau), meta-vanadato de amonio (Panreac), nitroprusiato de sodio cristalino (Probus), acetaldehído $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico 95-97% (Merck).

Para la toma de fotografías se usó una cámara reflex digital DSLR Nikon D3000 (10 MP CCD Sony), con objetivo óptico 15-55 mm y una caja de iluminación (LightBox). Las medidas espectrométricas se realizaron con un espectrofotómetro de reflectancia Konika Minolta CM-2600d y el programa Spectra Magic NX CM-S100d. La placa de toques se cubrió con una lámina de Mylar para proteger el instrumento al hacer las medidas. Otros programas informáticos usados fueron: RawTherapee 5.0-r1-gtk2, digiCam Control y Microsoft Excel 2016 (extensiones: solver y modo desarrollador).

3.1. Preparación de los reactivos.

Test Marquis. El reactivo consiste en una disolución de 5 mL de formaldehído al 40%(v/v) en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para este estudio se preparó una disolución de 50 mL de ácido sulfúrico al 98% (v/v) y 2,5 mL de formaldehído al 40% (v/v).

Test Mandelin. La preparación de este test se basa en la disolución de 1,0 g de vanadato de amonio en 100 mL de ácido sulfúrico. Se pesaron 0,499 g de vanadato de amonio y se disolvieron en 50 mL de ácido sulfúrico al 98% (v/v).

Test Simon. Basado en dos reactivos, el primero es una disolución de 0,9 g de nitroprusiato de sodio en una disolución acuosa al 10% (v/v) de acetaldehído y el segundo, una disolución básica al 2% carbonato de sodio. La proporción propuesta por la UNODC es una disolución acuosa al 2% de nitroprusiato de sodio y 4% de acetaldehído. En este caso se realizó una modificación para poder guardar a menor temperatura el reactivo A, sustituyendo el agua por metanol. Se pesaron 0,495 g de nitroprusiato de sodio, se le añadieron 4 mL de disolución de acetaldehído al 6,5% en etanol y se diluyó con metanol. Para el reactivo B se prepararon 50 mL de agua donde se disolvió 1,008 g de carbonato sódico.

3.2. Reconstrucción de espectros.

Se han utilizado distintos métodos de aproximación al espectro de reflectancia para poder resolver la Ec. 5 a partir de las Ec. 1-4 (ver "Introducción"). Entre estos métodos está la pseudo-inversión de matrices (PINV) o el método iterativo Hawkyard. Este punto está más ampliamente explicado en el anexo 7.1 y se muestran más ajustes de colores. De forma general parece que la aproximación conseguida es bastante buena como en las gráficas 1 y 2 (Fig. 7), sin embargo, en algunos casos (gráficas 3 y 4 en Fig. 7), este ajuste es menos fiel.

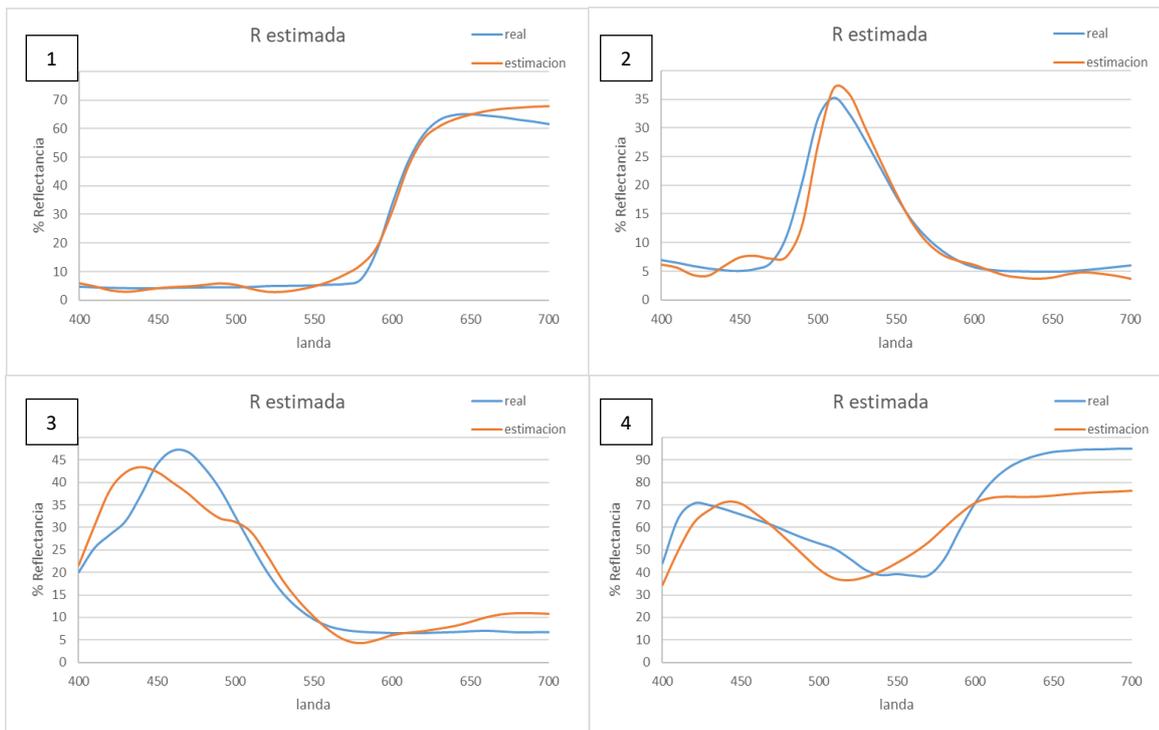


Figura 7. Gráfica 1: Lego Rojo; Gráfica 2: Lego Verde; Gráfica 3: Lego Azul Marino; Gráfica 4: Lego Rosa

3.3. Medidas de color.

Las disoluciones coloreadas se preparan por pesada en un tubo de ensayo y dilución para cada uno de los ensayos correspondientes. Las medidas de color y el espectro se realizan trasvasando 50 μL de disolución a una placa de toques, sobre la cual se realiza tanto la fotografía en la caja de luz como la medida mediante el espectrofotómetro.

Utilizando digiCamControl conseguimos controlar la cámara con un PC. La foto realizada es tratada con RawTherapee (ampliación en el anexo 7.2). Una vez tenemos el tratamiento digital realizado (Fig. 8. A y B), se toman los valores RGB de varios puntos dentro de un mismo color. A partir de los valores RGB de los colores de referencia obtenidos en la fotografía podemos calcular la matriz de conversión RGB a XYZ D65 con Excel (Ec. 7).

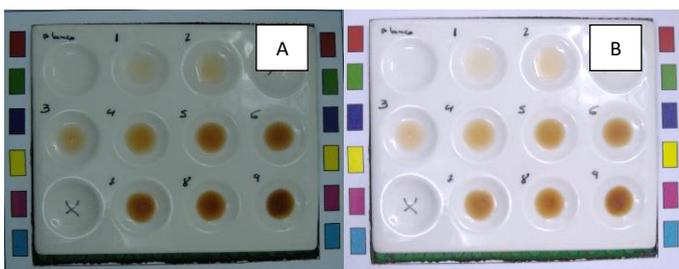


Figura 8. A: Fotografía sin tratamiento digital. B: fotografía tratada digitalmente

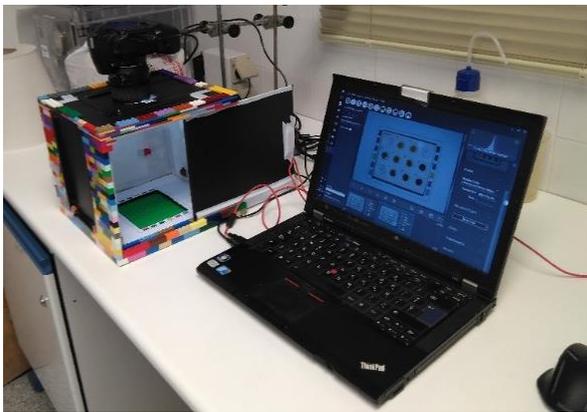
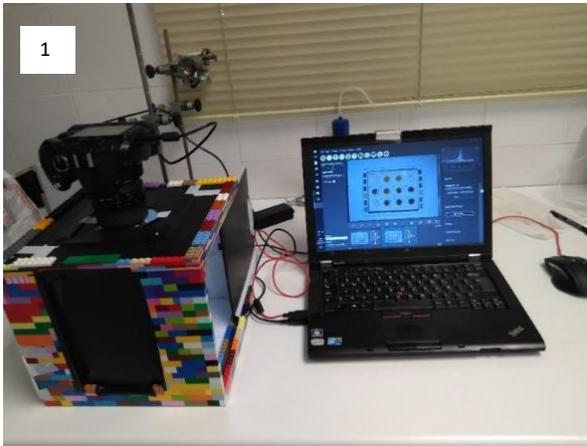
$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = (M) \cdot \begin{pmatrix} r \\ g \\ b \end{pmatrix} \quad \text{Ec. 7}$$

Obtenida dicha matriz, se puede realizar la toma de datos de color de las disoluciones fotografiadas y realizar el mismo tratamiento matemático para obtener los valores XYZ D65 e introducirlos en el programa de estimación de espectros (apartado 3.2).

Por otro lado, a las mismas disoluciones, a los mismos tiempos, se les realizó la medida de color con el espectrofotómetro, registrando tanto los valores XYZ D65 como su espectro

entre 360 y 740 nm, con 3 mm de diámetro de área medida, con el iluminante D65 a 10° de observador.

3.4. La caja de iluminación (The LightBox).



Se montó una caja de iluminación (LightBox) basada en una estructura de piezas de Lego y cartón-pluma (Fig. 9), con unas dimensiones externas 25'5/25'5/23 cm, e internas 21'5/22,5/22 cm. En ella se colocaron dos bombillas LED de 1,2W y 6000K de casquillo E14 que aportan 100Lm cada una, las cuales se montaron dentro de la caja. Para conseguir una iluminación difusa y homogénea en el fondo de la caja se hicieron unos difusores de papel de aluminio como reflectante y papel de celulosa como difusor. Una lámina de cartón-pluma hace de puerta corredera para facilitar el acceso, mientras que la parte superior (también desmontable) tiene un orificio circular para introducir el objetivo de la cámara. Internamente la caja está forrada con este mismo papel, así como el fondo, donde además se añade la referencia de colores, con vector triestímulo medido con el espectrofotómetro.

Figura 9. Fotografías de la Caja de Iluminación (LightBox).1: vista frontal. 2: vista lateral. 3: vista superior. 4: vista superior-bis.

4. Resultados y discusión.

4.1. Calibración.

Para estudiar y comparar ambas metodologías se muestran los resultados estudiados para algunos compuestos que presentan reactividad con los diferentes ensayos escogidos, de forma que se pueda comparar la espectrofotometría frente a la fotografía con el tratamiento fotográfico y matemático, además de comparar ambas con otras linealizaciones del color propuestas.

4.1.1. Ibuprofeno.

El ibuprofeno presentó reactividad frente a los ensayos Marquis y Mandelin. Para el primero se realizaron por pesada los puntos presentados en la Tabla 2. De cada disolución, una vez trasvasada a la placa de toques, se realiza la medida del espectro y de los datos XYZ con el espectrofotómetro. Por otro lado, se toma una fotografía de toda la placa de toques con todas las disoluciones. Como se comentará más adelante, es común cierto grado de evolución del color con el tiempo, por lo que se escogieron ciertos tiempos para la toma de datos (5, 30 y 60 min).

C (mg/mL)	Espectros reconstruidos			Espectros medidos		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,0	75,08	80,42	90,76	35,01	36,82	33,47
0,6	69,35	72,48	65,05	31,17	31,85	23,89
1,2	70,62	73,40	62,94	27,38	27,71	17,99
2,2	60,13	61,35	45,63	28,15	28,33	18,4
3,0	55,06	53,30	29,42	25,12	24,32	12,41
5,0	47,17	42,93	16,52	19,52	17,75	6,23
6,8	42,04	36,80	14,53	19,11	19,86	4,65
8,9	41,96	37,07	12,94	18,84	16,89	5,02
12,0	39,28	33,19	9,51	17,2	14,84	3,16
16,1	31,22	24,12	6,02	12,54	9,87	0,83

Tabla 2. Vector CIE XYZ de los puntos de la recta de calibrado Ibuprofeno-Marquis.

Si comparamos los valores del vector triestímulo obtenido por el espectrofotómetro con el calculado, observamos que el valor de cada componente es en torno a la mitad del que se obtiene mediante el tratamiento digital y matemático del color. Esto indica que hay una diferencia entre la



Figura 10. Color (dis. 5,0 mg/mL) percibido por: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía tras el tratamiento digital

luminosidad percibida entre ambos métodos. Es decir, en la configuración utilizada, el espectrofotómetro percibe los colores más oscuros (Fig. 10).

Por otro lado, dado que el espectrofotómetro obtiene el espectro de 360 a 740 nm, pero a la hora de reconstruir dicho espectro solo podemos hacerlo de 400 a 700 nm, será este último intervalo el que se use para comparar ambos espectros. Como consecuencia de la tonalidad oscura percibida por el espectrofotómetro, al utilizar la Ec. 6, hay puntos que tenderán a infinito debido a que el espectro en dicho punto tiende a cero.

Al comparar los espectros obtenidos con ambos instrumentos (Fig. 11), ya que el valor X, Y ó Z (Ec. 1-3) es el valor de la integral de dicha curva, es lógico por lo comentado anteriormente que obtengamos diferentes valores para los diferentes puntos de la curva. Sin embargo, si consideramos que el color es el mismo y que la diferencia es debida a la

iluminancia, la forma de la curva debería ser similar pero desplazada a valores mayores. Se ve que esto es lo que sucede, salvo por una sobreestimación en la zona de 450 nm.

