

INTERPRETACIÓN Y MODELIZACIÓN DE MEDIDAS CROMÁTICAS EN MÉTODOS DE COLORIMETRÍA DE IMAGEN DIGITAL.

Angel López Molinero, Pilar Berlín Larque
Departamento de Química Analítica. Universidad de Zaragoza.

1.-Introducción:

Las actuales tecnologías de la imagen pueden simplificar los métodos analíticos hasta el punto de romper ideas asociados a la necesidad de equipos costosos y sofisticados para alcanzar altos niveles de rendimiento. Su potencialidad se pone de manifiesto en la aplicación de equipos comerciales electrónicos como cámaras digitales, teléfonos inteligentes, tabletas, cámaras web [1] que actúan como instrumentos de medida capaces de dar respuestas rápidas, eficientes y seguras en áreas con gran demanda de análisis. [2].

Estos sistemas aparentan sencillez, pero sus resultados son consecuencia de la concatenación de procesos múltiples y complejos. De modo general, la imagen y su información se obtiene al captar la radiación reflejada por un objeto mediante los dispositivos electrónicos digitales. La radiación reflejada puede ser de tipo difusa y especular, y producida desde la superficie de un objeto tras su iluminación. Las radiaciones resultantes deben de ser seleccionadas, detectadas, medidas, tratadas para generalizar su información desde una presentación inicial en modo mosaico, codificadas, estructuradas, almacenadas y finalmente presentadas en forma perceptible.

En el rendimiento del proceso general anterior destacan algunos componentes. Así los foto-detectores fundamentalmente de tipo CCD y CMOS que además de que transforman la radiación en corriente eléctrica es importante la disposición de sus unidades, píxeles, en distribución plana X-Y. El componente de selección de radiación que aísla rangos discretos de radiación y que se puede presentar en dos configuraciones diferentes: i-preparados como filtros interpuestos o ii- ensamblados a espectrógrafos. Las configuraciones de filtro están muy adaptadas para proporcionar respuesta preferente en la región visible. Se presentan sobre puestos a los píxeles, con tres filtros de color en una distribución determinada (tipo Bayer). Que permite seleccionar tres rangos de longitud de onda característicos de los colores rojo, verde y azul con anchos de banda en el orden de 100-150 nm. Actualmente, se han publicado nuevas disposiciones que incluyen un cuarto filtro de tipo pancrómico que favorece la amplitud del color [3]. También filtros de paso y corte para diferentes cortes de longitud de onda pueden ser adaptados para seleccionar bandas en la región NIR [4]. La configuración alternativa de selección de onda con espectrógrafos de imagen es de alto coste, pero puede proporcionar rangos de bandas muy estrechos. Valores en el orden de 0.5-5 nm han sido publicadas [5].

El proceso de tratamiento y acondicionamiento de las señales (eléctricas) pasa una etapa de generalización, mediante algoritmos matemáticos, que extiende a toda la matriz (de píxeles) del detector la información de los píxeles individuales y en todos los rangos de radiación seleccionados. Posteriormente, se codifica y almacena. El resultado se presenta como series de matrices numéricas de valores de intensidad de color para cada píxel según su disposición plana X-Y. Siendo (las matrices) ordenadas sobre el eje Z, que representa la longitud de onda (por rangos de los filtros) de radiación seleccionada.

La colorimetría de imagen digital analítica, DIC [6], se basa en información recopilada con filtros de color RGB, en la región del espectro visible. La investigación en este contexto ha crecido significativamente especialmente con el uso de dispositivos portátiles y conectados [2,7] como teléfonos inteligentes. Desde 2010, prácticamente se ha duplicado el número de publicaciones cada dos años que abarcan campos tan diferentes como alimentos, control de formulaciones farmacéuticas, [8,9,10]. Llama la atención la frecuente aparición de revisiones que cubren su evolución [11,12,13].

Desde nuestro punto de vista, son necesarios más estudios teóricos de esta metodología que refuercen su implementación experimental en el campo analítico. Y así este artículo está orientado a exponer las líneas principales que hemos venido trabajando mediante metodologías de análisis multi-variante de las relaciones entre las variables experimentales de los sistemas con la información cromática para obtener una mejor descripción de los procesos analíticos.

