



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

Diseño y desarrollo de un Ojo Electrónico colorimétrico para el estudio
cualitativo del añejamiento del Tequila

Tesis que presenta

Anais Ivonne Gómez Rocha

para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Director de la Tesis: Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado

Dedicado a:

A mi esposo: Luis Antonio Esparza Carmona, por estar conmigo en los momentos buenos, malos y peores, sobre todo en esas tristezas recónditas, por compartir tantas cosas de la vida conmigo a lo largo de estos años, por tu templanza, tu amor, comprensión, confianza, consejos, y por aceptarme completamente. Estoy muy agradecida por compartir todo esto contigo, tu respaldo lo valoro mucho, y sí, aunque la distancia ha hecho lo suyo, la soledad nos ha transformado para madurar, cometiendo errores, ha habido altas, bajas, más bajas mías, pero esperando que pronto podamos seguir creciendo juntos como equipo, pareja, cómplices, y amigos que somos, apoyándonos para que cada uno cumpla su sueño y continúe realizándose como profesional y como familia. Gracias por darme esa paz, teniendo eso, lo tengo todo. Dedicado con todo el amor, ¡Te Amo♥!

A mis padres: A. Francisco Gómez Herrera y R. Oralia Rocha Alonso, por ser los pilares de mi vida, gracias por su comprensión, cariño, amor y sacrificios; las palabras no me son suficientes para poderles expresar todo mi respeto y amor. Mami gracias por ser quién eres, por ser una mujer admirable, noble y el cual tus enseñanzas estarán siempre conmigo, valoro todo el amor que me has dado desde muy niña. Papá gracias por darme la fortaleza, la valentía y el apoyo incondicional que has hecho siempre, y porque te has convertido en ese Padre que anhelaba tener. A los dos los amo, los honro, pero principalmente gracias por ser mis Padres♥.

A mi abuelo: Isaías Rocha Rangel “Rochita”, por tener la dicha de tenerte todavía conmigo, que aun a la distancia me guardas un amor fraternal. Gracias por todo el amor y apoyo que me has dado, espero que jamás me olvides. ¡Te amo abuelo, eres el mejor!

A mi Tía: Adela Rocha Alonso Por todo el amor desmedido otorgado en estos últimos meses, gracias por escucharme, y estar ahí cuando más te he necesitado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de mis estudios.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) por la oportunidad de pertenecer a una institución de prestigio y permitirme realizar mis estudios de doctorado.

A mi asesor, al Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado le agradezco su orientación y ayuda que me ha brindado, pero sobre todo la dedicación durante todo este tiempo para formar y fortalecer mi carácter, el cual todo su aprendizaje ha servido para ser quien soy, por reiterarme su confianza, por su dirección en el desarrollo de este trabajo, por sus conocimientos y sus invaluable enseñanzas para lograr con éxito el doctorado propuesto, valieron las llamadas de atención para concentrarme en mi objetivo, de verdad valoro todo lo aprendido y lo que ha hecho por mí, pero sobre todo su amistad, todo esto me permitió aprender mucho de usted y decir con orgullo GRACIAS por todo Doc., algún día espero poder retribuirle un poco de lo mucho que ha aportado en mi vida.

A los revisores externos y sinodales, Dr. Lorenzo Leija Salas, Dr. Arturo Vera Hernández, Dra. Rocío Berenice Domínguez Cruz, Dra. Diana Bueno Hernández; al Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado, por su tiempo, correcciones y consejos para mejorar el escrito y la presentación de la tesis.

Al Dr. Arturo Manzo por abrirme las puertas de su laboratorio en ESQIE para continuar con las pruebas faltantes en época de Pandemia y poder realizar con éxito los experimentales.

Para todas aquellas personas agradables que conocí, el cual son una inspiración y soy fan de su trabajo: Dra. Berenice Domínguez, Dra. Diana Bueno, Dra. Raquel Martínez, Dra. Guadalupe Aguilar, Dr. Luis Valdez, y al Dr. Jesús López Barrigete, gracias.

A los que se adelantaron, pero que están presentes en mi memoria: al Dr. Roberto Muñoz Guerrero †, me llevo todas sus experiencias, sus anécdotas, risas, gracias por atender mis dudas, gracias por confiar en mí al inicio de este proyecto, “en su honor Doc”; a mi entrañable amigo Alejandro Pedro Márquez Lázaro †, gracias por esas tardes de risas y charlas divertidas, hay mucha gente que te extraña; y, por último, a mi tío Isaías Rocha Alonso †, gracias por todo el cariño y apoyo otorgado para mi mamá y para mí.