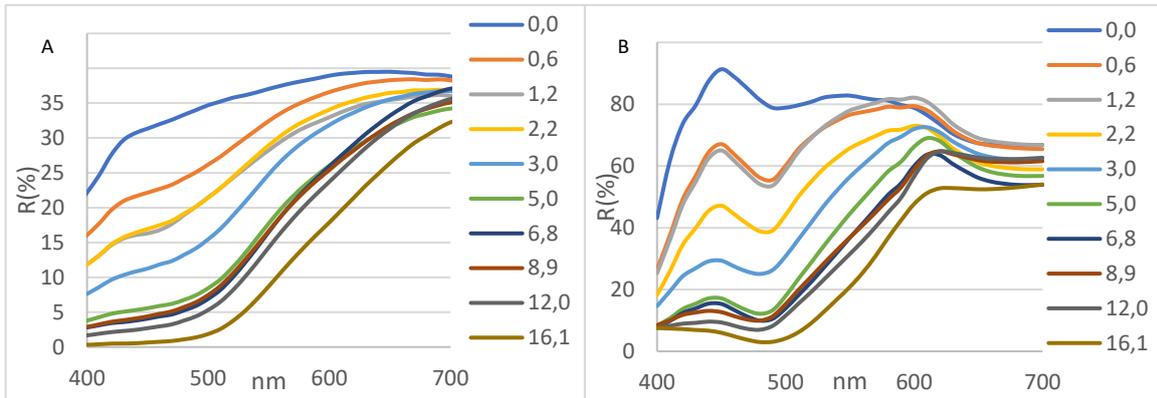


Figura 11. Espectros obtenidos: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía

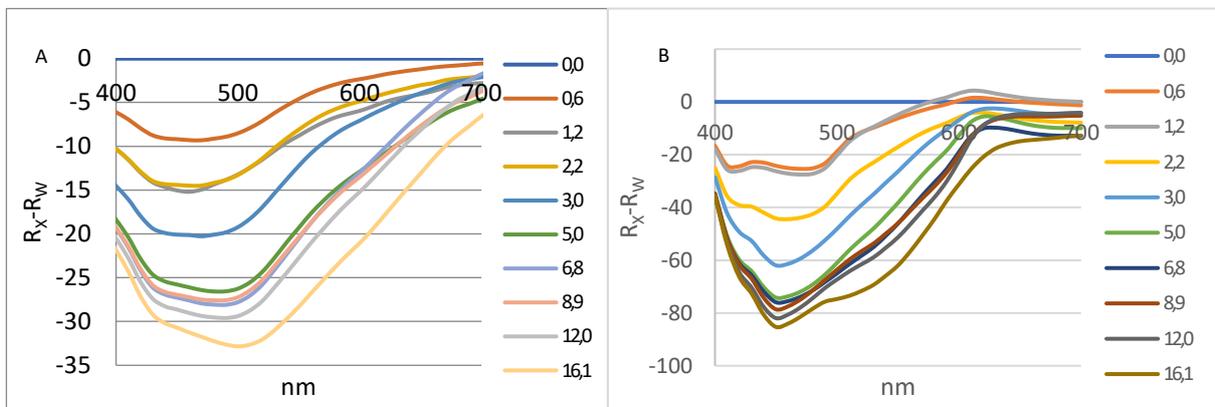


Figura 12. Absorbancia aparente obtenida con: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía

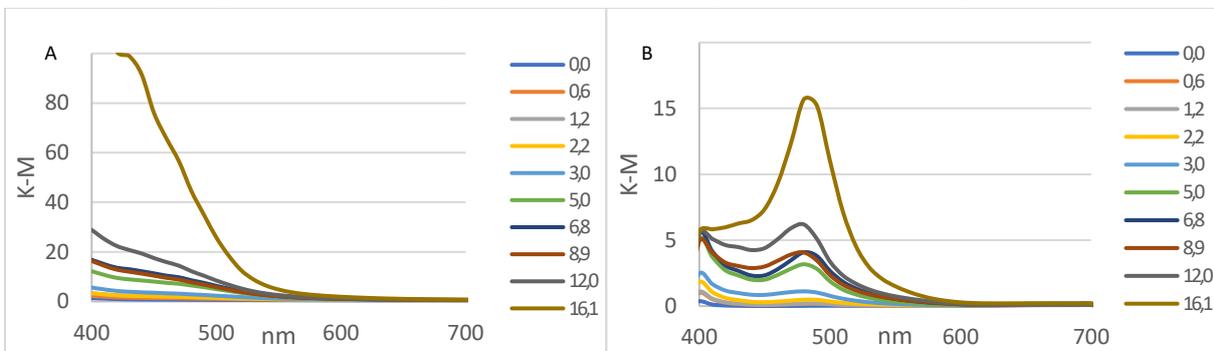


Figura 13. Valores Kubelka-Munk a partir de los espectros obtenidos con: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía

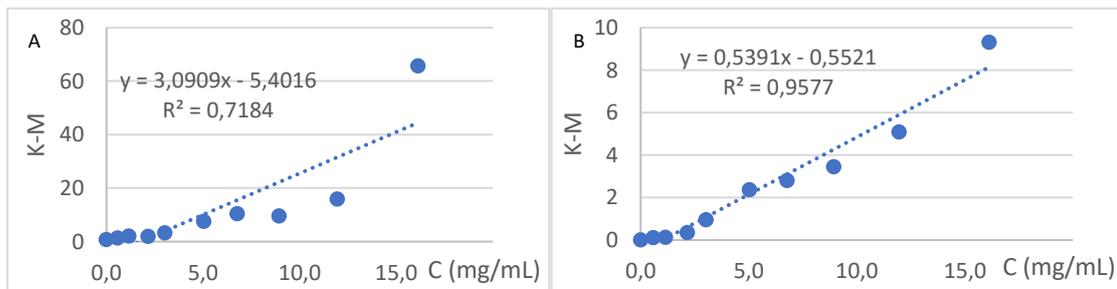


Figura 14. Rectas Kubelka-Munk en función de la concentración a 460 nm con: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía

En ambos casos se ve con claridad que la absorción se produce entre los 450 y 500 nm, coherente con una gama de marrones, siendo más claro (más blanco-grisáceo) cuanto menor

es la concentración. Tanto las gráficas de absorción aparente (Fig. 12) como las obtenidas a partir de Kubelka-Munk (Fig. 13) son coherentes entre sí y los máximos de absorción que indican.

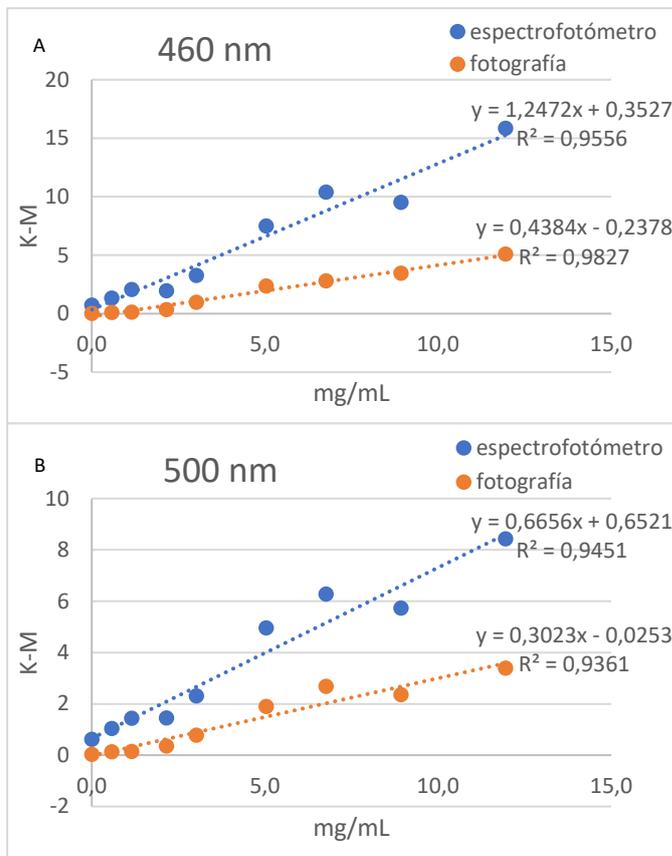


Figura 15. Comparación de rectas Kubelka-Munk en función de la concentración a 460 (A) y 500 (B) nm con Espectrofotómetro y Fotografía para 5 min de reacción

Al representar los valores Kubelka-Munk (Fig. 14) en función de la concentración para una longitud de onda obtenemos un rango lineal que llega hasta 12,0 mg/mL en ambos casos. En cuanto a la sensibilidad, el espectrofotómetro consigue el para ambas longitudes de onda al menos el doble de la sensibilidad obtenida con la fotografía y la reconstrucción de espectros (Fig. 15).

Al obtenerse con el espectrofotómetro valores de reflectancia menores a todas las longitudes de onda (un color más oscuro), el valor obtenido por Kubelka-Munk (Ec. 5) es mayor respecto a su análogo obtenido por reconstrucción del espectro del color en la fotografía.

Por otro lado, utilizando los datos de color RGB de la fotografía en bruto, o alguno de los vectores derivados, se obtienen también

intervalos de concentración donde podemos representar un cierto rango de espacio de color en función de ésta. En este caso se presentan los datos tras el tratamiento digital de la fotografía (Fig. 8B).

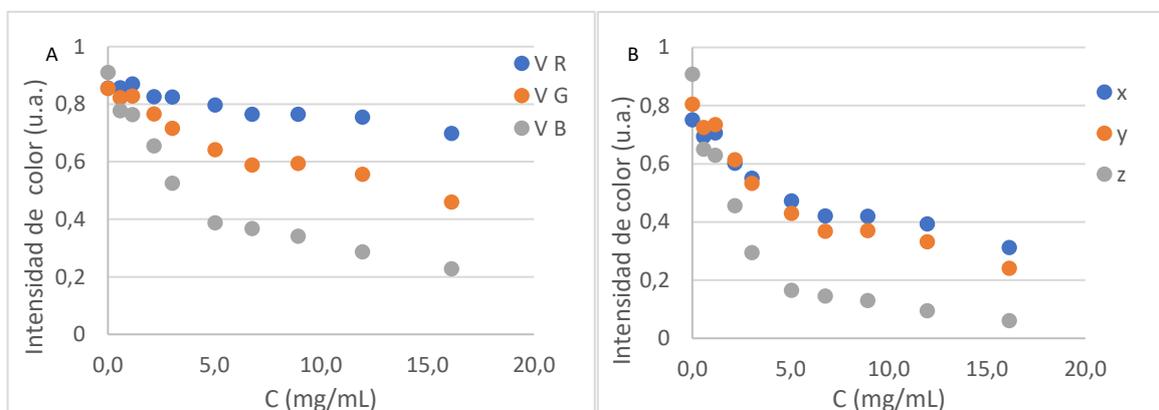


Figura 16. Representación de los vectores triestímulo (0-1) en función de la concentración. A- RGB. B- XYZ

Se representa el valor medio de los datos RGB dividido por 255 (el valor del blanco). La componente R parece tener un comportamiento lineal decreciente frente a la concentración,

mientras que la componente B tiene dos rangos lineales, uno de mayor pendiente de 0 a 5 mg/mL, y otro a partir de 5 mg/mL. La componente G es una situación intermedia entre R y B (Fig 16A). Los datos XYZ son divididos por 100 (valor de Y del blanco). Utilizando los datos XYZ calculados, las tres componentes tienen un comportamiento lineal hasta los 5 mg/mL (Fig 16B).

Sin embargo, si representamos las componentes lineales frente a logaritmo de la concentración, encontramos una mayor linealidad en los datos, aunque en la componente b y z sigue pareciendo haber dos rangos diferentes. El vector lineal de RGB es el vector denominado v (inversión de compensación del vector V , ampliación en anexo 7.2). El vector lineal de XYZ se calcula a partir del valor calculado de cada componente dividido por el valor correspondiente para el blanco en la iluminación D65 (X: 95,05; Y: 100; Z: 108,83). Ambas representaciones son muy similares, salvo porque en el caso del vector xyz la componente x tiene un valor más próximo a las otras componentes que en el caso de r con rgb (Fig. 17).

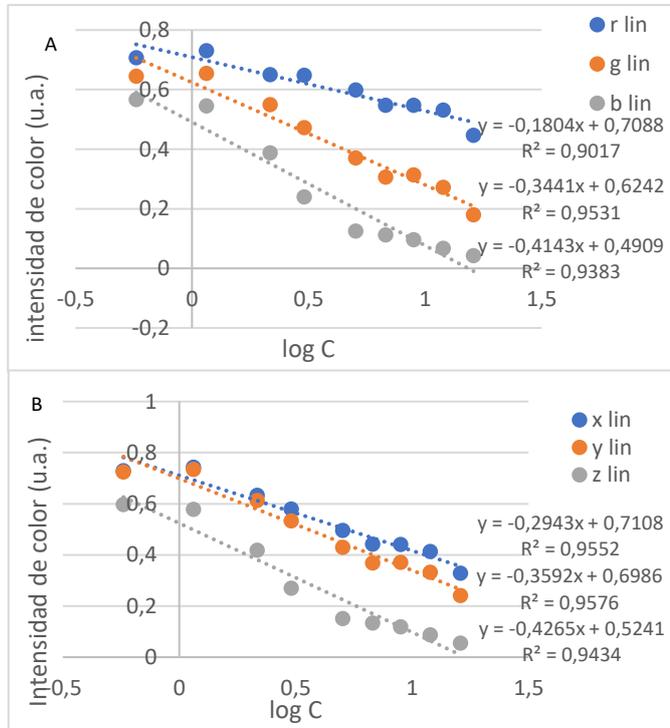


Figura 17. A: rgb (lineal) vs log C (mg/mL). B: xyz (lineal) vs log C (mg/mL)

Para el test Mandelin se prepararon disoluciones similares a las del test Marquis (Tabla 3). En este caso la progresión de color es al negro, esto sucede rápidamente. El programa de reconstrucción de espectros tiene la limitación de que el negro (menor valor de color posible) es (2,2,2) en XYZ, y no se consigue recuperar un espectro por debajo de dicho vector.

C (mg/mL)	Espectros reconstruidos			Espectros medidos		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,0	75,84	81,15	89,83	36,90	38,83	35,54
0,6	19,85	15,37	5,56	8,54	7,46	1,25
1,2	18,67	16,36	11,11	5,25	4,21	0,67
2,0	12,69	10,58	6,95	4,23	3,07	0,19
2,9	7,78	5,80	2,31	4,38	3,25	0,27
5,2	4,96	4,51	4,59	1,01	0,80	0,16
7,5	6,38	6,43	7,27	1,00	0,78	0,11
9,1	6,54	6,53	7,09	0,39	0,33	0,03
12,2	3,86	3,74	3,54	0,87	0,69	0,11
14,8	4,80	4,34	4,57	0,89	0,66	0,03

Tabla 3. Vector CIE XYZ de los puntos de la recta de calibrado Ibuprofeno-Mandelin.

Inicialmente el test tiene un color amarillo, pero conforme crece la concentración la absorción entre 550 y 700 nm aumenta. También encontramos la mayor luminosidad en los espectros reconstruidos (Tabla 3). Dado que la absorción comienza a unos 550 nm, se escoge 600 nm como longitud de onda para comparar ambos métodos.

Observando las gráficas de los espectros (Fig.

18), se ve que para ambos métodos a partir de cierta concentración no se pueden distinguir los espectros, por lo que se obtendrán rangos lineales menores que con Marquis.

A partir de 5 mg/mL podemos considerar que el color es constante, e indistinguible para ambas técnicas, con un aumento de concentración. La fotografía parece tener una mejor linealidad y durante un mayor rango, quizá debido a la mayor luminosidad en la fotografía, que permite tener algo más resolución entre colores (Fig. 19).