Entre los principios se ha trabajado en la caracterización de las influencias y el análisis del cambio en la cromaticidad según las condiciones experimentales. El cambio cromático es un objetivo principal de las implementaciones analíticas y ha sido el argumento clave que hemos tratado en nuestra investigación y que se ha tratado de caracterizar aportando y proponiendo nuevos descriptores.

Así mismo se presentan unos trabajos iniciales sobre la predicción de las respuestas cromáticas digitales basándose en un modelo no determinístico. De modo que pueda orientar a la planificación experimental o/y la justificación de los resultados A la vez que permita aumentar, reforzar la aplicabilidad analítica orientándose a una predicción con mayor selectividad.

2.- Interpretación de las variables cromáticas de un procedimiento analítico.

En un experimento cromático, como la reacción de Ca(II) con el reactivo Glioxal,bis (2-Hidroxy Anilyl), GBHA, en medio alcalino 0.1 M NaOH ,tal como aparece a continuación:



Figura 1. Imagen del experimento.
Ca(II) rango 0-16 mg/lit, GBHA 0.06% m/v, en metanol.

Presenta un crecimiento de color rojo con la concentración de Ca(II).

La Figura presenta las tendencias:

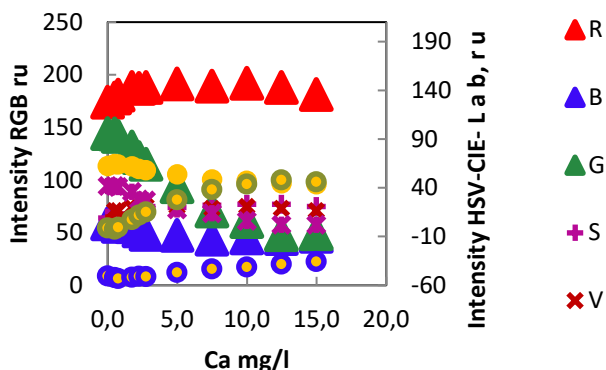


Figura 2: Perfil y tendencia de las variables cromáticas en función del contenido de Ca(II)

La variación de las coordenadas cromáticas primarias RGB, HSV o CIE-Lab medidas en las cubetas puede ser interpretada mediante análisis factorial y análisis con componentes principales, PCAs, para obtener la significación del proceso.

Así la reducción de variables a PCs permite la proyección de las variables cromáticas (a partir de sus cargas) en el mismo plano PC1xPC2 (Figura 2) para compararlas y reconocer sus relaciones.

El resultado mostrado identifica tres tipos de comportamiento cromático: un primer tipo-i- se asigna a colores que disminuyen en el rango dinámico y aparecen a la izquierda del plano PC1xPC2. Son coordenadas: B-H-G-L. Color de tipo ii - de comportamiento opuesto que aumenta sus valores. Están a la derecha del plano y son coordenadas: S-a-b. Un tercer tipo -iii- de parámetros que crecen a bajas concentraciones y luego prácticamente estabilizan sus valores. Son las coordenadas V-R.

El análisis factorial permite identificar variables muy influyentes: 'G', 'H' y 'a', que presentan la mayor varianza cromática o cambio en la intensidad cromática del procedimiento. Además, diferencia entre las variables G

y H de sensibilidad 'negativa' (disminución de color con el Ca(II), mientras que 'a', en proyección opuesta, experimenta un aumento de sensibilidad con el analito.