Agradezco en especial a la Dra. Diana Bueno Hernández por su continua asesoría y por todas las veces que atendió mis dudas, donde su disposición fue fundamental para darle dirección al tema y porque se generó una excelente y linda amistad. También agradezco al Dr. Jesús Barriguette por su apoyo claro, directo y sincero en la última fase de la tesis, donde la lejanía no es un obstáculo para recibir su apoyo y donde mi atención debe enfocarse a lo importante, gracias por todo.

A Isabel Wens por darme siempre ánimos y por brindarme material, así como el apoyo en el uso de equipo en otros laboratorios del Cinvestav para la elaboración del proyecto.

Para todos mis amigos de Laboratorio 11, tengo sólo palabras de agradecimiento, ha sido un camino largo y exhaustivo en el que mi determinación por lograr los objetivos me hace olvidar la importancia del contacto humano. Quiero expresar mi agradecimiento especial a Jeniffer por su apoyo, donde la amistad se renovó y el cual se valora lo que de verdad es importante, gracias por ampliar mis horizontes, de verdad muchas gracias por todo tu apoyo mi Jenny; a Jéssica G. por brindarme su amistad y el enlace para lograr una sensatez, donde la responsabilidad afectiva es sustancial para trabajar en ello y sobre eso trabajarlo para ser una mejor persona; Irari, Alexandra y David, gracias por la confianza otorgada, su tiempo de calidad y por todas esas horas de risas, chisme y diversión genuino de “Malcom” en tiempos de estrés, al final me llevo excelentes recuerdos de todos ustedes. Gracias por todo chicos, sigan trabajando y destaquen en ser los mejores. #Lab11Top♥

A mis amigos del CINVESTAV/ESIQIE; aquellos los cuales me toco verlos ingresar y verlos marchar desde el inicio y final de mi etapa, los que son de otros laboratorios, secciones, a todos uds con los que tuve la oportunidad de coincidir, muchas pero muchas gracias (Aurora, Héctor, Eleazar, Miguel, Saraí, Martín, Lorena, Delijorge, Florencio, Frank, Alberto, Rubén, Jhonny,) es evidente que cada uno de ustedes han marcado mi vida, créanme que los quiero a mi manera, y los llevare en el corazón, pero sobre todo agradezco mucho su amistad y comprensión, gracias por hacer más apacible este camino.

A mis amigos de siempre David, Juan Angel, Miguel Angel, Gandhi, Viridiana, Paulina, Yadira, Fabiola, Itzel, Marina, Haydée, Mandy, Paulina y Paty, muchas gracias por estar.

A las secretarias Gina, M^aLuisa, Paty, Mariana, Mónica por su apoyo en los trámites administrativos en todo este tiempo, pero en especial a Paty Peña porque se tuvo la oportunidad de simpatizar para darle difusión a la sección de Bioelectrónica y atraer a jóvenes al panorama de la investigación. A los trabajadores del taller mecánico y circuitos impresos, por toda su ayuda en este tiempo, en las piezas construidas, así como las recomendaciones y sugerencias.

A Dios que me ha dado una familia maravillosa como son mis padres, mi esposo, mi hermano, mi sobrino, mi tía Adelita, mi primo Luis, mi abuelito Rochita, la Fam. Gómez, la Fam. Rocha, la Fam. Esparza Carmona, el cual todos a su manera han estado ahí, donde me ha permitido vivir momentos importantes y especiales en mi vida con ellos y tengo la fortuna de tenerlos todavía conmigo. A nivel mundial transitamos una pandemia y se nos complicó de formas diferentes, para mí el retomar el compromiso profesional fue un reto, pero lo más importante de todo esto, es que me enseñó que por muy difícil que sea el camino de la vida, aun viviendo en soledad y recuperar mi salud, hay que continuar, hay que saber escoger bien las batallas y cuales hay que dejarlas ir, dar todo lo mejor de sí y superarse a sí mismo...Gracias Dios.