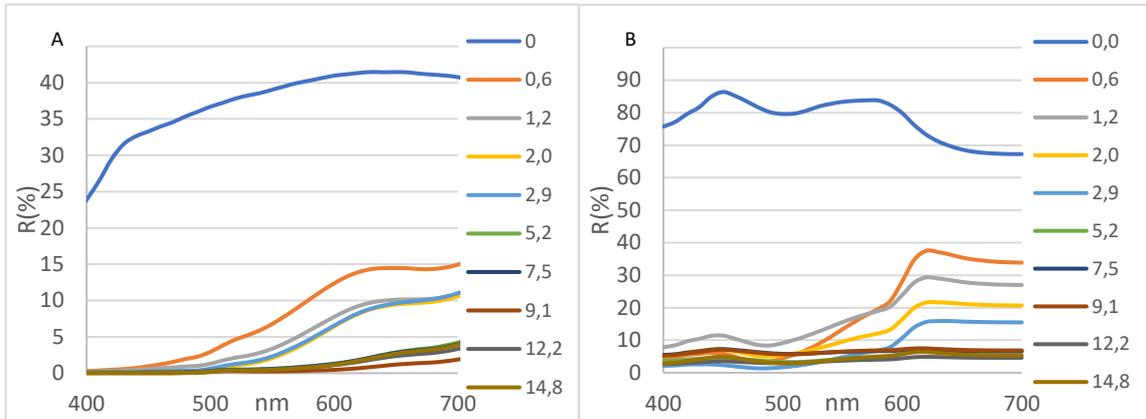


Figura 18. Espectros obtenidos: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía

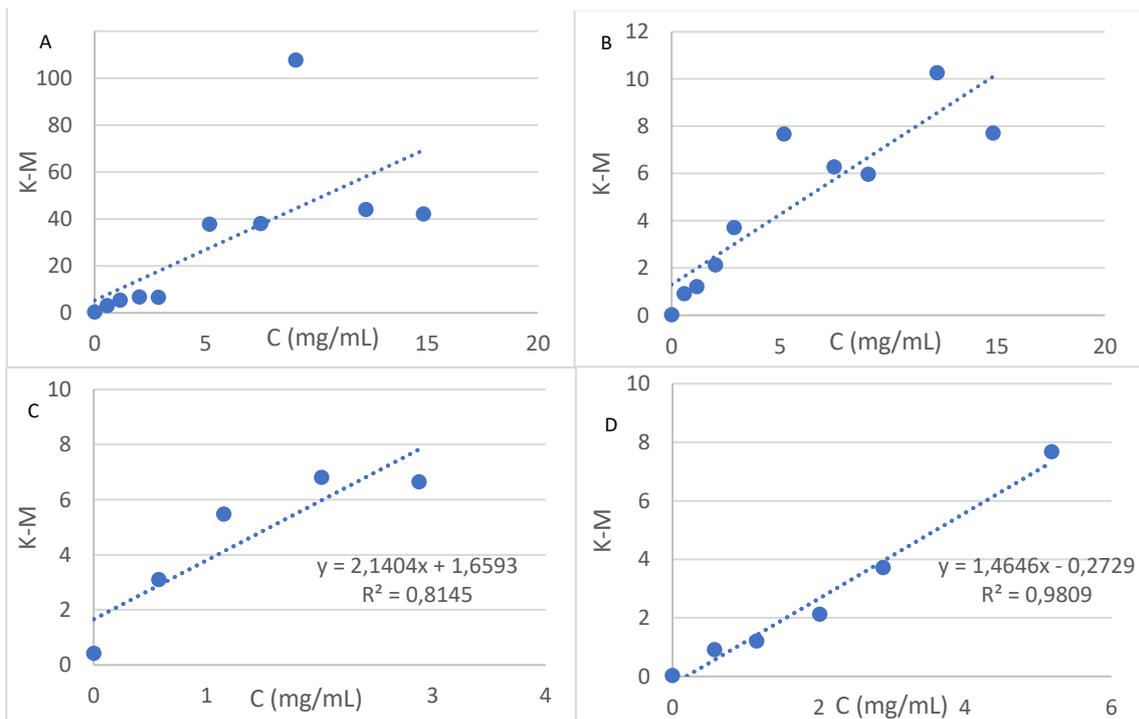


Figura 19. Rectas a 600nm obtenidas: A. Espectrofotómetro todos los puntos, B. Fotografía todos los puntos, C. Espectrofotómetro "lineal", D. Fotografía "lineal".

En la Fig. 19A vemos un punto, el punto 7 (9,1 mg/mL) que parece ser percibido mucho más oscuro que los sucesivos, siendo aparentemente igual de negro. Descartando aquellos puntos más allá de la linealidad en la Fig 19C y D se obtiene aparentemente una mejor recta en el caso de la fotografía que con el espectrofotómetro.

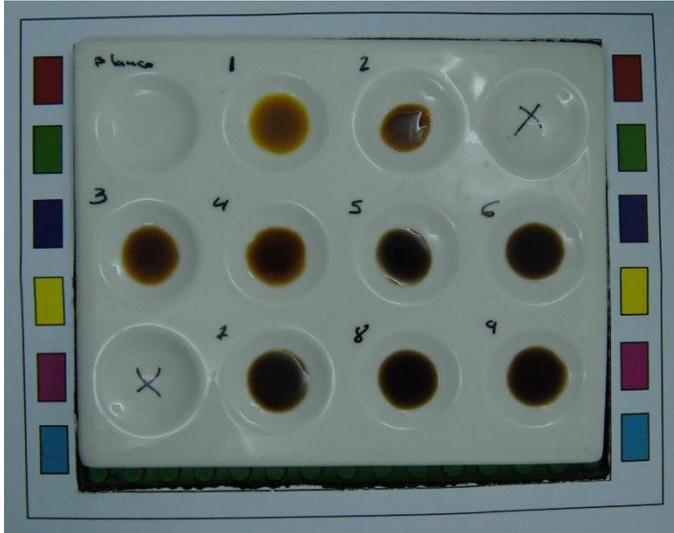


Figura 20. Puntos de calibración de la reacción de Ibuprofeno con el test Mandelin a los 5 min.

En cuanto a los datos de color, al terminar la progresión en negro, una vez alcanzado dicho color las componentes tienden a ser iguales o similares entre sí y de baja intensidad, por lo que tampoco se pueden distinguir mediante estos datos (Fig. 20). Se tienen, por tanto, dos zonas, una inicial con cierta linealidad, tras lo que los valores se estancan. En este caso, todas las maneras de medir parecen tener un rango lineal similar entre sí. Viendo las representaciones de intensidad de RGB y rgb lineal (Fig. 21), dicho rango lineal está aproximadamente en los 5 mg/mL, como al aplicar Kubelka-Munk. En

este caso utilizar el rgb lineal no aporta una mejora respecto de intensidad de RGB. Para esta reacción, la forma de las gráficas de otras representaciones análogas en XYZ no difiere de las ya adjuntadas.

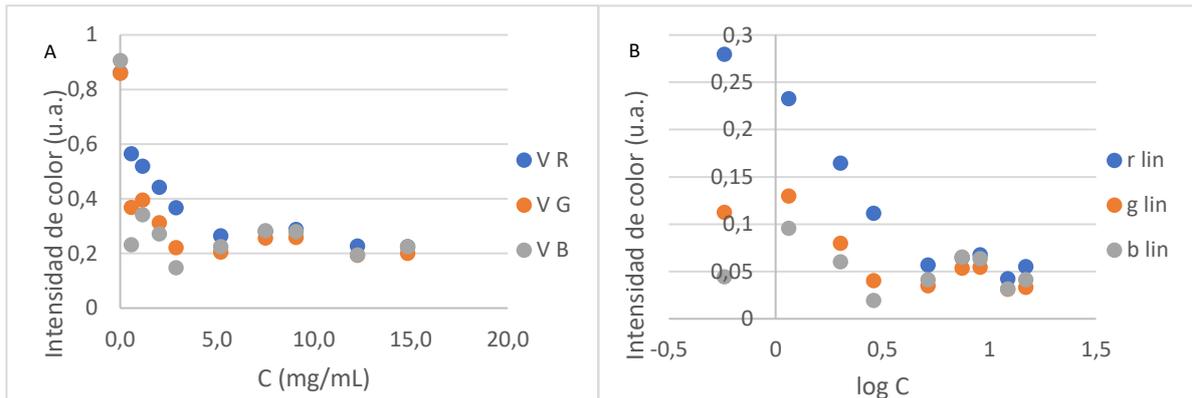


Figura 21. Graficas: A- RGB (0-1) vs C (mg/mL). B- rgb (lineal) vs log C

4.1.2 Prolina

C (mg/mL)	Espectros reconstruidos			Espectros medidos		
	X	Y	Z	X	Y	Z
0,0	69,33	74,04	83,23	36,82	38,75	35,44
0,4	13,37	14,54	27,65	6,14	6,62	10,14
1,1	8,17	8,73	21,32	1,50	1,46	5,36
1,8	5,18	4,88	14,67	0,70	0,55	3,46
2,1	2,97	2,40	10,90	0,41	0,26	2,22
2,8	2,70	2,56	6,52	0,27	0,17	1,19
3,3	3,47	3,59	7,50	0,62	0,57	1,40
4,4	2,20	2,40	6,85	0,14	0,06	0,73
5,0	2,62	2,43	7,02	0,23	0,14	1,10
6,7	3,45	3,25	4,21	0,43	0,41	0,78

Tabla 4. Vector CIE XYZ de los puntos de la recta de calibrado Prolina-Simon.

Para analizar la progresión de color del test Simon, dado que éste es un test muy específico y que solo responde ante aminas secundarias, se realizó el ensayo ya comentado con la prolina (Tabla 4), con una proporción constante de 0,3 mL de reactivo A y 0,6 mL de reactivo B en cada disolución.

El color varía en torno al azul de Prusia (Fig. 22C), empezando en tonos menos intensos hasta llegar al negro. En

el caso de la reconstrucción de los espectros a partir de la fotografía, se unen en este caso una cierta sobreestimación del azul además de la mayor luminosidad (Fig. 22 A y B), por lo que parece que la progresión del color en este caso tiene mayor variación (Tabla 4).



Figura 22. Percepción del color de para 2,1 mg/mL por: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía, C. Azul de Prusia (2,6/2,8/8,6)

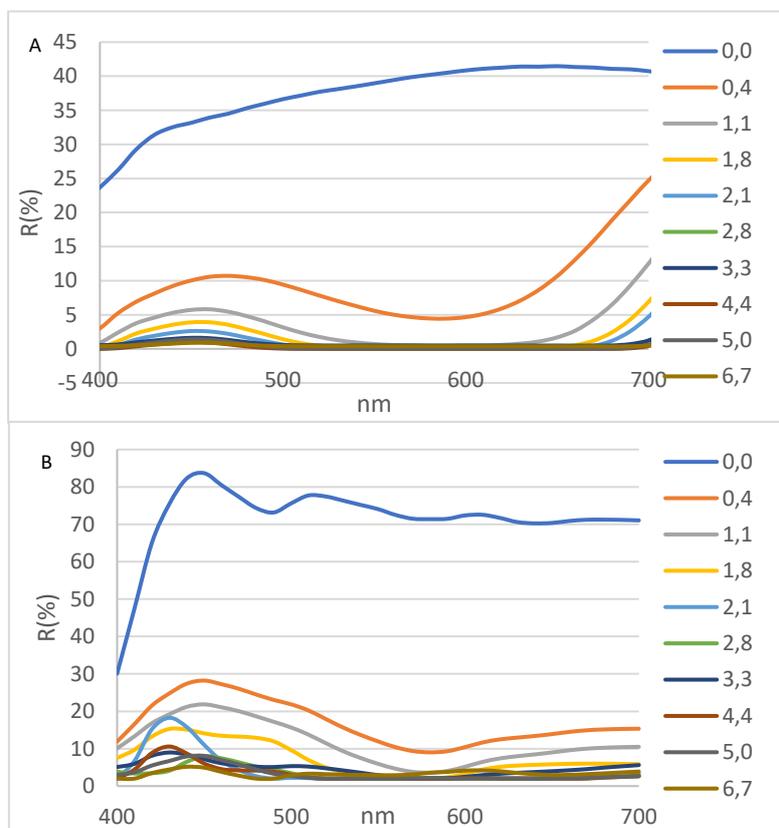


Figura 23. Espectros obtenidos con: A. Espectrofotómetro, B. Fotografía

En los espectros estimados a partir de los colores de la fotografía se pierde la parte de la absorción que se produce en la zona del rojo, la cual sí aparece en las medidas realizadas con el espectrofotómetro (Fig. 23).

Por otro lado, a 2,1 mg/mL la estimación del espectro es significativamente diferente de la progresión que presenta el resto de puntos. Para los puntos finales en ambos casos los espectros están ya muy próximos al negro.

Mirando los puntos donde se produce absorción aparente según las gráficas de espectros, se eligen las longitudes de onda 450 y 700 nm, para comparar de nuevo ambos métodos (Fig. 23).

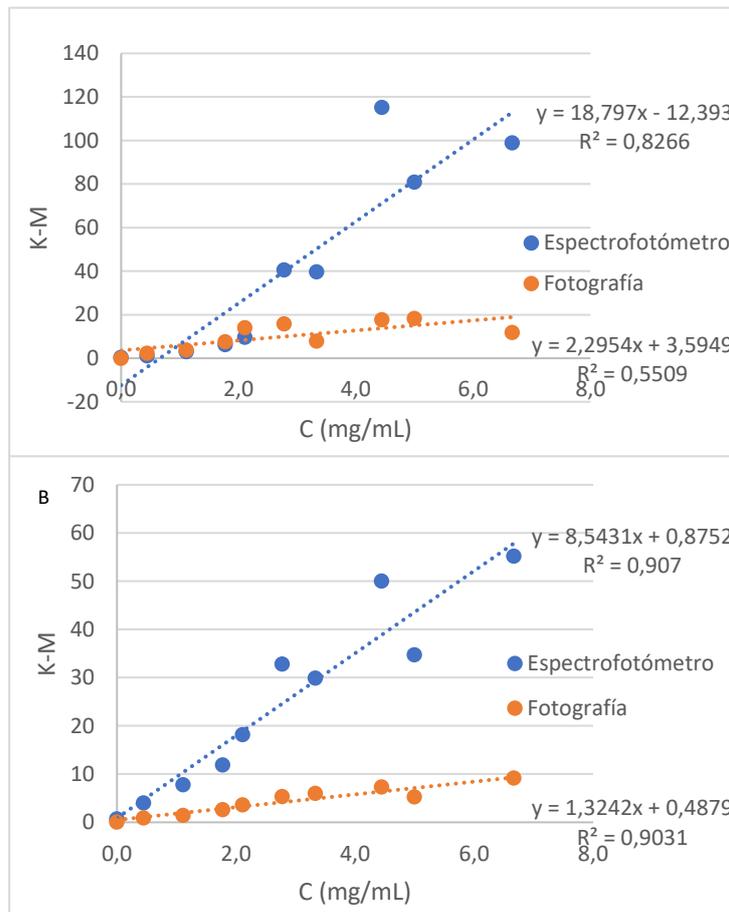


Figura 24. Rectas Kubelka-Munk en función de la concentración a A: 700 nm y B: 450nm

A 700 nm la técnica fotográfica no funciona, para esa longitud de onda la estimación del espectro no se ajusta a la real y tampoco la representa adecuadamente en función de la concentración. Sin embargo, a 450 nm el ajuste es aceptablemente bueno, y se ve una mayor sensibilidad por parte del espectrofotómetro, aunque el rango lineal en ambos casos parece llegar a los 7 mg/mL (Fig. 24).

A 450 nm, el punto 4 (2,1 mg/mL) pese a tener una estimación de espectro significativamente diferente tanto al real como al resto de las estimaciones, da un valor dentro de la tendencia, lo cual no sucede a otras longitudes de onda, por lo que posibles reconstrucciones anómalas perturbarían la medida y los resultados.

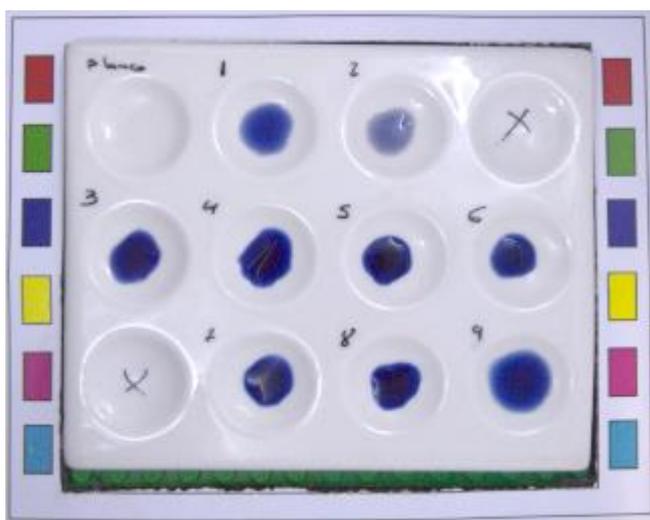


Figura 25. Puntos de calibración de la reacción de Prolina con el test Simon a los 5 min.