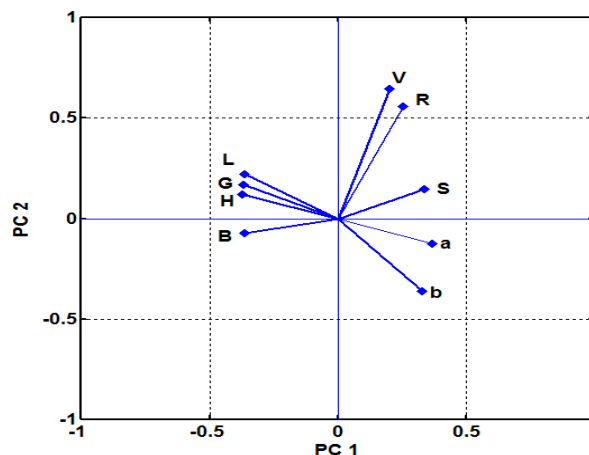


Figura 3: Grafica de las cargas de las variables cromáticas, con iluminación blanca, en el plano PC1xPC2

Este estudio se obtiene bajo una iluminación blanca ('w-cálida' iluminación LED) y establece un criterio para la caracterización y clasificación de las coordenadas cromáticas en base a la varianza (del experimento) que justifican, y por tanto a la posible sensibilidad analítica del método.

3. la varianza como descriptor de la cromaticidad de un experimento analítico cuantitativo.

Se ha propuesto la varianza [14] como descriptor cuantitativo de la información cromática de un sistema analítico. La varianza se define como un parámetro que mide el rango de dispersión de una magnitud (expresada en las unidades de la magnitud elevada al cuadrado). La varianza aplicada en un procedimiento que mide intensidades cromáticas RGB en función del cambio de un analito, expresa la magnitud del cambio cromático total del proceso. Y por tanto representa toda la posible información que pueda ser relacionada en términos analíticos cuantitativos.

Así, para el sistema cromático Ti(IV)- H₂O₂ [14] la información cromática obtenida de las intensidades RGB (para un rango dinámico en H₂O₂) puede ser expresada cuantitativamente por su varianza. Esta, se deduce de la matriz X, varianza-covarianza de las intensidades RGB. Que se compone de n filas, o puntos del experimento dinámico, y 3 columnas, o número de variables cromáticas, bandas de color RGB:

$$X = \begin{bmatrix} x_{1,1} & x_{1,2} & x_{1,3} \\ \dots & \dots & \dots \\ x_{n,1} & x_{n,2} & x_{n,3} \end{bmatrix}$$

Después de centrar cada columna de la matriz X, de la nueva matriz U se deduce la matriz de dispersión o Covarianza-Varianza (X) como:

$$Cov(X) = (U^T U) \frac{1}{(n-1)}$$

Sus elementos diagonales son la varianza, de las variables cromáticas RGB. Su suma total, representa la variación total de color RGB en el experimento cromático. Y, por tanto, es la información total con potencial significado analítico cuantitativo.

Además de la varianza cromática es importante conocer su distribución entre las variables. Se ha demostrado que para una varianza cromática total de 1093 ur², la coordenada B retiene el 86,5%, mientras que R y G lo hacen en el 7,3 y el 6,2%, respectivamente.

Tal y como se ha definido el parámetro permite su uso como descriptor cuantitativo y comparar el experimento en diferentes contextos. Evaluando las condiciones en términos objetivos.

Por otra parte, se presenta como la máxima varianza total del sistema que pueda ser interpretada como parte determinística del procedimiento. Es decir, pueda ser descrita por un modelo de correlación y calibración con el analito.

La cuantificación cromática puede llevarse a cabo con variables cromáticas individuales tal como se ha expuesto o/y también con variables transformadas. Como ejemplo sirven las relaciones: $R/(R+G+B)$, $G/(R+G+B)$ y $B/(R+G+B)$.

Es decir, colores básicos divididos por el color total, T. Además, otras posibilidades de tipo relativo pueden ser también aplicadas. Estas magnitudes son de interés pues pueden mejorar la reproducibilidad y el rango de aplicabilidad.

La aplicación del criterio de la varianza cromática a diferentes variables permite evidenciar la oportunidad del cambio de variables. En este caso se pone de manifiesto que el uso de parámetros relativos disminuye la varianza cromática, y en este caso en un factor de 10⁶. Y además permite distinguir como la varianza se distribuye de forma más homogénea entre los componentes del color. Por tanto, si bien el primer efecto podría no ser determinante para su elección, sí que debe de serlo el segundo.

Así, para las variables relativas: B/T, R/T y G/T se deduce que justifican el 66,0, 22,5 y 11,5% de la varianza total.