Índice

Capítulo 1. Introducción	19
1.1 Introducción	19
1.2 Justificación	23
1.3 Objetivos	25
Objetivos Principal	25
Objetivos específicos	25
1.4 Estructura de la Tesis	27
Capítulo 2. Antecedentes	28
2.1 Caracterización de bebidas espirituosas a partir del color	28
2.2 El Tequila: regulación, clasificación y protección	33
2.3 Base biológica de la visión: la retina	39
2.3.1 Retina y fotorreceptores	40
2.4 Pigmentos visuales y percepción del color	45
2.5 Teoría Tricromática del color	46
2.6 Espacios de color	47
2.7 Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	56
2.8 Sistemas bio-inspirados: Ojo Electrónico	61
2.9 Composición de un OE	62
2.10 Técnicas de Interpretación de Datos	67
2.11 Estado del Arte	79
Capítulo 3. Metodología	87
3.1 Solución propuesta	87
3.2 Prototipo de OE	90
3.3 Etapas experimentales	95
3.4 Modelado de información	105
Capítulo 4. Resultados y Discusión	107
4.1 Caracterización de la fuente de luz del OE	107
4.2 Caracterización colorimétrica del OE	109
4.3 Análisis de muestras destiladas en el OE	113

4.4 Validación del OE con el UV-Vis	121
4.5 Etapa de modelado	124
Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas	151
5.1 Sistema Analítico de Ojo Electrónico	151
5.2 Calibradores de color	152
5.3 Sugerencias para trabajo a futuro	153
5.4 Productos Científicos obtenidos del desarrollo de la tesis	155
Apéndice 1. Diagramas Eléctricos del OE.....	237
Apéndice 2. Histogramas de los patrones colorimétricos	241
Apéndice 3. Histogramas de las muestras de tequila analizadas	245
Apéndice 4. Gráficos de modelos clasificadores KNN.....	254
Apéndice 5. Tablas de confusión de los modelos ANN	259
Referencias.....	263

Índice de figuras

Fig. 1. Maduración de las bebidas destiladas en barricas de roble.....	30
Fig. 2. Denominación de Origen Tequila	34
Fig. 3. Anatomía macroscópica del ojo humano y detalle de la retina [70].	39
Fig. 4. Esquema de representación de las capas de la retina. Las células de salida de la retina son las células ganglionares retinianas, cuyos axones forman los nervios ópticos.	41
Fig. 5. Esquema para los dos tipos de fotorreceptores.....	43
Fig. 6. Distribución espectral de absorbancias normalizadas de los tres tipos de receptores: S, M y L, para diferentes longitudes de onda.....	45
Fig. 7. Mezcla aditiva de los colores.....	47
Fig. 8. Esquema del cubo de color RGB	49
Fig. 9. Esquema que muestra cómo se forman los píxeles de una imagen en color RGB a partir de los píxeles correspondientes de las tres componentes de la imagen.	50
Fig. 10. Modelo CMYK	51
Fig. 11. a) El espacio HSV, el eje negro-blanco (N-B) es una línea punteada que se encuentra verticalmente por el centro del diagrama y los colores se sitúan en la periferia del círculo. b) El espacio HSL, es similar al espacio HSV, salvo que la parte superior consiste en otra forma cónica donde se encuentra el blanco.	53
Fig. 12. Diagrama de cromaticidad CIE. Vista en coordenadas (x, y) donde los números azules que se muestran alrededor del borde de la herradura representan la longitud de onda de 380 nm a 700 nm	54
Fig. 13. Rango de detección del UV-Vis.....	56
Fig. 14. Espectro electromagnético donde se muestra las radiaciones electromagnéticas de diferentes longitudes de onda.....	57
Fig. 15. Energía de la luz incidente al interactuar con las muestras	58
Fig. 16. Espectrofotómetros de absorción típicos. (A) Espectrofotómetro de haz simple y (B) Espectrofotómetro de doble haz.	60