En este caso, los datos de color tienen un rango lineal hasta los 3 mg/mL. Los datos RGB, que solo han recibido el tratamiento fotográfico digital (Fig. 25), presentan una linealidad aceptable, que mejora ligeramente al aplicar el tratamiento matemático de conversión. En cuanto a la representación lineal de ambos vectores, no aportan mejoras significativas a sus homólogos (Fig. 26).

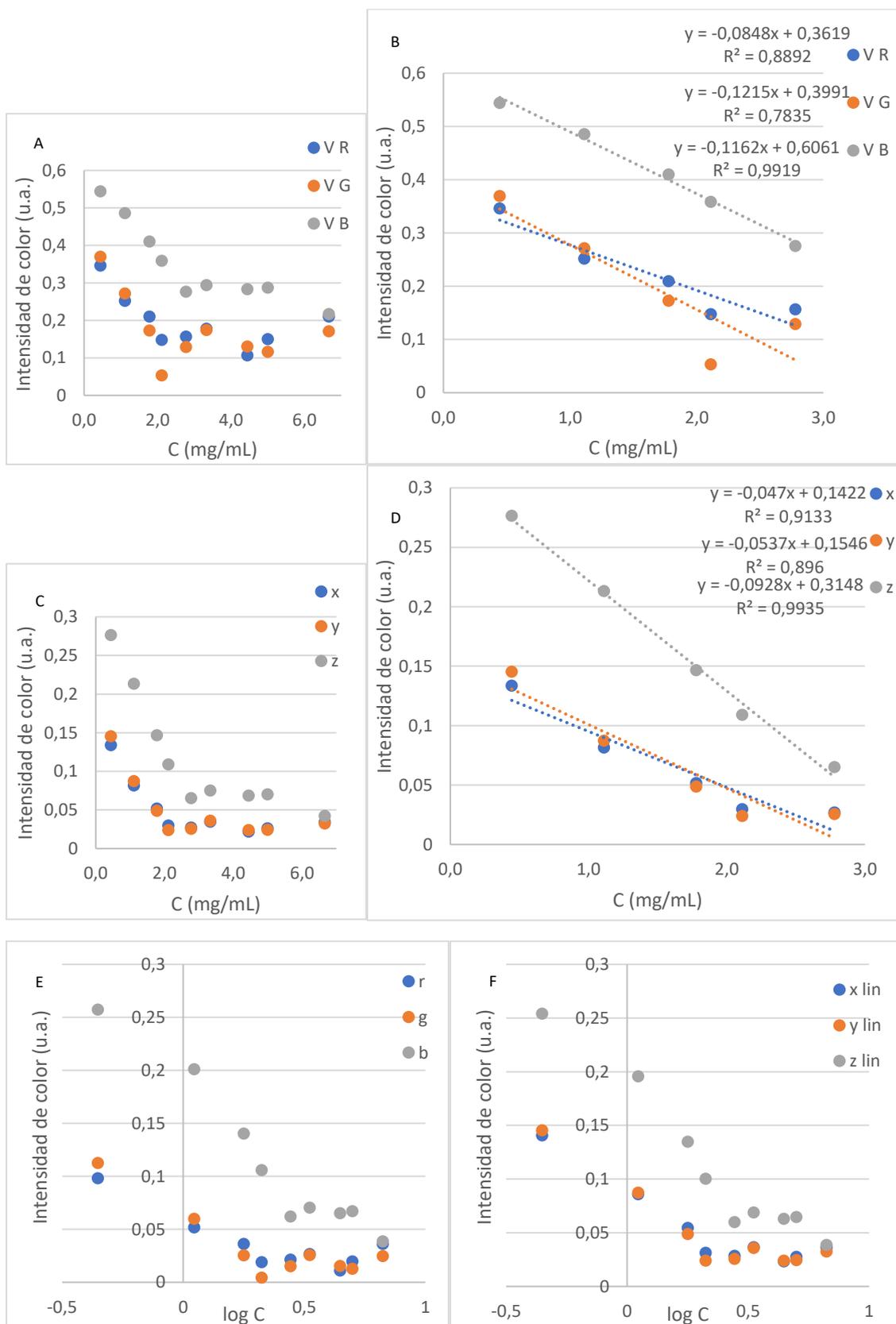


Figura 26. A- Gráficas: RGB (0-1) frente a concentración; B- RGB (0-1) frente a concentración, rango lineal; C- XYZ (0-1) frente a concentración; D- XYZ (0-1) frente a concentración, rango lineal; E- rgb (lineal) frente a log C; F- xyz lineal frente a log C

4.2. Muestras.

Para evaluar las formas de medir propuestas (espectrofotometría y reconstrucción del espectro a partir de una fotografía), se plantea el análisis de dos analitos (ibuprofeno y prolina) junto con los dos ensayos que mejor respuesta han presentado (Marquis y Simon). Por otro lado, para evaluar las posiciones sobreiluminadas, se plantea la comparación de dos posiciones

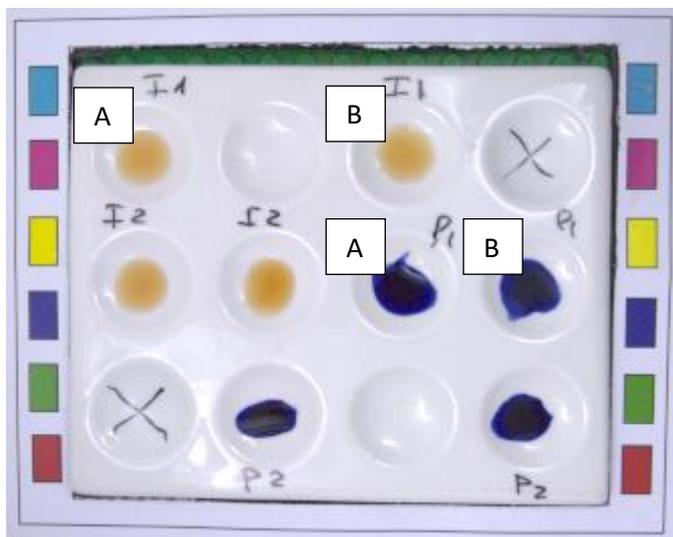


Figura 27. Fotografía de muestras de Ibuprofeno (I1, I2) y Prolina (P1, P2).

con una misma disolución, de forma que una se encuentre en la zona iluminada de forma difusa exclusivamente (X.A) y otra en la zona sobreiluminada (X.B).

El test Marquis se ensayó con ibuprofeno, preparando por pesada dos disoluciones de concentración lo más igual posible (ambas de 5,9 mg/mL). De forma análoga se prepararon con el test Simon las disoluciones de prolina (4,6 y 4,8 mg/mL).

Una vez preparadas y trasvasadas a la placa de toques, transcurrido el tiempo de reacción, se realizan las medidas con el espectrofotómetro y se realiza la toma de la fotografía. Tras el tratamiento digital de la fotografía obtenemos la Figura 27, de la cual se miden los valores RGB de cada color y se transforman matemáticamente dichos vectores.

Aparentemente, la varianza en el vector triestímulo es menor al medirlo con el espectrofotómetro, sin embargo, los valores obtenidos mediante la fotografía son valores consistentes entre sí (Tabla 5).

Para el ibuprofeno, utilizando las funciones calculadas en la Fig. 15, se ve que al interpolar los valores obtenidos de Kubelka-Munk se obtiene una concentración superior a la real. Al

Ibuprofeno	Espectrofotómetro			Fotografía		
	X	Y	Z	X	Y	Z
1 (A)	20,16	18,20	4,94	46,73	41,00	13,99
1 (B)	21,00	19,17	5,66	44,51	39,75	12,94
2 (A)	20,06	18,26	4,99	42,95	36,98	9,70
2 (B)	19,16	17,18	4,24	44,38	39,01	13,58

Prolina	Espectrofotómetro			Fotografía		
	X	Y	Z	X	Y	Z
1 (A)	0,12	0,06	0,56	2,58	2,58	6,12
1 (B)	0,17	0,09	0,82	3,40	3,56	6,17
2 (A)	0,09	0,05	0,39	2,39	2,48	5,20
2 (B)	1,14	1,14	1,72	3,89	3,98	6,33

Tabla 5. Valores CIE XYZ D65 para las muestras de Ibuprofeno y Prolina.

realizar el ensayo, el tiempo de reacción del reactivo Marquis con ibuprofeno fue superior a los 5 minutos utilizados en la calibración.

Aproximadamente transcurrieron entre 10 y 15 minutos, por lo que, asumiendo que la evolución del color es lineal respecto al tiempo entre los 5 y 30 minutos de reacción (Fig. 28), se espera que la media de las concentraciones a cada tiempo represente mejor la

concentración de la muestra. Si bien la media de ambas concentraciones mejora el resultado respecto del real, en todos los casos se observa una sobreestimación de la concentración por parte de la técnica fotográfica respecto de su homólogo con el espectrofotómetro (Tabla 6). En cuanto a la comparación del punto 1(A) y 1(B), no hay diferencia que indique una iluminación diferente. Sin embargo, el punto 2(A) de ibuprofeno parece ser percibido como un punto mucho más oscuro que 2(B) el cual es comparable a los valores obtenidos por 1(A) y 1(B).

5 min	Espectrofotómetro				Fotografía			
	460 nm		500 nm		460 nm		500 nm	
Muestra	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)
1.A	9,73	7,52	5,59	7,42	3,05	7,50	2,54	8,49
1.B	8,43	6,47	4,86	6,32	3,37	8,23	2,51	8,38
2.A	9,59	7,41	5,21	6,85	5,02	12,00	3,75	12,49
2.B	11,52	8,95	6,14	8,24	3,15	7,74	2,65	8,85

30 min	Espectrofotómetro				Fotografía			
	460 nm		500 nm		460 nm		500 nm	
Muestra	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)
1.A	9,73	2,99	5,59	3,24	3,05	3,97	2,54	3,92
1.B	8,43	2,72	4,86	2,90	3,37	4,31	2,51	3,88
2.A	9,59	2,96	5,21	3,06	5,02	6,02	3,75	5,30
2.B	11,52	3,35	6,14	3,49	3,15	4,08	2,65	4,04

Tabla 6. Valores de Kubelka-Munk y concentraciones calculadas de Ibuprofeno.

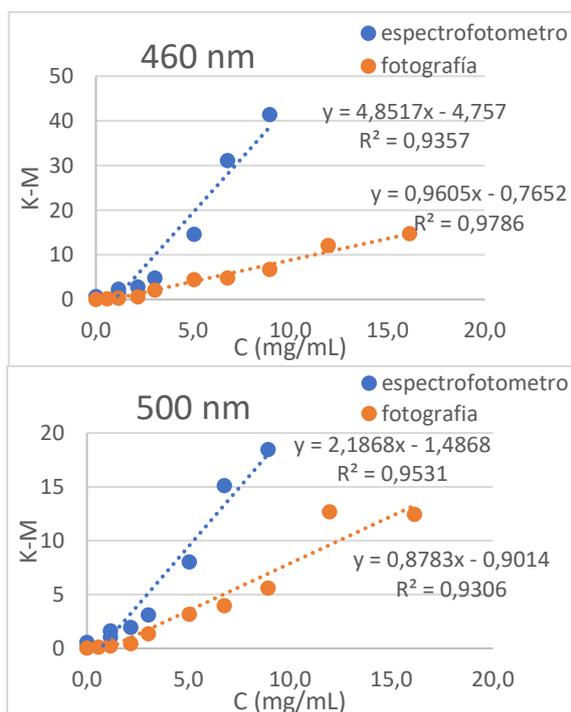


Figura 28: Gráficas de valores Kubelka-Munk vs Concentración a 30 min

Muestras	Espectrofotómetro		Fotografía	
	460	500	460	500
1 (A)	5,25	5,33	5,73	6,21
1 (B)	4,59	4,61	6,27	6,13
2 (A)	5,18	4,96	9,01	8,89
2 (B)	6,15	5,86	5,91	6,44

Tabla 7. Media de concentraciones calculadas a 5 y 30 min

Por otro lado, en la medida de la prolina con el test de Simon, se encuentra que, prácticamente, para el espectrofotómetro todo son tonos de negros, lo que hace que el espectro sea casi una línea horizontal y pequeñas variaciones de reflectancia generen grandes cambios de la concentración estimada. Este fenómeno se ha percibido en los resultados de la reacción de ibuprofeno con Mandelin. Al igual que explica Beer-Lambert en el caso de la absorción de radiación visible de disoluciones diluidas, al aumentar mucho la concentración la absorción deja de ser una evolución lineal respecto de la concentración.

En cuanto a la iluminación de las restantes posiciones, parece no haber una gran variación entre ellas, aunque se podría pensar que la posición 2(A) vuelve a ser ligeramente más oscura que la 2(B).

La iluminación en general es buena, sin embargo, cerca de los focos de luz aparece zona, más próxima a la línea roja (Fig. 29), donde no se han conseguido eliminar los brillos (iluminación directa), por lo que no han podido usarse esas posiciones de la placa de toques para la medición,

Muestras	Espectrofotómetro		Fotografía	
	K-M	C _{medida} (mg/mL)	K-M	C _{medida} (mg/mL)
1.A	64,79	7,48	7,02	4,94
1.B	45,30	5,20	7,10	4,99
2.A	93,34	10,82	7,45	5,26
2.B	26,33	2,98	6,35	4,43

Tabla 8. Valores de Kubelka-Munk y concentraciones calculadas de Prolina.

ya que esto falsearía los resultados. Las posiciones en el entorno de la línea amarilla se ven algo afectadas, lo cual se percibe en alguna de las fotos realizadas, aunque aun así se van a considerar datos aceptables los producidos por puntos. La asimetría y artesanía en la construcción de la caja explican los valores obtenidos en el entorno de la línea amarilla expuestos en las tablas de resultados 6 a 8.

Por otro lado, la placa de toques tiene un diseño (Fig. 30) que fomenta una variación del color y del espectro en función de la posición de medida, ya que esta concavidad conlleva distinto recorrido de la luz e incrementa la varianza al medir tanto con el espectrofotómetro como con la fotografía. Esto podría solucionarse con cavidades de fondo plano donde independientemente de la posición el recorrido sería el mismo. Este punto es especialmente visible en disoluciones diluidas y más translúcidas, donde el color del fondo “blanquea” el de la disolución, aunque también se percibe en disoluciones que tienden al negro, donde el valor central es mucho menor que en los márgenes.

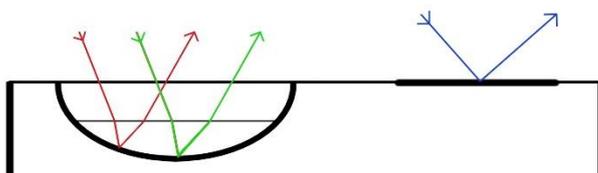


Figura 30. Distancias recorridas en función de la superficie de reflexión.