Los resultados en este caso muestran que con las variables individuales se presenta la mayor variación cromática y con una distribución heterogénea, intrínseca, entre las variables cromáticas. Lo que generalmente puede suponer una proyección y concentración del cambio sobre una (pocas...) variable. Sin embargo, el uso de parámetros cromáticos relativos disminuye la varianza del sistema y, lo que es muy relevante, favorece una mayor distribución (...) de la cromaticidad. Que puede entenderse como una propiedad menos favorable.

Estos resultados demuestran, desde un punto de vista quimiométrico, la importancia de considerar diferentes aspectos en la elección de las variables cromáticas.

4. Separación de la información subyacente en los parámetros cromáticos.

El estudio cromático mediante análisis factorial y reducción a componentes principales, PCAs, permite reducir el espacio cromático RGB de tres variables a espacios de menor orden. Y por tanto explicar la cromaticidad reduciendo las variables, tal que a PC1. Como se señala en el artículo [6] para el modelo cromático de Ti(IV)-H₂O₂.

Esto implica una concentración de la información que explica un cambio (cromático) significativo. Y por tanto diferenciarla de otra información menos significativa (que explica menor cambio cromático). El razonamiento lleva a señalar entre una información de potencial analítico útil (mayor sensibilidad) de otra de características complementarias. O argumentar en términos de una información determinística (del cambio) frente a informaciones no determinísticas.

El estudio de la información cromática de un sistema mediante Transformada de Fourier, FT, permite abordar y profundizar en este concepto de información determinística y no determinística.

La FT puede entenderse como una metodología que explica, y calcula, la información de un sistema mediante una transformación a nuevas variables. Así un espacio inicial pasa a ser descrito en términos de Frecuencias. Estas se expresan con pares de coeficientes (pares de series seno y coseno, series de Fourier). En el dominio de frecuencias se puede llevar a cabo la filtración de términos (coeficientes) asociados a alta y baja frecuencia. De modo que los términos de alta frecuencia, que describen información relacionada con el ruido del sistema, se pueden diferenciar de los de baja frecuencia que describen la información más significativa (de mayor cambio).

En relación a la información cromática, los términos de baja modelizan el cambio cromático significativo mientras que los de alta frecuencia describen información analítica no determinista. En consecuencia, mediante la elección (filtrado) de un número apropiado de pares de coeficientes de Fourier (frecuencias) se puede separar y retener la información cromática significativa.

En [15] se describe como a pesar de la baja dimensionalidad de los datos, la cromaticidad RGB descrita en la calibración analítica del sistema Ti(IV)-H₂O₂ puede ser expresada e interpretada por FT mediante distinto número de (pares de) coeficientes. Así, cuando la curva de calibración se recompuso (a valores RGB) con la información parcial de solo 'dos pares' de coeficientes (FT2: término independiente y el primer par de baja frecuencia), se obtiene una calibración significativa para todos los componentes RGB con el analito (Ti(IV)). Lo cual no aparece en el espacio inicial con los valores experimentales RGB.

También se obtiene calibración si se incluyen tres pares, FT3. Y con la inclusión del término FT4 se recompone toda la información inicial del sistema.

Es decir, la compresión hasta FT3 consigue que todas las variables RGB de color tengan correlaciones analíticas

lineales (significativas: pendiente >0) con la concentración, mientras que los datos RGB sin procesar solo presentan correlación lineal con B.