Fig. 17. Estructura esquemática de un OE	62
Fig. 18. Dos posibles geometrías de iluminación: (a) iluminación de anillo, (b). Iluminador difuso.....	63
Fig. 19. Arquitectura de un sensor de imagen CMOS	65
Fig. 20. Ejemplo de adquisición de imágenes digitales. (a) Fuente de iluminación (energía). (b) Una escena. (c) Captura de la imagen. (d) Proyección de la escena en el plano de la imagen. (e) Imagen digitalizada.	66
Fig. 21. Representación de PCA vs LDA.....	71
Fig. 22. Arquitectura de una ANN.....	74
Fig. 23. Resultado del algoritmo KNN que depende en gran medida de la elección del valor k, ejemplo de clasificación cuando k=3. (a) Proceso inicial, (b) Calculo de la distancia y (c) Búsqueda de vecinos y votación de etiquetas.	77
Fig. 24. Diagrama del proceso general del sentido de la vista humano y ojo electrónico (OE)	88
Fig. 25. Diagrama de bloques de la plataforma de OE. (Flecha punteada conexiones internas; Flecha negra control electrónico y transferencia de datos; Flecha amarillo incidencia de luz;)	89
Fig. 26. Esquema de las etapas de la captura, registro y análisis de imágenes del OE	91
Fig. 27. Diagrama a bloques de la interacción entre los dispositivos que componen al OE	93
Fig. 28. Diagrama de flujo de programa de control del OE	94
Fig. 29. Módulo de linterna Huawei utilizado como fuente de luz para el OE	95
Fig. 30. Esquema representativo de la iluminancia en el sistema del OE.....	96
Fig. 31. Calibradores colorimétricos	97
Fig. 32. Configuración del sistema OE: (A) Diagrama Interno del funcionamiento del OE, (B) Diagrama a bloques del sistema OE PRO.....	99
Fig. 33. Selección de ROI de la imagen de muestra de tequila añejo y análisis RGB	102
Fig. 34. Espectrómetro comercial S2100UV+.....	103
Fig. 35. Comparativa OE y Técnica Analítica UV-Vis	104

Fig. 36. Caracterización del LED blanco en un plano de trabajo	108
Fig. 37. Imágenes de calibradores colorimétricos (cámara con ajuste de fabrica) ..	109
Fig. 38. Imágenes de calibradores colorimétricos (cámara ajustada)	109
Fig. 39. Señales en el UV-Vis de los calibradores colorimétricos	112
Fig. 40. Diagrama esquemático del Ojo Electrónico desarrollado mostrando las diferentes partes electrónicas ensambladas y la interfaz de comunicación utilizada.	114
Fig. 41. Imágenes representativas de: (A) Solución en blanco, (B) tequila blanco, (C) tequila reposado y (D) tequila añejo.	115
Fig. 42. Absorbancias Experimentales: (A) Absorbancia promedio por componente RGB; (B) Absorbancia Promedio General	116
Fig. 43. Comparativa de Absorbancia promedio de los componentes RGB para los tipos de tequila	119
Fig. 44. Gráficos de Radar de las muestras de tequila analizadas con sus respectivos valores de absorbancia por componente. (A) Blancos, (B) Reposados y (C) Añejos	120
Fig. 45. Señales obtenidas de las variantes de Tequila utilizando la técnica de UV-Vis	122
Fig. 46. Gráficos de Radar de las muestras obtenidas por el OE y el UV-Vis (345/375)	123
Fig. 47. Gráficos PCA de los 3 primeros componentes obtenidos tras el análisis de las muestras de tequila a partir de la absorbancia RGB del OE.....	125
Fig. 48. Gráfico PCA del UVVIS a longitud de onda de 345 nm. Muestra la varianza total en una sola componente	127
Fig. 49. Gráfico PCA del UVVIS con dos longitudes de onda de 345 nm y 375 nm. Muestra la varianza total en dos componentes.	127
Fig. 50. Gráfico PCA del UVVIS del barrido espectral del UVVIS.....	128
Fig. 51. LDA bidimensional del modelo M1, tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. El centroide de cada clase se muestra con una (x).....	130
Fig. 52. LDA bidimensional del modelo M2. tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. El centroide de cada clase se muestra con una (x).....	131

Fig. 53. LDA bidimensional del modelo M3 tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. El centroide de cada clase se muestra con una (x).....	131
Fig. 54. Gráficos LDA bidimensional del Mod. M4.....	132
Fig. 55. Comparativa de métricas de desempeño usando PCA-LDA.	134
Fig. 56. Comparativa de métricas de desempeño usando PCA-KNN para los modelos programados M1-M4 considerando: (A) k=4 y (B) k=6.....	138
Fig. 57. Estructura de procesamiento y modelado de la red neuronal con el método de validación LOOCV.....	141
Fig. 58. Comparativa del porcentaje de clasificación para todos los modelos.	145
Fig. 59. Valores de kappa para todos los modelos.....	146
Fig. 60. Comparativa de estudios usando la técnica UV-Vis para los tres tipos de Tequila (B=Blanco, R=Reposado y A= Añejo; E1= Estudio realizado por Pérez-Caballero[52], E2= Estudio de esta investigación)	150