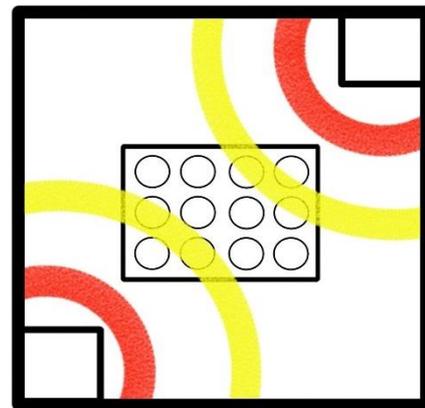


Figura 29. Esquema de distribución de la iluminación conseguida.

5. Conclusiones.

Teniendo en cuenta que el objetivo planteado en este trabajo era realizar una primera aproximación a la cuantificación y caracterización de muestras de drogas, mediante el estudio del color producido por los reactivos utilizados en los ensayos cualitativos, con herramientas sencillas, se pueden establecer las siguientes conclusiones.

En cuanto a la caja de iluminación construida para realizar las fotografías en un entorno controlado, se ha conseguido un tamaño bastante reducido y, en términos generales, ha funcionado correctamente. Pese a la heterogeneidad de la iluminación, la construcción realizada ha aportado unos datos reproducibles y satisfactorios. Mejorando los materiales y el montaje se solucionarían los problemas asociados a la iluminación.

Por otro lado, el programa en Excel, donde no se han usado matemáticas complejas ni un software de difícil acceso, ha conseguido unos resultados adecuados, ajustando los colores primarios y secundarios muy bien y siendo capaz de mantener la proporción y forma del espectro en una progresión de color con bastante fidelidad. Esto lleva a pensar que, mejorando las herramientas matemáticas y de software, se puede llegar a espectros mucho más fieles a la realidad en los colores más complejos, donde la herramienta actual no se puede considerar que represente bien colores como, por ejemplo, el rosa. Si bien todo el tratamiento digital y matemático realizado lleva a unos espectros más luminosos, lo que lleva a valores de Kubelka-Munk menores y por tanto a menor sensibilidad, posiblemente esto también es optimizable dentro de unos parámetros tan solo modificando dicho tratamiento del color fotografiado.

El análisis de los vectores de color, tanto en RGB como en CIE XYZ, resulta interesante dado que la toma de datos es muy rápida y puede ser programable, sin embargo, presenta rangos lineales sensiblemente menores que los obtenidos al trabajar con el espectro de reflectancia y de Kubelka-Munk, por lo que se valoran como una herramienta de análisis rápida pero algo limitada para el caso que quiere abordarse.

La reconstrucción del espectro presenta la ventaja de la toma de datos RGB, rápida y automatizable, junto con el amplio rango lineal que encontramos al utilizar Kubelka-Munk con los valores de dicho espectro. El conjunto se convierte en un sistema de análisis portátil muy interesante y de bajo coste y que puede miniaturizarse más, con mejoras como por ejemplo objetivos fijos con menor distancia focal. Todo esto puede hacer que en cierto tipo de colorimetrías ésta sea una técnica semicuantitativa de una calidad aceptable. Al comparar esta metodología con la utilizada con el espectrofotómetro, destacan los casos donde la progresión de color es hacia el negro como el ensayo de Simon de aminos secundarios o la reacción de Mandelin con el ibuprofeno, ya que con el espectrofotómetro se mide el centro de la concavidad y esto conlleva una pérdida de resolución entre los diferentes tonos de color.

Para el caso que nos ocupa, el análisis rápido de drogas, sería necesario realizar más ensayos con diferentes reactivos y compuestos (estadísticamente más comunes en las diferentes sustancias, compuestos activos, adulterantes y diluyentes habituales), de forma que se pueda escoger un conjunto de ensayos que presenten progresiones de color cuantificables y que permitan determinar en cierto grado la matriz de la muestra. En este sentido también sería muy interesante comprobar el comportamiento aditivo o no de la absorción por parte de varios compuestos y cómo responde tanto el programa como el tratamiento del color a esto. En dicha situación, hay dos casos estudiados de gran interés: cuando el máximo de absorción está próximo en ambos compuestos, donde el programa puede reaccionar razonablemente

bien, y el caso en que los máximos estén muy distanciados uno de otro, donde se generaría un color compuesto que previsiblemente conllevará una peor reconstrucción y dificultad de análisis.

Sin embargo, ejemplos como el test Simon, específico para aminor secundarias, es un buen método para la identificación de ATS junto con su variación para aminor primarias. Para poder distinguir entre diferentes ATS dentro de cada grupo, como por ejemplo metanfetamina de MDMA dentro del grupo de aminor secundarias o anfetamina de MDA en las aminor primarias, serán necesarios ensayos añadidos como Marquis o Mandelin con respuesta positiva.

Si bien queda trabajo por realizarse antes de poder utilizar este método fotográfico con recuperación del espectro en el análisis de drogas, los resultados conseguidos en este trabajo han sido incluso mejores de los esperados.

Como conclusión, el estudio y mejora de este tipo de sistemas de medida y tratamiento de datos va a ir tomando relevancia por su versatilidad, capacidad de minaturización, precio y portabilidad, incluso se puede utilizar un teléfono móvil como detector.²³

6. Bibliografía.

1. Alexander BK, Schweighofer ARF. Defining "addiction". *Can Psychol Can* 1988; 29(2): 151-162.
2. Alexander BK. The Globalization of Addiction. *Addict Res* 2000; 8(6): 501-526.
3. Brunt TM, Nagy C, Bücheli A, et al. Drug testing in Europe: monitoring results of the Trans European Drug Information (TEDI) project. *Drug Test Anal.* 2017; 9(2): 188-198.
4. United Nations Office on Drugs and Crime. *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials.* 2006.
5. United Nations Office on Drugs and Crime. *Rapid Testing Methods of Drugs of Abuse.* 1995.
6. Philp M, Fu S. A review of chemical 'spot' tests: A presumptive illicit drug identification technique. *Drug Test Anal.* 2017; (August 2017): 95-108.
7. Elkins KM, Weghorst AC, Quinn AA, Acharya S. Colour quantitation for chemical spot tests for a controlled substances presumptive test database. *Drug Test Anal.* 2017; 9(2): 306-310.
8. O'Neal CL, Crouch DJ, Fatah AA. Validation of twelve chemical spot tests for the detection of drugs of abuse. *Forensic Sci Int.* 2000; 109(3): 189-201.
9. Justice NI of. (NIJ Stand. 2000:19). Color Test Reagents/Kits for Preliminary Identification of Drugs of Abuse. <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/183258.pdf>.
10. Nagy G, Szöllösi I, Szendrei K. Colour Tests for Precursor Chemicals of Amphetamine-Type Substances. *Notes.* 2005; (December): 1-17.
11. F. Burriel Marti, S. Arribas Jimeno, F. Lucena Conde, J. Hernandez Mendez. *Química analítica cualitativa*, 16ª edición. Editorial Paraninfo, España, 1998
12. Revenga Parra M. *Síntesis y caracterización de ligandos hidroxilados de base de schiff. aplicación al desarrollo de sensores y biosensores.* Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid, 2009.
13. Choodum A, Nic Daeid N. *Digital image-based colourimetric tests for amphetamine and methylamphetamine.* *Drug Test Anal.* 2011; 3(5): 277-282.
14. Choodum A, Parabun K, Klawach N, Daeid NN, Kanatharana P, Wongniramaikul W. *Real time quantitative colourimetric test for methamphetamine detection using digital and mobile phone technology.* *Forensic Sci Int.* 2014; 235: 8-13.
15. Malacara D. *Color Vision and Colorimetry, Theory and Applications*, 2ª edición. Spie press, Bellingham, Washington. 2011.
16. Harifi T., Amirshahi S.H., Agahian F. Recovery of Reflectance Spectra from Colorimetric Data Using Principal Component Analysis Embedded Regression Technique. *Optical Review* Vol. 15, Nº 6, 2008;15(6):302-308.
17. Bianco S. Reflectance spectra recovery from tristimulus values by adaptive estimation with metameric shape correction. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis.* 2010; 27(8): 1868-1877.
18. Hawkyard J. *Synthetic reflectance curves.* JSDC. 1993; 109(OCTOBER): 323-329.
19. Fairman HS, Brill MH. The Principal Components of Reflectances. *Color Res Appl.* 2004; 29(2): 104-110.
20. Dupont D. Study of the reconstruction of reflectance curves based on tristimulus values: Comparison of methods of optimization. *Color Res Appl.* 2002; 27(2): 88-99.

21. Myrick ML, Simcock MN, Baranowski M, Brooke H, Morgan SL, McCutcheon JN. The Kubelka-Munk diffuse reflectance formula revisited. *Appl Spectrosc Rev.* 2011; 46(2): 140-165
22. Džimbeg-malčić V, Barbarić-mikočević Ž, Itrić K. Kubelka-Munk theory in describing optical properties of paper (I). *Technical Gazette* 2011; 18(I): 117-124.
23. de Oliveira HJS, de Almeida PL, Sampaio BA, et al. A handheld smartphone-controlled spectrophotometer based on hue to wavelength conversion for molecular absorption and emission measurements. *Sensors Actuators, B Chem.* 2017 ;238: 1084-1091.

7. Anexos

7.1. Reconstrucción de espectros.

Para la realización de esta parte se ha consultado, además de los trabajos citados, la web de Bruce Justin Lindbloom (<http://www.brucelindbloom.com>) y especialmente su apartado "Maths". Consultado los meses de febrero a julio de 2018.

Se han usado diferentes métodos para la recuperación del espectro de reflectancia. Matemáticamente, podemos expresar el problema como:

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = (M)^T \cdot R(\lambda)$$

Donde M es una matriz de 3 columnas, cada una es el producto de la función de iluminación ($I(\lambda)$) y la función $\bar{x}(\lambda)$, $\bar{y}(\lambda)$ o $\bar{z}(\lambda)$. Cada fila es una longitud de onda, entre 400 y 700 nm. Se han tomado datos cada 10 nm, por lo que la matriz resultante es (31x3).

Para todos estos cálculos se ha utilizado Excel 2016, especialmente la herramienta Solver para resolver sistemas complejos no lineales, y el modo de desarrollador, con el que programar diferentes módulos en Visual Basic que faciliten la resolución de los diferentes cálculos. Si bien se puede utilizar cualquier iluminante tabulado por CIE, solo se ha trabajado con el iluminante D65.

Método Pinv

Al ser M una matriz no cuadrada, no se puede calcular su inversa para despejar la función de reflectancia, por lo que se puede utilizar la pseudo-inversa de Moore-Penrose. Utilizando la matriz transpuesta obtenemos una matriz cuadrada, y por tanto invertible, que se multiplica por la propia matriz, consiguiendo así la pseudo-inversión.¹³

$$R(\lambda) = (M^T \cdot M)^{-1} \cdot M \cdot \begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix}$$

Método Pinv-PCA

$$R(\lambda) = V_0(\lambda) + C_1 V_1(\lambda) + C_2 V_2(\lambda) + C_3 V_3(\lambda)$$

Considerando que podemos aproximar la función de reflectancia a una combinación lineal de funciones dependientes de la longitud de onda, podemos construir una matriz C (1x3) de coeficientes.

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = (M) \cdot V_0(\lambda) + (c_1 \quad c_2 \quad c_3) \cdot (M) \cdot (V)$$
$$(c_1 \quad c_2 \quad c_3) = (M^T \cdot V)^{-1} \left(\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} - M^T \cdot V_0(\lambda) \right)$$

Resolvemos el sistema para determinar dichos coeficientes y calculamos la función $R(\lambda)$. Las funciones $V_i(\lambda)$ están tabuladas en el trabajo citado de XXXX (13).

Método Hawkyard (método iterativo)

Calculamos de forma iterativa $R(\lambda)$ comenzando con los valores XYZ medidos, que son también usados como referencia. A partir de $R(\lambda)$ estimamos unos nuevos valores XYZ y repetimos este proceso hasta que $\Delta X, \Delta Y, \Delta Z$ sean menores a 0,01. ²²

$$R(\lambda) = \frac{X_{it} \cdot \bar{x}(\lambda) \cdot I(\lambda) + Y_{it} \cdot \bar{y}(\lambda) \cdot I(\lambda) + Z_{it} \cdot \bar{z}(\lambda) \cdot I(\lambda)}{\bar{x}(\lambda) \cdot I(\lambda) + \bar{y}(\lambda) \cdot I(\lambda) + \bar{z}(\lambda) \cdot I(\lambda)}$$

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix}_{it} = M^T \cdot R(\lambda)$$

$$\Delta X = X_{it} - X_{ref} \quad X_{it} = X_{ref} - \Delta X$$

$$\Delta Y = Y_{it} - Y_{ref} \quad Y_{it} = Y_{ref} - \Delta Y$$

$$\Delta Z = Z_{it} - Z_{ref} \quad Z_{it} = Z_{ref} - \Delta Z$$

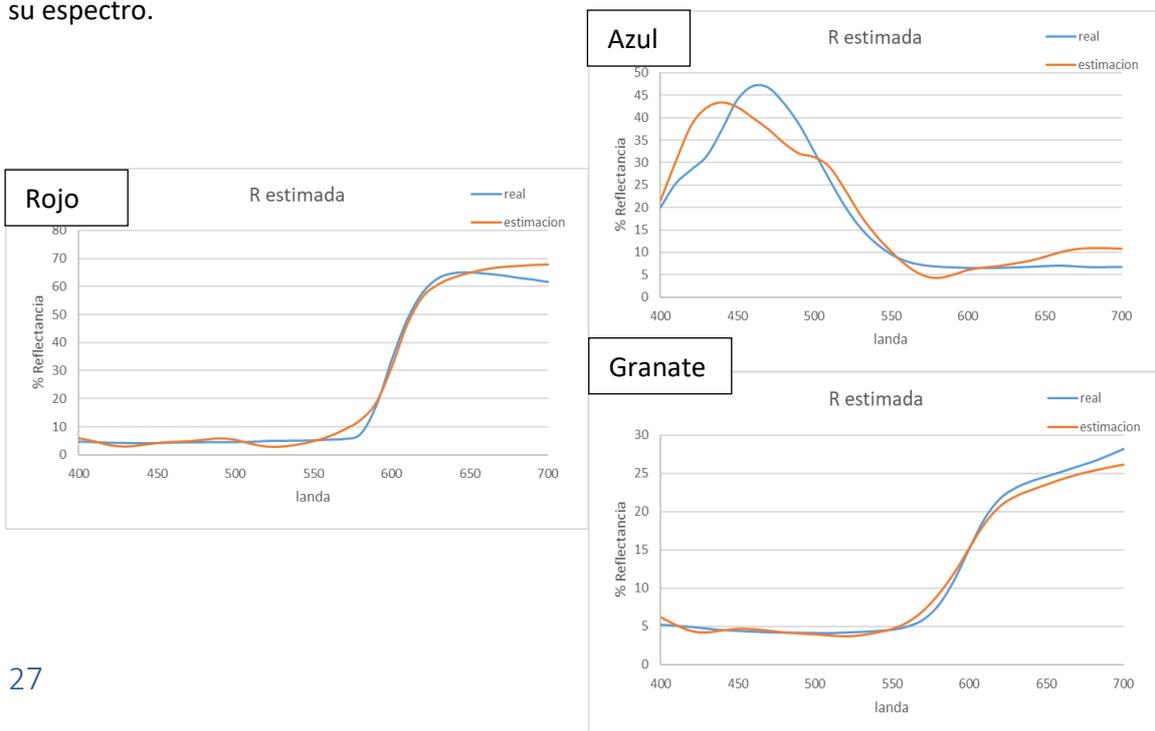
Combinación aditiva de colores primarios y secundarios.