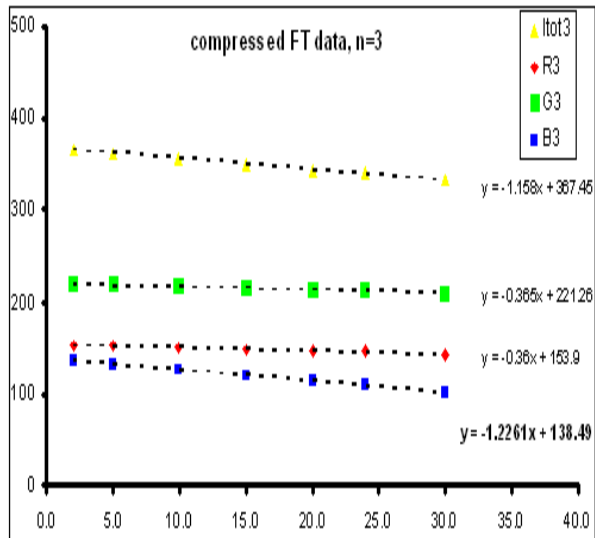
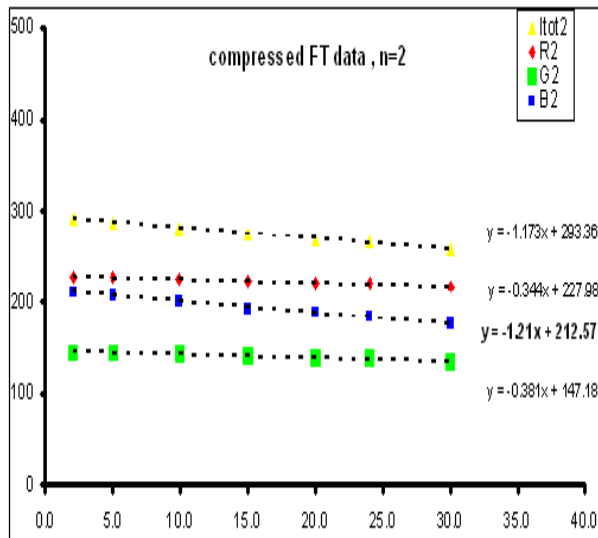
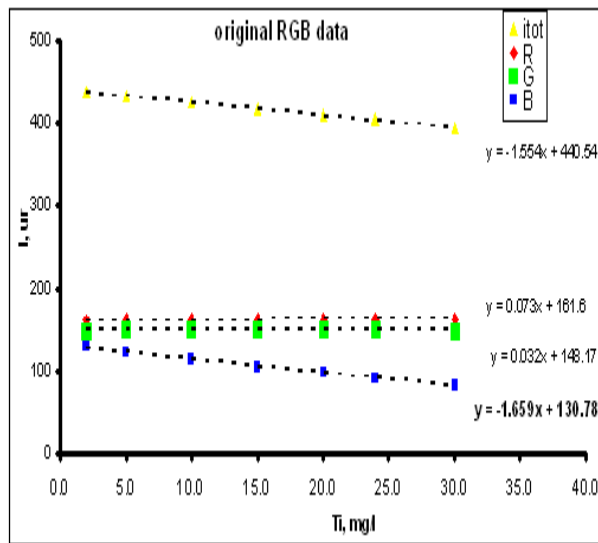


Figura 4: calibración analítica RGB vs Ti(IV) mg/L según el filtrado de pares FT

Por tanto, la compresión separa información analítica significativa de la parte menos determinística de las variables cromáticas del sistema.

5.- Justificación de la cromaticidad dependiente de la iluminación

El cambio cromático del experimento Ca(II)-GBHA puede ser modificado mediante la selección del iluminante.

En la Figura se presentan los valores de varianza cromática según el tono del iluminante: 'w', 'r', 'g', 'b'.

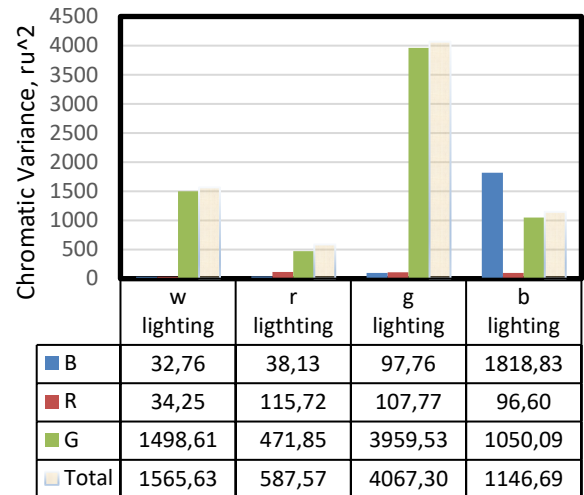


Figura 5: Influencia del iluminante sobre la varianza cromática y su distribución en los colores primarios del espacio RGB.