Índice de tablas

Tabla 1. Características de las bebidas destiladas añejadas en su proceso de maduración	28
Tabla 2. Técnicas Analíticas utilizadas para la detección del color y en el análisis de colorantes sintéticos y naturales	32
Tabla 3. Clasificación del tipo de Tequila acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación	36
Tabla 4. Variedades permitidas para los Destilados de agave y su normativa	38
Tabla 5. Principales componentes del color en el espacio RGB. (a) El rango de calores [0,255] y (b) El rango de valores [0, 1]	50
Tabla 6. Estudios de color de bebidas alcohólicas y sus diferentes aplicaciones	82
Tabla 7. Resumen de las características de los OE más destacados en bebidas destiladas.....	84
Tabla 8. Instrucciones que permiten ejecutar el dispositivo del OE.....	93
Tabla 9. Relación 10:1 de dos tipos de caucho de silicón para las muestras calibradoras	98
Tabla 10. Clasificación de las botellas de Tequila según el tipo descrito en el etiquetado	100
Tabla 11. Modelos propuestos en diferentes etapas	106
Tabla 12. Parámetros de Iluminación proyectados sobre un area determinada	107
Tabla 13. Componentes RGB obtenidos de la cámara Raspberry Pi V2, antes y después de su ajuste	110
Tabla 14. Absorbancias máximas en el rango de los 345 nm/740 nm.....	111
Tabla 15. Clasificación de las botellas de Tequila según el tipo descrito en el etiquetado	113
Tabla 16. Valores de intensidades y absorciones del componente RGB del OE para las 25 muestras de tequila.	117
Tabla 17. Estrategia de modelado de datos	124
Tabla 18. Información inicial para el análisis de PCA.....	126

Tabla 19. Resultados promedio de clasificación del OE para la discriminación de diferentes muestras de tequila empleando PCA-LDA y sus respectivas métricas de desempeño.	133
Tabla 20. Resultados promedios de kappa empleando PCA-LDA	135
Tabla 21. Resultados promedio de clasificación de los diferentes modelos de clasificación del tequila empleando PCA-KNN y sus respectivas métricas de desempeño para k=4.	137
Tabla 22. Resultados promedio de clasificación de los diferentes modelos de clasificación del tequila empleando PCA-KNN y sus respectivas métricas de desempeño para k=6.	137
Tabla 23. Resultados promedios de kappa empleando PCA-KNN.....	140
Tabla 24. Características de la arquitectura y parámetros entrenamiento de la ANN para la clasificación de muestras de tequila.	142
Tabla 25. Codificación propuesta para las salidas de la ANN	143
Tabla 26. Resultados promedio de clasificación de los diferentes modelos de clasificación del tequila empleando PCA-ANN y sus respectivas métricas de desempeño	143
Tabla 27. Resultados promedios de kappa empleando PCA-ANN para todos los modelos clasificadores propuestos	144
Tabla 28. Comparación del OE con publicaciones representativas sobre la identificación del tequila relacionada con su añejamiento (B=Blanco, R=Reposado y A= Añejo).....	148

Resumen

En el presente trabajo presenta el desarrollo de un Ojo Electrónico cuya operación se fundamenta en la teoría tricromática del color y que es empleado como un sistema analítico capaz de analizar el color. El sistema fue diseñado para la recolección de imágenes digitales de muestras de tequila blanco, reposado y añejo para la identificación cualitativa del añejamiento. El prototipo consta de una instrumentación dedicada basada en una computadora Raspberry Pi y un sensor de imagen CMOS de ocho megapíxeles, que junto con un procesamiento digital de imágenes y un clasificador permite realizar análisis in situ de muestras de interés.

El procesamiento de las imágenes se realiza empleando el espacio de color RGB, para analizar los componentes rojo, verde y azul de los píxeles de la imagen digital. De esta forma es posible evaluar las absorbancias RGB de las imágenes para posteriormente procesarlas empleando el Análisis de Componentes Principales (PCA) con la intención de visualizar la agrupación de las muestras de tequila en las tres clases de interés. Los modelos clasificadores que interpretaron esta información se construyeron con diferentes herramientas tales como el Análisis Discriminante Lineal (LDA), Vecinos más cercanos (KNN) y Redes Neuronales Artificiales (ANNs). El modelado de datos mostró porcentajes de clasificación satisfactorios en todos los casos, aunque con una eficiencia superior para el caso de las ANNs.

Los resultados obtenidos con el OE fueron validados utilizando un espectrómetro comercial UV-Vis con el que se replicaron las etapas experimentales y de modelado. La comparativa entre ambos sistemas demuestra la eficacia del sistema bioinspirado, evidenciando el potencial de este nuevo tipo de tecnologías en el análisis colorimétrico de muestras reales de tequila que puede ser extrapolado al estudio de otros tipos de licores y destilados.