Se utilizan los espectros de reflectancia de los colores primarios (rojo, verde y azul) y secundarios (amarillo, magenta y cian)

$$R(\lambda) = c_1 \cdot r(\lambda) + c_2 \cdot g(\lambda) + c_3 \cdot b(\lambda) + c_4 \cdot y(\lambda) + c_5 \cdot m(\lambda) + c_6 \cdot c(\lambda)$$

Para mejorar un poco esta aproximación se puede añadir blanco, gris y negro.

Combinando estas cuatro aproximaciones obtenemos una estimación del espectro de reflectancia. Esta estimación final se consigue realizando la combinación lineal de las distintas aproximaciones, donde la herramienta solver determina qué aproximación o combinación de ellas minimiza la diferencia entre el vector triestímulo inicial y el final. Esta condición hace que la curva de reflectancia estimada en ocasiones no sea única, pues más de una función es capaz de proporcionar la misma área bajo la curva que la que buscamos estimar para cada componente del vector. Para comprobar el funcionamiento de esta herramienta se han medido los colores sólidos de diferentes piezas en plástico, tanto su vector XYZ en D65 como su espectro.



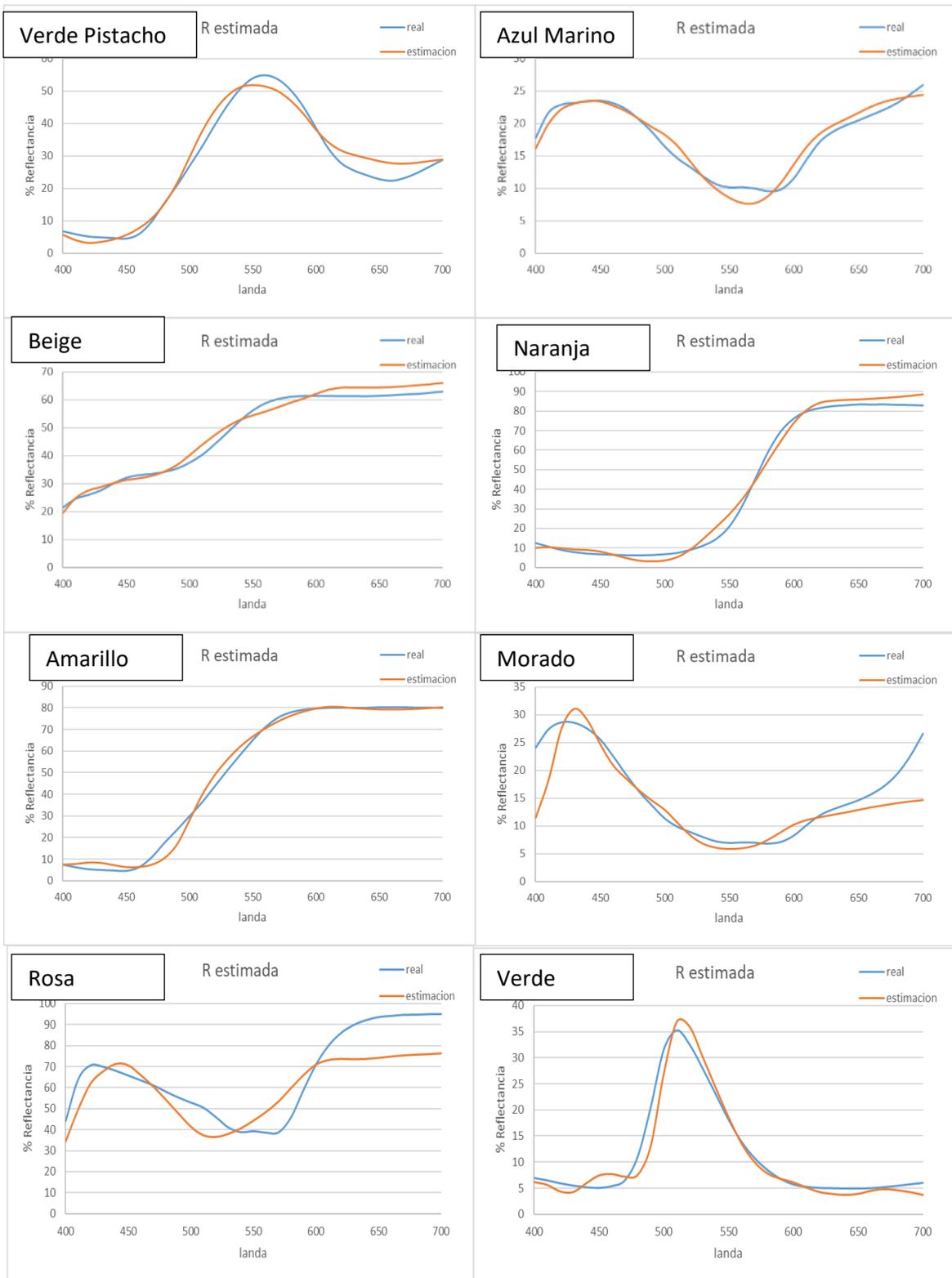


Figura 31. Recuperación de espectros de los colores de diferentes piezas de Lego.

7.2. Tratamiento digital de las fotografías.

Para la toma de las fotografías se ha utilizado una Nikon D3000, controlada desde el PC mediante el software digiCamControl. Con este programa se controla la velocidad de disparo, la apertura de obturador, la sensibilidad a la luz (ISO) o el balance de blancos.

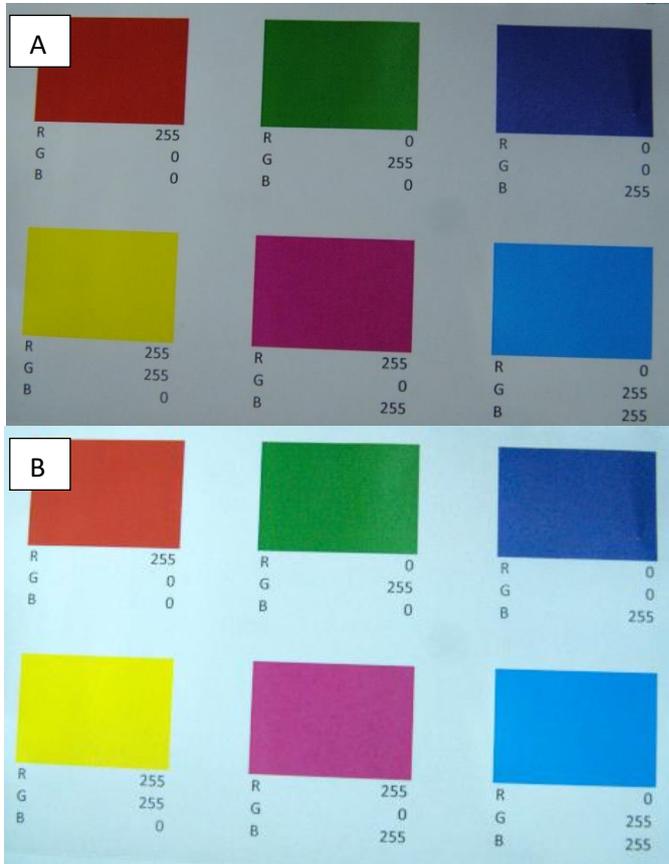


Figura 32. Comparación de la fotografía sin (A) y con máscara (B).

Realizada la fotografía, utilizamos un programa para procesar los archivos .RAW, RawTherapee, con el que se realiza un tratamiento del color, con el fin de realizar una primera corrección de los valores RGB, modificando la temperatura, exposición o la mezcla de canales de los colores.

El perfil de trabajo es sRGB y como perfil de salida se trabaja con sRGB, color space profile.

La Gráfica 32A es imagen sin retocar, 32B la imagen ya retocada. Para obtener los parámetros necesarios en RawTherapee, se ajustan los parámetros del programa (mezclador de canales de color, exposición, temperatura, etc) a aquellos valores que hagan que los valores de RGB de los colores de la foto sean lo más similares posibles a los

valores obtenidos con el espectrofotómetro con el iluminante D65.

Una vez se han obtenido los valores RGB de la fotografía retocada, dividimos por 255 para obtener el vector en el rango de 0 a 1. Dentro del procesamiento de señales, para mejorar la transmisión de las mismas en canales limitados, se usa la "compansión" (companding), donde se realizan dos procesos, compresión y expansión. En el caso que nos ocupa, para recuperar el vector lineal hay que invertir este proceso. Dado que usamos una compansión sRGB:

$$v = \begin{cases} \frac{V}{12'92} & \text{si } V \leq 0'04045 \\ \left(\frac{V + 0'055}{1'055} \right)^{2,4} & \text{si } V > 0'04045 \end{cases}$$

Siendo V la compansión RGB en el rango 0-1, y v el vector lineal rgb.

De forma general, para transformar un vector triestímulo en otro es necesaria una matriz de transformación (Tabla 9). Este procedimiento sirve para cambiar entre RGB y XYZ o para cambiar los vectores XYZ entre distintos iluminantes.

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = (M) \cdot \begin{pmatrix} r \\ g \\ b \end{pmatrix}$$

Espacio RGB	Blanco de referencia	RGB a XYZ (M)		
sRGB	D65	0'4124564	0'3575761	0'1804375
		0'2126729	0'7151522	0'0721750
		0,0193339	0'1191920	0'9503041

Tabla 9. Matriz de conversión de sRGB a CIE XYZ D65

Los valores obtenidos tienen cierta desviación, por lo que podemos construir una segunda matriz que minimice la diferencia entre los valores calculados y los valores medidos con el espectrofotómetro (Tabla 10).

$$(M')^T = \begin{pmatrix} 1,066512 & -0,069704 & 0,032690 \\ -0,028275 & 0,900701 & 0,137988 \\ -0,056488 & 0,026504 & 1,022747 \end{pmatrix}$$

color	Referencias			Diferencia neta			Calculados		
	X	Y	Z	ΔX	ΔY	ΔZ	X	Y	Z
rojo	24,38	15,54	5,36	1,00	-1,00	-1,00	25,38	14,54	4,36
verde	11,06	19,98	7,89	-0,81	-1,81	-0,13	10,25	18,17	7,76
azul	10,87	11,39	33,95	-0,31	0,19	0,00	10,56	11,58	33,95
amarillo	61,18	68,13	9,52	-1,00	1,00	1,00	60,18	69,13	10,52
magenta	28,29	16,97	26,95	-1,97	-0,23	-0,12	26,32	16,74	26,83
cian	25,88	32,81	80,28	1,00	1,00	-0,92	26,88	33,81	79,36

Tabla 10. Comparación de los vectores obtenidos con el espectrofotómetro y la conversión a partir de la

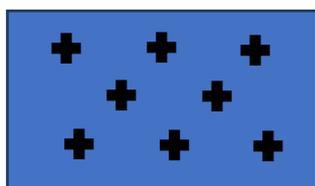


Figura 33. Esquema de puntos de la medida de color.

Sin embargo, un mismo color, por homogénea que sea la luz incidente sobre toda la superficie, presenta cierta varianza (Tabla 11), por lo que el valor de RGB obtenido depende del pixel que se mire (Fig 33). Esto va a conllevar una cierta varianza de esta técnica, que podemos medir mediante los colores de calibración. Sin embargo, esta varianza también va a conllevar que la matriz de conversión final pueda variar entre ensayos, dependiendo de qué puntos RGB se han medido. Se muestra una toma de valores diferente a la ya presentada, incluyendo todos los valores medidos y las desviaciones estándar para un color, el rojo.

		1	2	3	4	5	6	7	8	Media	v (0-1)	v	σ(0-1)	σ (v)
Rojo	R	193	186	190	196	200	202	193	194	194,25	0,7618	0,5410	0,0202	0,0018
	G	69	68	69	72	74	74	74	72	71,50	0,2804	0,0639	0,0098	0,0012
	B	55	55	50	60	50	52	60	49	53,88	0,2113	0,0367	0,0172	0,0016

Tabla 11. Ejemplo de medida de la referencia Rojo.

La matriz es bastante similar a la anterior, pero se diferencian en el segundo o tercer decimal para la mayoría de los valores.

$$(M')^T = \begin{pmatrix} 1,06990 & -0,06442 & 0,03915 \\ -0,12123 & 0,97414 & 0,13923 \\ -0,05634 & 0,02077 & 1,02753 \end{pmatrix}$$

color	Medias			conversión a XYZ D65			Diferencia neta			XYZ D65 10° finales		
	R	G	B	X	Y	Z	ΔX	ΔY	ΔZ	X	Y	Z
rojo	194,25	71,50	53,88	25,26	16,34	5,30	1,80	-1,94	-1,00	26,18	13,60	4,36
verde	21,50	138,38	56,50	10,19	18,74	6,89	-1,10	-2,00	-1,00	9,96	17,98	6,89
azul	28,63	76,50	158,00	9,28	7,96	33,39	-0,14	-0,11	0,00	10,73	11,28	33,95
amarillo	222,50	237,25	0,00	60,64	76,32	11,54	-0,77	0,49	0,50	60,41	68,62	10,02
magenta	175,50	66,38	143,13	24,73	15,10	27,64	-1,72	-1,40	0,37	26,57	15,57	27,32
cian	0,00	146,13	230,00	24,58	26,31	78,63	1,80	0,79	-0,32	27,68	33,60	79,96

Tabla 12. Valores RGB y conversiones a XYZ con la matriz M' y la diferencia respecto del valor de referencia medido con espectrofotómetro.

Si el iluminante utilizado fuera uno de los tabulados por CIE probablemente habría una matriz de conversión de iluminantes LED a D65. Sin embargo, se ha realizado esta aproximación para realizar dicha conversión lo más precisa posible. Como se ve en la Tabla 12 hay colores que se convierten con mayor exactitud (como el azul Fig. 35) y otros que acumulan mayor error (como el rojo Fig. 34 o el verde).



Figura 34. Comparación de: Referencia (A) y conversión (B).



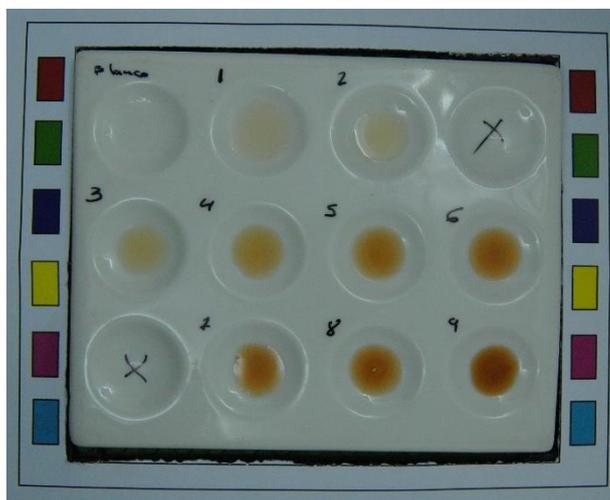
Figura 35. Comparación de: Referencia (A) y conversión (B).