Los resultados demuestran como la varianza cromática y también su distribución entre las variables pueden ser modificados según el iluminante.

Se evidencia como el cambio de iluminación: $r < b < w < g$ produce un aumento de la varianza cromática. Es decir, el iluminante verde incrementa el cambio cromático y el iluminante rojo lo reduce (respecto a 'w'). Mostrando una relación cromática respecto al menor ('r') de: $1,0 < 2,0 < 2,7 < 6,9$. Esto es, la iluminación verde aporta un cambio cromático 6,9 veces mayor que el obtenido con iluminación roja. Y la iluminación blanca lo produce 2,7 veces mayor. Esta tendencia se mantuvo en los espacios CIE-Lab y HSV.

Además, el cambio de iluminación puede alterar la distribución de colores primarios, en relación a la producida con 'w'. Los gráficos de la Figura 5 muestran que con 'w' los colores G, R, B justificaron respectivamente el 95,7, el 2,2 y el 2,1 % de la variación cromática. Sin embargo, con iluminaciones 'r' y 'b' los colores reflejados R y B pasan a justificar respectivamente el 14,3 y el 62,0 % de la variación cromática. Es decir, se produce una re-distribución de la varianza cromática según el iluminante. En el caso de la iluminación 'g' se mantuvo la distribución producida de la referencia 'w' pero aumentó el valor absoluto de la varianza.

Se encuentra, por lo experimentado con otros casos y en términos generales, el iluminante 'g' puede expandir hasta 3 veces la variación cromática en relación a la que se produce con 'w'.

El espacio RGB, en comparación con CIE-Lab, HSV, origina la mayor variación cromática independientemente del color de iluminación. Por tanto, es el espacio de mayor potencial de sensibilidad analítica (para este modelo cromático elegido).

Se destaca que la distribución en coordenadas HSV era la menos influenciada por la iluminación. Esto se puede interpretar como que es la menos afectada o interferida por el iluminante. Y de modo que la coordenada en este sistema H siempre retuvo la variación cromática más alta.

Como resultados destacados de este estudio cabe señalar: la iluminación verde aumenta la varianza cromática absoluta del experimento en relación con la varianza obtenida con el blanco. La caracterización cromática en coordenadas HSV se mantiene y es menos influenciada por la iluminación.

6. Convolución de señales como modelo de predicción.

Se ha estudiado la modelización de la respuesta cromática RGB de un método DIC mediante convolución de señales. La convolución permite describir como se afecta la señal de entrada de un sistema $I(x)$, para producir la señal de salida $O(x)$, mediante la interposición de una función que se dice de impulso $F(x)$. Así, aplicada en DIC permite describir como la función de entrada, dado por el espectro de Reflectancia o Transmitancia del analito cromogénico $T(\lambda)$ produce la señal de salida como la respuesta o color en los canales $C(\text{RGB})$, a través de la interposición-convolución de las funciones impulso. Estas son, en primer lugar el iluminante $I(\lambda)$ (señal espectral). Y como segundo paso la convolución con la señal del Sensor-Canal de la cámara $S(\lambda)$ (el espectro de sensibilidad de los canales). En este trabajo se aportan los resultados más relevantes obtenidos en la caracterización de las respuestas cromáticas de la reacción $\text{Ca}(\text{II})\text{-GBHA}$. A través de los pasos:

1. Convolución por interposición del iluminante:

Transmitancia $T(\lambda)$ * Iluminante $I(\lambda-v)$:

$T(\lambda) * I(\lambda-v) = T I(\lambda)$. Siendo:

$T(\lambda)$: Espectro de Transmitancia del complejo $\text{Ca}(\text{II})\text{-GBHA}$, rango 400-700 nm. Para las distintas disoluciones (extremo) de calibración: (0) blanco, A1 [1.2 mg/L Ca] y A2 [2.3 mg/L Ca],....