Abstract

This thesis presents the development of an Electronic Eye whose operation is based on the trichromatic theory of color and is used as an analytical system capable of analyzing color. The system was designed to collect digital images of white, reposado, and aged tequila samples for qualitative identification of aging. The prototype consists of dedicated instrumentation based on a Raspberry Pi computer and an 8-megapixel CMOS image sensor. Together with digital image processing and a classifier, it enables on-site analysis of samples of interest.

Image processing is done using the RGB color space to analyze the red, green, and blue components of the pixels in the digital image. In this way, it is possible to evaluate the RGB absorbances of the images to subsequently process them using the Principal Component Analysis (PCA) to visualize the grouping of the tequila samples in the three classes of interest. The classifier models that interpreted this information were built by applying different tools, such as Linear Discriminant Analysis (LDA), Nearest Neighbors (KNN), and Artificial Neural Networks (ANNs). Modeled data show satisfactory classification percentages in all cases, although ANN models achieved high efficiency.

The results obtained with the EO were validated using a commercial UV-Vis spectrometer with which the experimental and modeling steps were replicated. The comparison between both systems demonstrates the effectiveness of the bioinspired system, showing the potential of this new type of technology in the colorimetric analysis of real samples of tequila that can be extrapolated to the study of other types of liquors and distillates.

Abreviaturas

ANN	Redes neuronales artificiales
ANOVA	Análisis de varianza
CA	Análisis de Clúster
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CCF	Cromatografía de capa fina
CE	Electroforesis capilar
CIE XYZ	Espacio de color: Triestímulos de los valores x, y, z
CIE	Comisión Internacional de Iluminación
CIEL*a*b	Espacio de color: luminosidad, a* oscila verde al rojo y b* oscila del azul al amarillo
CMOS	Semiconductor complementario de óxido metálico
CMY	Espacio de color: cian, magenta y amarillo
CMYK	Espacio de color: cian, magenta, amarillo y negro
CNIT	Cámara Nacional de la Industria Tequilera
CRT	Consejo Regulador del Tequila
DO	Denominación de origen
DOT	Denominación de origen del Tequila
EBC	Convención Europea de cerveceros
FAAS	Espectroscopia de absorción atómica de llama
GC-FID	Cromatografía de gases con detección de ionización de llama
GC-IRMS	Cromatografía de gases combinado con espectrometría de masas de relación isotópica de combustión.
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSL	Espacio de color tonalidad, saturación y luminosidad
HS-MS	Acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza a un espectrómetro de masas
HSV	Espacio de color: tonalidad, saturación y valor
IC	Cromatografía iónica

ICP-AES	Plasmones acoplados inductivamente combinado con espectrómetro de emisión atómica
IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
KNN	Vecinos más cercanos
LDA	Análisis discriminante lineal
LOOCV	Validación cruzada de dejar uno fuera
MIR	Infrarrojo medio cercano
MLP-ANN	Redes Neuronales Artificiales de Perceptrón Multicapa
MS	Espectroscopia de masas
NIR	Infrarrojo cercano
NOM	Norma Oficial Mexicana
OE	Ojo Electrónico
PCA	Análisis de componentes principales
PLS	Mínimos cuadrados parciales
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PMMA	Polímero Polimetilmetacrilato
RGB	Espacio de color: rojo, verde y azul
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROI	Región de interés
RP-HPLC	Cromatografía líquida de fase inversa
SNC	Sistema nervioso central
SVM	Máquinas de vector soporte
UV-Vis	Espectroscopía visible
VOC	Compuestos volátiles

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción

La visión tiene lugar cuando la luz es procesada por el ojo y posteriormente interpretada por el cerebro, permitiendo percibir nuestro entorno y responder ante el mismo. Se produce cuando los fotorreceptores del ojo enfocan y detectan la luz visible en la retina [1], esto luego genera un impulso nervioso eléctrico que integra características del entorno relacionadas con la luz, color, forma, tamaño, posición y dimensión.