Con la máscara generada en RawTherapee para tratar la imagen digitalmente junto con la segunda matriz de conversión, ambas construidas a partir de los valores de las referencias medidas con el espectrofotómetro, se pueden trabajar los datos de color de las disoluciones para introducirlos en el programa de reconstrucción de espectros. Al realizar la fotografía con las referencias encuadrada, tendremos una manera de comprobar que no han cambiado las condiciones de iluminación u otras variables.

7.3. Tablas y Resultados (completo) para un ensayo.

Se va a utilizar el ensayo Marquis con ibuprofeno para presentar el procedimiento completo junto con los datos que este va mostrando. Como se ha comentado, primero se preparan las disoluciones, se trasvasan a la placa de toques, y a ciertos tiempos (5, 30 y 60 min) se toman datos de color (Tabla 13) tomando una fotografía (Fig. 36) y color a color con el espectrofotómetro, con el que también se registra el espectro.

SCE Reflectometro			
C (mg/mL)	X	Y	Z
0,00	35,01	36,82	33,47
0,58	31,17	31,85	23,89
1,15	27,38	27,71	17,99
2,16	28,15	28,33	18,40
3,02	25,12	24,32	12,41
5,04	19,52	17,75	6,23
6,77	19,11	19,86	4,65
8,93	18,84	16,89	5,02
11,95	17,20	14,84	3,16
16,13	12,54	9,87	0,83



Espectros reconstruidos			
C (mg/mL)	X	Y	Z
0,00	75,08	80,42	90,76
0,58	69,35	72,48	65,05
1,15	70,62	73,40	62,94
2,16	60,13	61,35	45,63
3,02	55,06	53,30	29,42
5,04	47,17	42,93	16,52
6,77	42,04	36,80	14,53
8,93	41,96	37,07	12,94
11,95	39,28	33,19	9,51
16,13	31,22	24,12	6,02

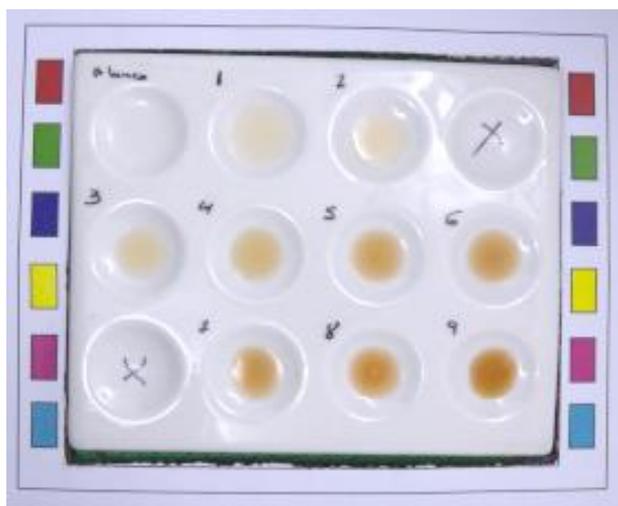


Tabla 13. Espectro medido con espectrofotómetro de Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

Figura 36. Fotografía sin y con tratamiento digital para Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

Primero, los espectros obtenidos con el espectrofotómetro (Tabla 14) se utilizan para realizar la representación Kubelka-Munk en función de la longitud de onda para todas las concentraciones (Tabla 15). Además, se calcula la absorción aparente restando al espectro de cierto color el espectro de una sustancia que no absorba (blanco) que en este caso fue metanol. Este mismo proceso se repite con los espectros estimados a partir de los datos XYZ obtenidos de la fotografía (Tabla 16 y 17).

C (mg/mL)	longitud de onda															
	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
0,00	22,17	24,66	27,59	29,69	30,72	31,35	32,00	32,61	33,33	34,01	34,71	35,22	35,76	36,12	36,55	37,05
0,58	16,06	17,73	19,65	20,94	21,62	22,16	22,70	23,29	24,19	25,09	26,19	27,31	28,63	29,91	31,18	32,44
1,15	11,86	13,14	14,60	15,57	16,06	16,31	16,80	17,66	18,95	20,16	21,48	22,78	24,22	25,59	26,96	28,25
2,16	11,82	13,16	14,71	15,73	16,39	16,94	17,50	18,12	19,14	20,15	21,42	22,79	24,35	25,91	27,45	28,95
3,02	7,64	8,61	9,64	10,32	10,83	11,26	11,86	12,34	13,23	14,18	15,47	16,95	18,79	20,74	22,76	24,80
5,04	3,80	4,28	4,77	5,06	5,30	5,57	5,90	6,20	6,76	7,45	8,45	9,69	11,41	13,37	15,57	17,74
6,77	2,82	3,12	3,43	3,58	3,80	4,07	4,40	4,67	5,26	5,91	6,91	8,18	9,95	12,00	14,21	16,51
8,93	2,89	3,25	3,62	3,85	4,10	4,40	4,77	5,11	5,75	6,44	7,47	8,78	10,47	12,44	14,52	16,66
11,95	1,68	1,91	2,14	2,30	2,46	2,71	2,97	3,25	3,80	4,41	5,32	6,48	8,09	10,00	12,09	14,30
16,13	0,32	0,39	0,49	0,50	0,54	0,65	0,75	0,87	1,10	1,39	1,87	2,58	3,70	5,11	6,83	8,72

	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
0,00	37,49	37,90	38,24	38,57	38,94	39,20	39,34	39,47	39,48	39,50	39,40	39,31	39,10	39,08	38,84
0,58	33,56	34,51	35,29	35,97	36,59	37,10	37,53	37,89	38,10	38,29	38,38	38,43	38,32	38,41	38,28
1,15	29,49	30,60	31,53	32,26	32,98	33,71	34,36	34,88	35,17	35,45	35,67	35,97	36,02	36,18	36,04
2,16	30,31	31,51	32,47	33,30	34,07	34,77	35,30	35,79	36,13	36,48	36,59	36,84	36,82	36,92	36,83
3,02	26,67	28,26	29,64	30,81	31,86	32,84	33,63	34,40	35,01	35,56	35,93	36,34	36,50	36,70	36,72
5,04	19,82	21,65	23,26	24,70	26,04	27,29	28,46	29,58	30,58	31,49	32,30	33,02	33,46	33,91	34,22
6,77	18,75	20,79	22,61	24,32	25,94	27,52	29,06	30,58	31,94	33,21	34,32	35,32	35,96	36,60	37,08
8,93	18,76	20,67	22,40	23,96	25,41	26,87	28,20	29,52	30,72	31,82	32,75	33,59	34,17	34,68	35,09
11,95	16,45	18,45	20,33	22,07	23,72	25,38	27,01	28,58	30,03	31,32	32,54	33,54	34,35	35,03	35,60
16,13	10,70	12,63	14,46	16,21	17,88	19,64	21,39	23,17	24,79	26,39	27,89	29,28	30,33	31,38	32,25

Tabla 14. Espectro medido con espectrofotómetro de Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

C (mg/mL)	longitud de onda															
	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
0,00	1,37	1,15	0,95	0,83	0,78	0,75	0,72	0,70	0,67	0,64	0,61	0,60	0,58	0,56	0,55	0,53
0,58	2,19	1,91	1,64	1,49	1,42	1,37	1,32	1,26	1,19	1,12	1,04	0,97	0,89	0,82	0,76	0,70
1,15	3,28	2,87	2,50	2,29	2,19	2,15	2,06	1,92	1,73	1,58	1,44	1,31	1,19	1,08	0,99	0,91
2,16	3,29	2,87	2,47	2,26	2,13	2,04	1,94	1,85	1,71	1,58	1,44	1,31	1,18	1,06	0,96	0,87
3,02	5,58	4,85	4,23	3,90	3,67	3,50	3,28	3,11	2,85	2,60	2,31	2,03	1,75	1,51	1,31	1,14
5,04	12,18	10,70	9,51	8,91	8,46	8,00	7,50	7,10	6,43	5,75	4,96	4,21	3,44	2,81	2,29	1,91
6,77	16,74	15,04	13,59	12,98	12,18	11,31	10,39	9,73	8,53	7,49	6,27	5,15	4,07	3,23	2,59	2,11
8,93	16,32	14,40	12,83	12,01	11,22	10,39	9,51	8,81	7,72	6,80	5,73	4,74	3,83	3,08	2,52	2,08
11,95	28,77	25,19	22,38	20,75	19,34	17,46	15,85	14,40	12,18	10,36	8,43	6,75	5,22	4,05	3,20	2,57
16,13	155,25	127,21	101,04	99,00	91,60	75,93	65,67	56,48	44,46	34,98	25,75	18,39	12,53	8,81	6,35	4,78

C (mg/mL)	longitud de onda															
	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
0,00	0,52	0,51	0,50	0,49	0,48	0,47	0,47	0,46	0,46	0,46	0,47	0,47	0,47	0,47	0,48	
0,58	0,66	0,62	0,59	0,57	0,55	0,53	0,52	0,51	0,50	0,50	0,49	0,49	0,50	0,49	0,50	
1,15	0,84	0,79	0,74	0,71	0,68	0,65	0,63	0,61	0,60	0,59	0,58	0,57	0,57	0,56	0,57	
2,16	0,80	0,74	0,70	0,67	0,64	0,61	0,59	0,58	0,56	0,55	0,55	0,54	0,54	0,54	0,54	
3,02	1,01	0,91	0,84	0,78	0,73	0,69	0,65	0,63	0,60	0,58	0,57	0,56	0,55	0,55	0,55	
5,04	1,62	1,42	1,27	1,15	1,05	0,97	0,90	0,84	0,79	0,75	0,71	0,68	0,66	0,64	0,63	
6,77	1,76	1,51	1,32	1,18	1,06	0,95	0,87	0,79	0,73	0,67	0,63	0,59	0,57	0,55	0,53	
8,93	1,76	1,52	1,34	1,21	1,09	1,00	0,91	0,84	0,78	0,73	0,69	0,66	0,63	0,62	0,60	
11,95	2,12	1,80	1,56	1,38	1,23	1,10	0,99	0,89	0,82	0,75	0,70	0,66	0,63	0,60	0,58	
16,13	3,73	3,02	2,53	2,17	1,89	1,64	1,44	1,27	1,14	1,03	0,93	0,85	0,80	0,75	0,71	

Tabla 15. Valores Kubelka-Munk, con espectrofotómetro, de Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

	longitud de onda															
C (mg/mL)	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
0,00	43,17	61,69	73,63	79,57	87,39	91,30	88,86	85,20	81,39	78,83	78,87	79,66	80,77	82,18	82,66	82,79
0,58	26,56	37,55	49,24	56,73	64,36	67,06	63,79	59,82	56,23	55,53	60,07	65,48	69,30	72,42	74,70	76,57
1,15	25,29	36,00	47,49	54,84	62,39	65,03	61,69	57,68	54,16	53,67	58,62	64,56	68,98	72,74	75,58	77,95
2,16	18,25	25,92	34,49	39,90	45,39	47,14	44,41	41,33	38,87	39,12	44,11	50,09	54,93	59,24	62,71	65,71
3,02	14,63	19,44	24,31	26,89	29,12	29,34	27,50	25,83	25,05	26,33	30,75	36,24	41,68	47,19	52,04	56,44
5,04	8,31	10,69	13,72	15,40	17,13	17,14	15,20	13,27	12,16	13,32	17,86	23,44	28,76	34,22	39,43	44,51
6,77	7,77	9,80	12,43	13,89	15,43	15,35	13,39	11,33	9,94	10,53	13,88	18,14	22,45	27,16	31,91	36,71
8,93	8,49	10,02	11,79	12,57	13,10	12,68	11,40	10,30	9,95	11,36	15,26	19,85	24,17	28,52	32,75	36,84
11,95	7,63	8,26	8,95	9,21	9,61	9,34	8,28	7,29	6,98	8,25	11,55	15,41	19,21	23,28	27,39	31,49
16,13	7,54	7,37	7,20	6,91	6,68	6,01	4,86	3,77	3,00	3,09	4,16	6,16	9,11	12,86	16,79	20,81

	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
0,00	82,07	81,43	81,14	79,77	78,84	76,53	73,56	70,49	68,60	67,37	66,93	66,77	66,68	66,64	66,79
0,58	77,45	78,24	79,18	78,91	79,39	78,05	75,04	71,47	69,09	67,40	66,61	66,18	65,80	65,60	65,47
1,15	79,27	80,44	81,66	81,49	82,12	80,79	77,57	73,65	70,97	69,03	68,05	67,51	67,08	66,87	66,75
2,16	67,79	69,66	71,45	71,79	72,98	72,29	69,51	65,81	63,17	61,16	60,07	59,48	59,09	58,94	58,90
3,02	60,26	63,95	67,46	69,48	71,95	72,56	70,91	67,98	65,75	63,92	62,86	62,34	62,12	62,18	62,37
5,04	49,18	53,82	58,30	61,44	66,21	69,00	68,05	64,66	61,87	59,49	58,05	57,28	56,83	56,73	56,80
6,77	41,32	46,04	50,74	54,41	59,91	63,65	63,51	60,70	58,30	56,20	54,95	54,28	53,89	53,82	53,89
8,93	40,80	44,93	49,19	53,13	58,76	63,37	64,78	63,82	62,82	61,89	61,41	61,23	61,18	61,35	61,56
11,95	35,67	40,23	45,04	49,78	56,52	62,39	64,71	64,22	63,48	62,71	62,34	62,23	62,23	62,43	62,67
16,13	25,40	30,80	36,83	42,45	47,67	51,18	52,76	52,85	52,66	52,46	52,51	52,74	53,07	53,52	54,04

Tabla 16. Espectro reconstruido a partir del color fotografiado de Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

C (mg/mL)	longitud de onda															
	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
0,00	0,37	0,12	0,05	0,03	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
0,58	1,02	0,52	0,26	0,16	0,10	0,08	0,10	0,13	0,17	0,18	0,13	0,09	0,07	0,05	0,04	0,04
1,15	1,10	0,57	0,29	0,19	0,11	0,09	0,12	0,16	0,19	0,20	0,15	0,10	0,07	0,05	0,04	0,03
2,16	1,83	1,06	0,62	0,45	0,33	0,30	0,35	0,42	0,48	0,47	0,35	0,25	0,18	0,14	0,11	0,09
3,02	2,49	1,67	1,18	0,99	0,86	0,85	0,96	1,06	1,12	1,03	0,78	0,56	0,41	0,30	0,22	0,17
5,04	5,06	3,73	2,71	2,32	2,00	2,00	2,37	2,84	3,17	2,82	1,89	1,25	0,88	0,63	0,47	0,35
6,77	5,47	4,15	3,08	2,67	2,32	2,33	2,80	3,47	4,08	3,80	2,67	1,85	1,34	0,98	0,73	0,55
8,93	4,93	4,04	3,30	3,04	2,88	3,01	3,44	3,91	4,07	3,46	2,35	1,62	1,19	0,90	0,69	0,54
11,95	5,59	5,09	4,63	4,48	4,25	4,40	5,08	5,89	6,19	5,10	3,39	2,32	1,70	1,26	0,96	0,75
16,13	5,67	5,82	5,98	6,27	6,52	7,36	9,30	12,30	15,68	15,21	11,03	7,15	4,53	2,95	2,06	1,51

	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
0,00	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,58	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09
1,15	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,05	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
2,16	0,08	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,07	0,09	0,11	0,12	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14
3,02	0,13	0,10	0,08	0,07	0,05	0,05	0,06	0,08	0,09	0,10	0,11	0,11	0,12	0,12	0,11
5,04	0,26	0,20	0,15	0,12	0,09	0,07	0,08	0,10	0,12	0,14	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16
6,77	0,42	0,32	0,24	0,19	0,13	0,10	0,10	0,13	0,15	0,17	0,18	0,19	0,20	0,20	0,20
8,93	0,43	0,34	0,26	0,21	0,14	0,11	0,10	0,10	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
11,95	0,58	0,44	0,34	0,25	0,17	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
16,13	1,10	0,78	0,54	0,39	0,29	0,23	0,21	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,20	0,20

Tabla 17. Valores Kubelka-Munk, con fotografía, de Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

Con estos valores se construyen las gráficas de las Fig 11-13 para ambos instrumentos. El aumento del porcentaje de luz reflejada en el espectro disminuye fuertemente el valor de Kubelka-Munk obtenido, por lo que, para la fotografía, con menores valores de Kubelka-Munk tendremos menor sensibilidad. De igual forma se construyen dichas graficas (Fig. 37) para los distintos tiempos.