$I(\lambda-v)$: Espectro de emisión del iluminante en su ancho de banda de emisión $(\lambda-v)$ nm

$T I(\lambda)$: Es la señal de la primera convolución, en el rango 400-700 nm. Deducidas para cada disolución: $T_0 I(\lambda)$, $T_1 I(\lambda)$, $T_2 I(\lambda)$, $T \dots I(\lambda)$.

Los resultados para el caso de iluminación con LED blanco-cálido se presentan en la Figura:

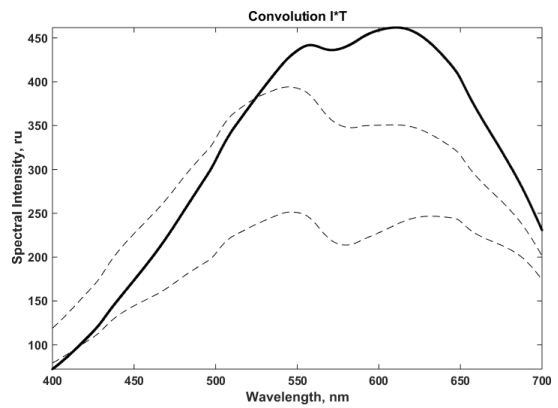


Figura 6: Perfil de Transmitancia de la disolución de blanco, en línea continua, y las disoluciones de 1.2 y 2.3 mg/L $\text{Ca}(\text{II})$ (para mayor claridad) en discontinuas.

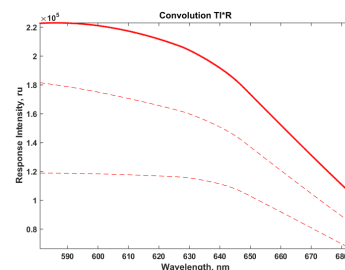
2. Convolución por interposición del (los canales) Sensor para producir la respuesta como color (RGB): $T I(\lambda) * C(\lambda-v) = S(\lambda)$.

Siendo: $T_{0,1,2} I(\lambda)$: señales de previa la convolución, en el rango 400-700 nm. Figura 7.

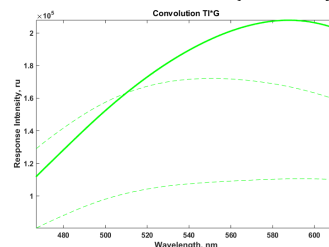
$C(\lambda-v)$: sensibilidad de respuesta de los canales RGB.

Es decir: $\text{CR}(\lambda-v)$: rango 610-750; $\text{CG}(\lambda-v)$: 464-621 y $\text{CB}(\lambda-v)$: rango 400-550 nm;

La respuesta del Sensor, $S(\lambda)$ es obtenida para cada disolución y canal $\text{SR}(\lambda)$, $\text{SG}(\lambda)$, $\text{SB}(\lambda)$: $S_{0,1,2}, R$ (610-750nm), $S_{0,1,2}, G$ (464-621) y $S_{0,1,2}, B$ (400-550).



Canal Verde: $S_{0,1,2}, G$ (464-621)



Canal azul: $S_{0,1,2}, B$ (400-550)

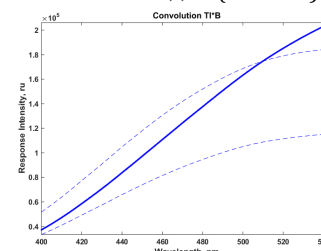


Figura 7: Perfil de respuesta teórica en los Canales RGB, para el modelo Ca-GBHA. Canal Rojo : $S I_{0,1,2} R(610-750nm)$,

Los valores anteriores representan el perfil de señal de los canales y son integrados (y normalizados) para los rangos de cada canal y a la respuesta máxima (255).

La respuesta integrada como color se ofrece para las disoluciones (tipo).