El ojo humano es capaz de distinguir un millón de colores aproximadamente [2] debido a que la retina posee células especializadas para la percepción del color. La visión en color en las personas es importante porque coadyuva en la identificación de características en los objetos permitiendo recordarlos después, pero también juega un papel fundamental en activar las emociones. Sin embargo, este proceso no se puede asociar a la mayoría de los animales, debido a que poseen sistemas visuales completamente distintos de los humanos y por eso, en el caso de muchas especies, no queda claro cómo perciben la información visual de la naturaleza para guiar su comportamiento [3, 4]

La percepción de colores ha sido clave para comprender muchos problemas fundamentales en la evolución de las especies, pues a través de ella se desarrolla la comunicación entre individuos y se establecen los estados de alerta ante los depredadores [5]. La forma en la que se percibe el color también condiciona la apreciación de los alimentos y por ende inciden en la sensación del sabor y, de esta manera, influyen en el apetito. Por ello, actualmente el estudio del color ha trascendido a sus fundamentos biológicos para ser analizado como un atributo sensorial sumamente importante para la industria alimentaria, al ocupar un lugar predominante en el estudio de la calidad general de los alimentos y bebidas que se consumen. Este hecho, ha ocasionado que la investigación sobre la medición del color de los productos

alimenticios y de algunas bebidas se convierta en un campo de estudio en expansión de alto interés científico y económico.

El estudio del color en las bebidas espirituosas y los vinos es particularmente importante debido a que los cambios de color en ellas se relacionan estrechamente con el proceso de maduración o añejamiento al que se someten. Este proceso de añejamiento es relevante pues a partir de él es posible remover los sabores fuertes provenientes del alcohol puro, al tiempo que se suscitan algunos cambios fisicoquímicos que impactan sustancialmente en los perfiles de color, aroma, sabor, estructura y estabilidad del producto final [6-8].

En México, donde la industria tequilera aporta divisas por 1.3 billones de dólares por concepto de exportaciones [9], el control en la producción del tequila es esencial para garantizar su calidad y denominación de origen (DO). El tequila con DO debe elaborarse siguiendo específicos procesos de destilación, empleando como materia prima agave Tequilana Weber (variedad azul), que se cultiva extensamente en regiones específicas de México [10, 11]. Aunque el producto destilado puede ser directamente envasado para su comercialización, el proceso de añejamiento del tequila le otorga cualidades únicas que lo hacen altamente apreciado en el mercado internacional.

Los cambios del tequila por el proceso de maduración dan como resultado: (1) Reducción de alcoholes superiores debido al carbón presente en las barricas de madera, que actúan como agente adsorbente, suavizando el producto final; (2) Extracción de compuestos complejos de la madera, dando un color y sabor particular; (3) Reacciones entre algunas sustancias presentes en el tequila, dando lugar a nuevos componentes; y (4) Oxidación de compuestos químicos presentes en el tequila y los extraídos de la madera [12]. Al respecto, la mayoría de los estudios enfocados a entender el mecanismo de la maduración del tequila en las barricas se enfocan a analizar en el producto comercializado la presencia de algunos compuestos volátiles (VOC) [13], la cuantificación de ciertos compuestos activos asociados con el aroma

[14] y al estudio relacionado con el aporte de los VOC empleando barricas de roble nuevas [15], al igual que en barricas de roble recicladas/regeneradas [16]. Sin embargo, no existen estudios que analicen directamente los parámetros fisicoquímicos como la tonalidad y el color que adquiere la bebida debidos al tiempo de maduración.

Los diferentes tipos de tequila (joven, reposado y añejo) poseen un color característico que los identifica. Las diferentes tonalidades de amarillo se atribuyen sobre todo al tiempo de maduración en barricas de roble que a su vez les confiere diferentes notas de madera, vainilla y especias tanto al aroma como a su sabor [8]. Estos efectos del añejamiento, también pueden ser enriquecidos con la adición de aditivos específicos como: edulcorantes, colorantes, aromatizantes y/o saborizantes de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Secretaria de Salud Mexicana con el objetivo de intensificar el color, aroma y sabor del producto[11].

De forma convencional, la determinación del color y su asociación con la calidad de los alimentos y bebidas se lleva a cabo mediante complejos métodos instrumentales. Entre los más comunes podemos mencionar a la colorimetría [17] y la espectrofotometría visible [18]. Algunas técnicas analíticas instrumentales tales como la espectroscopia de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN) combinadas con cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases espectrometría de masas de relación isotópica de combustión (GC-IRMS), cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID), espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía iónica (IC), electroforesis capilar (CE), plasmones acoplados inductivamente combinado con espectrómetros de emisión atómica (ICP-AES), acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza a un espectrómetro de masas (HS-MS), espectroscopia UV-visible (UV-Vis), espectrometría Raman, espectroscopia de absorción atómica de llama (FAAS) o métodos electroquímicos [19-22] son ampliamente utilizadas también.