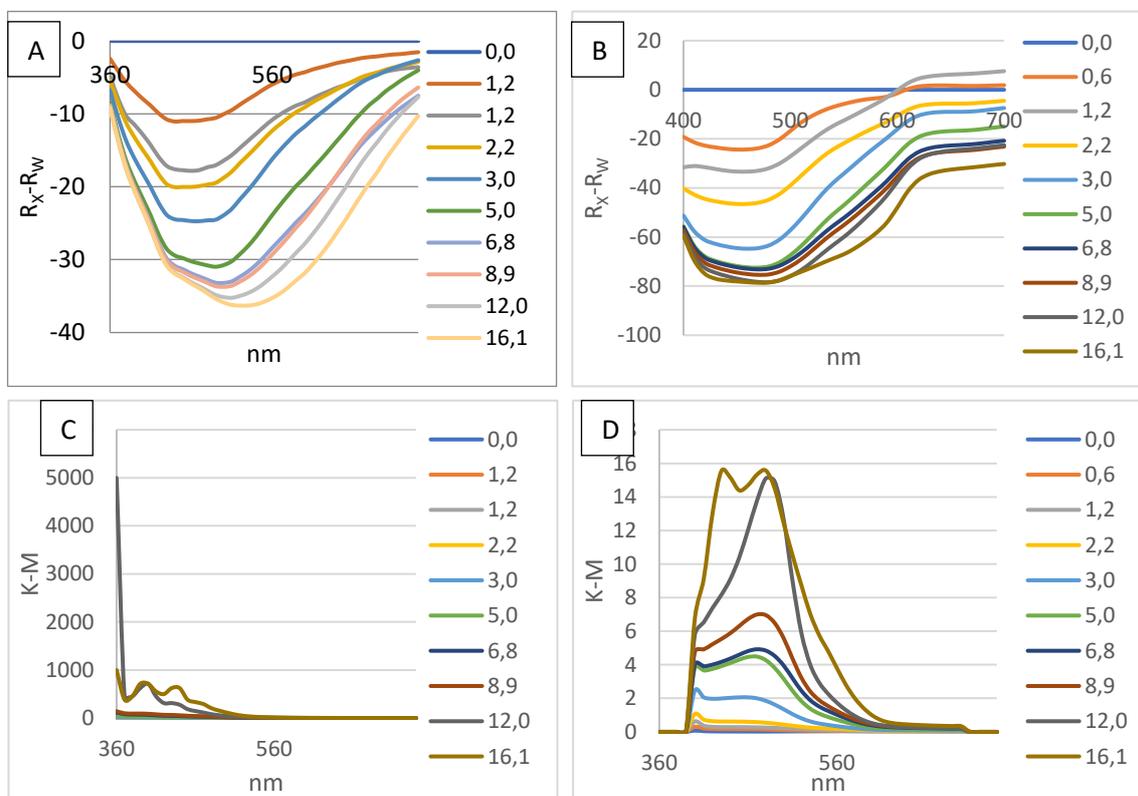


Figura 37. Gráficas de absorción aparente medido con espectrofotómetro (A) y fotografía (B) y gráficas Kubelka-Munk con espectrofotómetro (C) y fotografía (D) Ibuprofeno con el test Marquis a los 5 min.

Los valores de absorción y Kubelka-Munk crecen con el tiempo, tendiendo el valor de este último a infinito en la teoría cuando la intensidad del espectro reflejado es nula. Aunque en la realidad, como el valor mínimo que registra el espectrofotómetro es 0,01 el valor al que tiende Kubelka-Munk es 5000 (Fig 37C).

Si repetimos esta operación para cada tiempo, dado que la absorción se va intensificando en el intervalo de estudio (450-500 nm), la pendiente aumenta en todos los casos, tanto en el espectrómetro como en la fotografía. Si bien la sensibilidad es mayor al medir con el espectrofotómetro la fotografía resulta tener mayor estabilidad en el rango lineal al transcurrir el tiempo, ya que los valores de Kubelka-Munk para la fotografía son mayores, y su variación más progresiva (Fig 38).

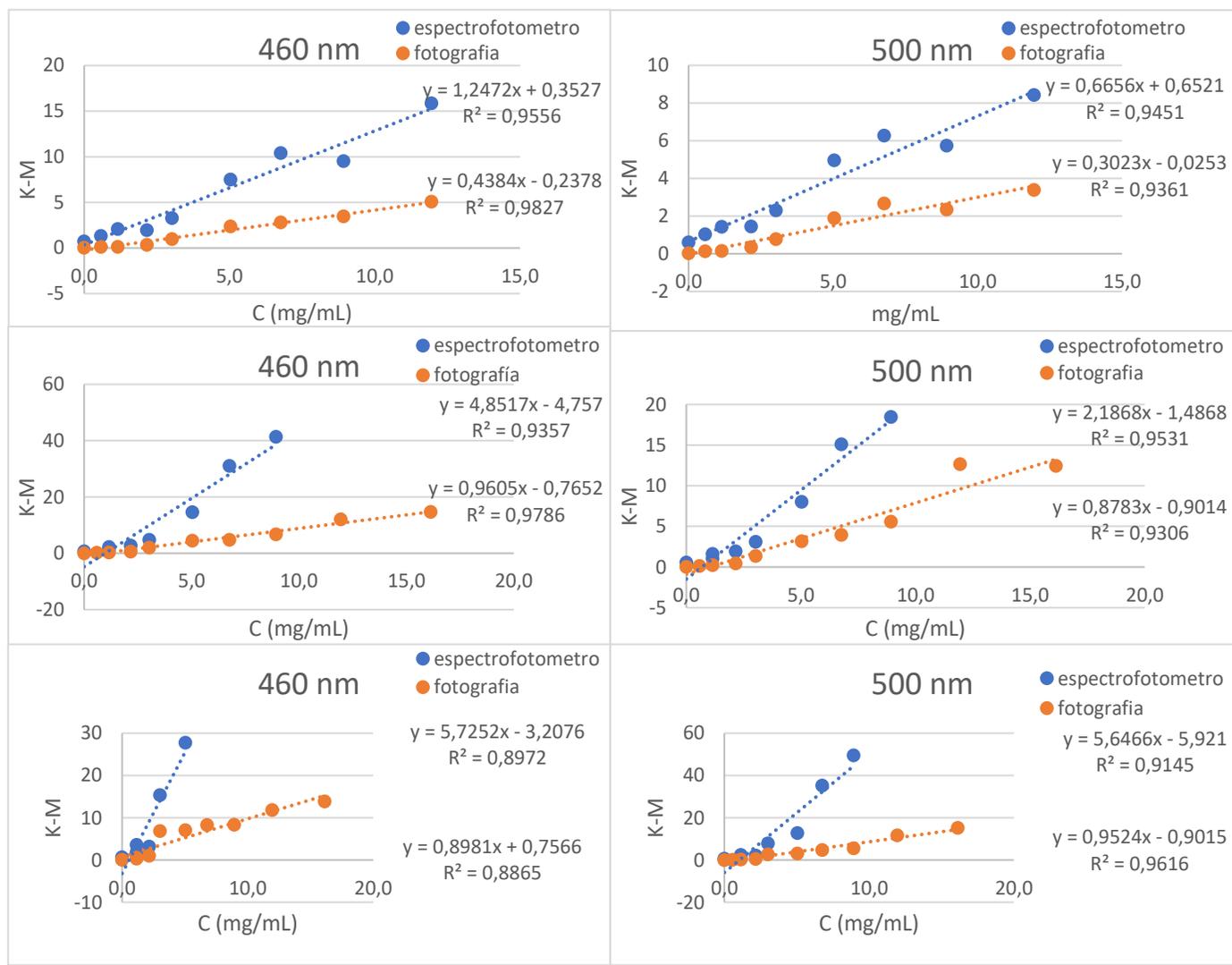
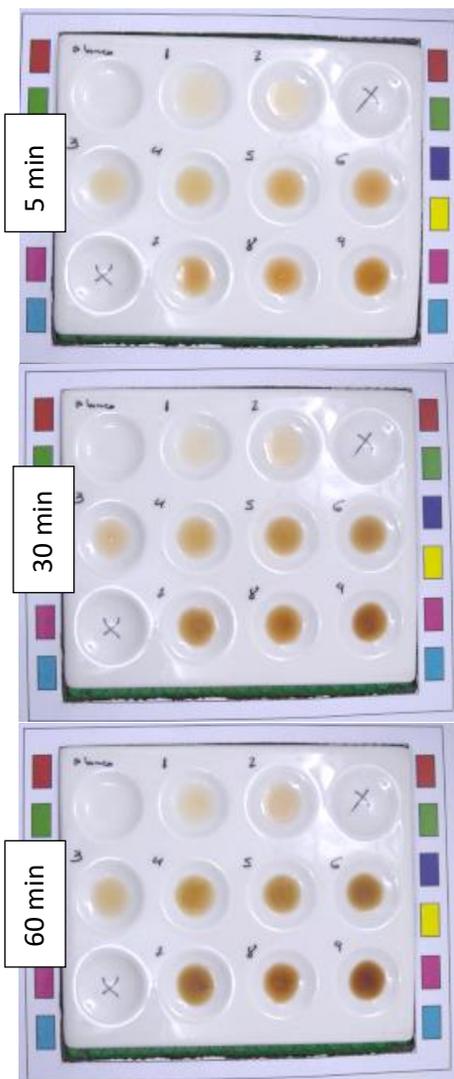
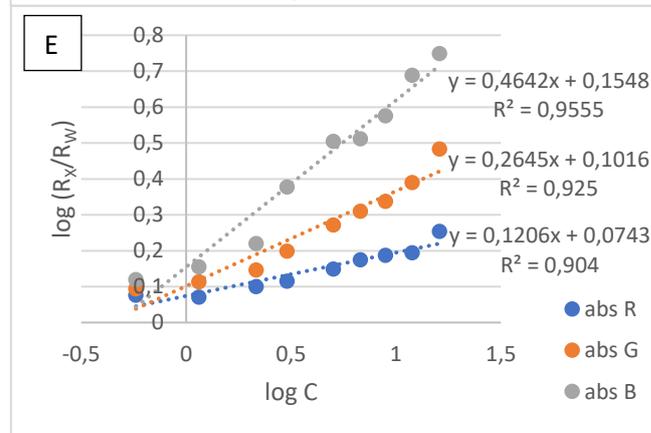
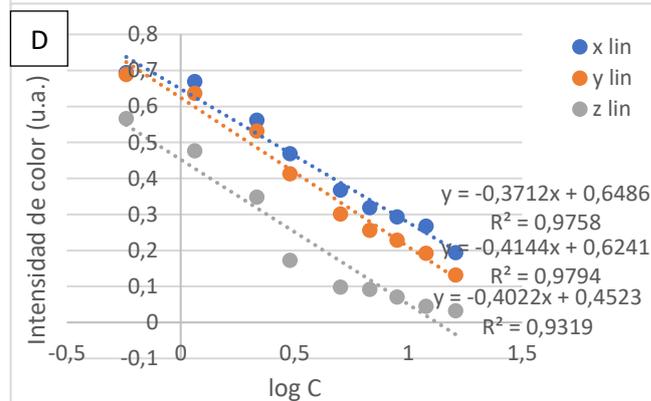
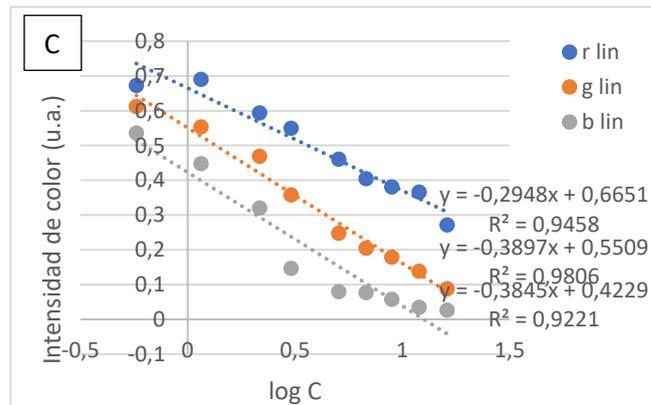
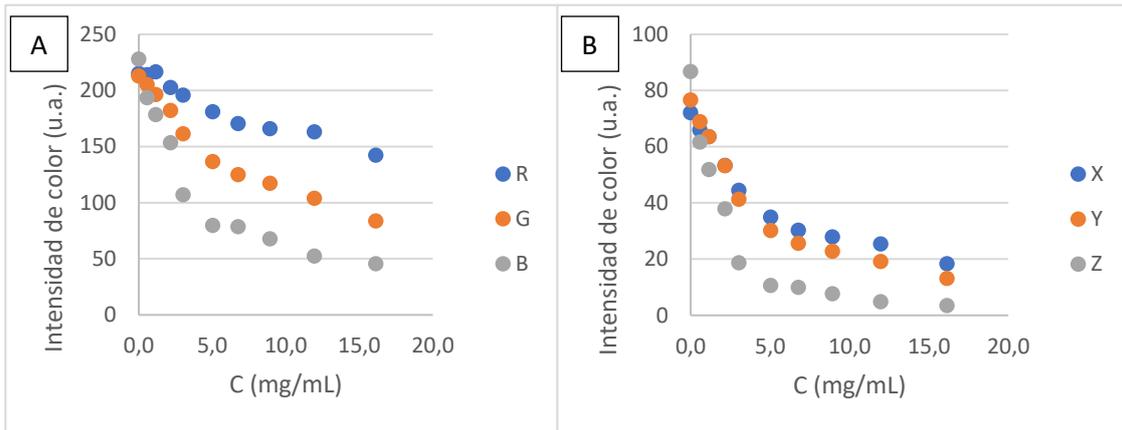


Figura 38. Fotografía tratada digitalmente para los distintos tiempos, así como los rangos lineales obtenidos a las diferentes longitudes de onda.



Representando los vectores de color, en distintos formatos, respecto de la concentración o el logaritmo de esta, encontramos que el paso del tiempo modifica poco, o en todo caso reduce, el rango lineal de estos, siendo siempre más lineales aquellas que trabajan con el logaritmo de la concentración (Fig. 39). También se puede utilizar la absorción respecto de un blanco como forma de linealizar la variación (Fig 39E).

Figura 39. Gráficas RGB vs C (mg/mL) (A), CIE XYZ D65 vs C (mg/mL) (B), rgb (lineal) vs log C (C), xyz (lineal) vs log C (D), Abs RGB vs log C (E).