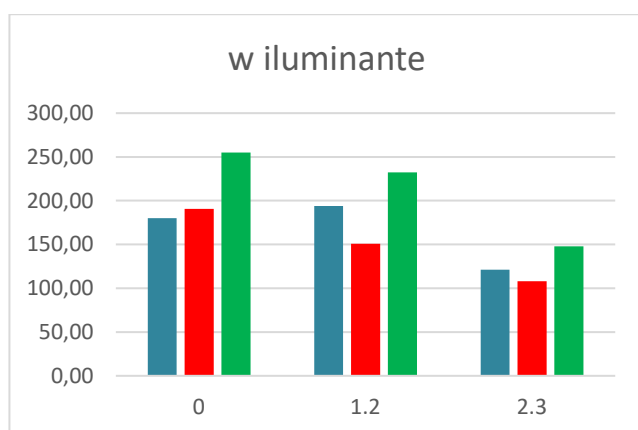


Figura 8: diagrama con la intensidad integrada RGB predicha por el modelo para las disoluciones de: blanco, 1.,2 y 2.3 mg/L en el complejo cromático Ca(II)-GBHA. (según las condiciones de la Figura 1).

Es decir, la predicción de las lecturas de los canales presenta un perfil de decrecimiento en el valor de G y R con la concentración de Ca(II). Lo cual es plenamente coincidente con los valores experimentales. En el valor R hay algo de discrepancia en la predicción del color en la disolución de blanco.

Este modelo también se ha aplicado a la convolución con el uso como iluminante de un LED monocromático de color verde 'g'. Los resultados predichos son plenamente congruentes con los resultados experimentales. Así, estiman el incremento de la respuesta del color reflejado G, y el mantenimiento de las relaciones de distribución con el resto de colores.

Conclusiones.

Se aporta un punto de vista para la significación e interpretación de las señales cromáticas en los métodos DIC. Las metodologías de análisis de componentes principales y transformada de Fourier identifican y permiten destacar la presencia de una información determinística frente a componentes de ruido.

Las nuevas propuestas de caracterización cromática basadas en la consideración de la varianza como descriptor cuantitativo de las medidas introducen un criterio de coherencia para la comparabilidad entre contextos diferentes.

La metodología de convolución de señales supone un primer paso para modelizar la respuesta RGB de los

canales DIC a partir de los espectros de los componentes clave en la generación de la imagen: espectros de Transmitancia del complejo cromático, de emisión del iluminante y de sensibilidad del canal detector.

Bibliografía

- 1.- A. Scheeline *Appl Spectrosc.* **2010**, 64,256A.
- 2.- M. Zarei *TrACs.* **2017**, 91,26.
- 3.- H.Honda, Y.Iida, Y.Egawa, H. Seki. *IEEE Trans. Electron Devices* **2009**, 56,2398
- 4.- W. Nijlanda, R. de Jong, S.M. de Jong, A. Wulder, CW. Bater, NC Coops *Agric. For. Meteorol.* **2014**,184,98.
- 5.- Y. August, M.Oiknine, I.AbuLeil, AS. Abdulhalim *Sci. Rep.* **2016**, 6,23524.
- 6.- A. López-Molinero, D. Liñán, D. Sipiera, R. Falcón *Microchem J.* **2010**,96,380.
- 7.- KE. McCracken, JY Yoon *Anal Methods.* **2016**, 8,6591.
- 8.- A López-Molinero, D. Liñán, D. Sipera, R Falcón P. Calatayud, J.R.Castillo, Comunicacion JAI 2005, Barna 15-17 Nov
- 9.- A. Rico-Yuste, V. González-Vallejo, E. Benito-Peña, E. de las Casas, G. Orellana, MC Moreno-Bondi. *Anal Chem.* **2016**, 88,3959.
- 10.- L. Lahuerta-Zamora, AM. Mellado-Romero *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409,3891.
- 11.- K.Vashist, O. Mudanyali, EM. Schneider, R. Zengerle, A. Ozcandar *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406,3263.
- 12.- LF. Capitan-Vallvey, N. Lopez-Ruiz, A.Martínez-Olmos, MM. Erenas, AI Palma. *Anal Chim Acta.* **2015**, 899,23.
- 13.- P. Cebrián, L. Perez-Sienes, I. Sanz-Vicente, A. López- Molinero, S. De Marcos, J. Galban, *Biosensors*, **2022**, 12, 341
- 14.- A. López -Molinero, J Jiménez-Lamana. *Chemometr. Intell. Lab.* **2016**, 157,29