Sin embargo, su uso requiere de sofisticados equipos que necesitan instalaciones especiales que garanticen su correcta operación, un alto gasto de insumos destinados al pretratamiento de muestras, así como prolongados tiempos de análisis que solo se ven compensados por la alta confiabilidad de sus resultados. Una alternativa actual que intenta subsanar estos inconvenientes está asociada con el desarrollo de nuevos sistemas analíticos con inspiración biológica, diseñados para medir la apariencia y color de los alimentos y bebidas de una manera rápida y relativamente simple.

Estos sistemas también conocidos como bio-inspirados [23] representan una nueva perspectiva de la instrumentación analítica basando su funcionamiento en la emulación de alguno de los sentidos de los mamíferos para determinar de manera sensorial características de los alimentos. De entre ellos, el conocido Ojo Electrónico (OE) está ganando cada vez más relevancia en la industria alimentaria debido su capacidad para evaluar a los alimentos a partir de su color, textura y apariencia. Este novedoso métodos instrumental imita la percepción visual humana para medir objetivamente características asociadas al aspecto y color de una muestra de interés, empleando una instrumentación óptica dedicada acoplada con alguna técnica de procesamiento digital de imágenes y/o vídeo [18].

Disponer de nuevos sistemas analíticos como el OE para identificar el añejamiento del tequila y su estrecha relación con el color (analizado a partir de una imagen digital), representa una alternativa factible para realizar análisis objetivos de caracterización de estas muestras sin la necesidad de un estudio analítico tradicional (electroquímico u óptico). Siendo posible establecer un perfil de color similar a una “huella dactilar” que identifique a los diferentes tipos del Tequila.

1.2 Justificación

El tequila es una bebida alcohólica mexicana con Denominación de Origen (DO). Su consumo mundial ocupa el cuarto lugar después del whisky, el vodka y el ron, y tiene una importante presencia en más de 120 países, lo que representa unas ventas de más de 200 millones de litros al año [24]. Por ello, es importante asegurar la autenticidad de esta bebida nacional para garantizar la seguridad de los consumidores. Aunque el Consejo Regulador del Tequila (CRT) está encargado de certificar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana para la elaboración del Tequila, NOM-006-SCFI-2012 [25], la popularidad y demanda del producto ha incrementado su falsificación y la adulteración. La comercialización indebida de bebidas apócrifas causa no solo pérdidas económicas millonarias a la industria tequilera, sino, además, afecta significativamente la reputación del Tequila en México y en el mundo, impactando directamente al consumidor.

Aunque las técnicas analíticas sugeridas por el CRT [22] permiten determinar el origen, composición y presencia de elementos relacionados con la falsificación/adulteración química de bebidas, es indispensable contar con personal altamente calificado, laboratorios especializados con instrumentos de alto costo y efectuar los métodos tradicionales de muestreo (comúnmente costosos en tiempo y dinero) para garantizar una muestra estadística significativa de los lotes de producto que se analicen. También se deben considerar aquellas medidas que garanticen la inalterabilidad de las muestras durante el traslado y posterior pretratamiento pues estos estudios no pueden realizarse *in situ* ya que los instrumentos no son portátiles.

En este tenor, una de las primeras características a distinguir en la apariencia del tequila auténtico, es el color, pues este se adquiere por el proceso de añejamiento dando origen a los diferentes tipos de esta bebida. Típicamente el análisis de color se lleva a cabo empleando métodos ópticos como la colorimetría y la espectrofotometría. Sin embargo, algunos estudios han reportado que es factible determinar el color de bebidas alcohólicas como la cerveza utilizando análisis de imágenes [26, 27]. En estos

trabajos se demostró que el método de análisis de imágenes es altamente repetible con una desviación estándar de cero, por lo que puede ser empleado para analizar el color como un parámetro de calidad importante para la producción de la cerveza.

Bajo esta premisa, sería posible analizar cualitativamente el añejamiento presente en el Tequila a través de evaluar su color mediante el uso de imágenes a fin de contar con una alternativa sencilla de evaluar su autenticación. El presente trabajo tiene por objetivo, establecer los fundamentos de un Ojo Electrónico (OE) que empleando la teoría tricromática del color, permita identificar muestras de tequila de diferentes tipos. El procesamiento de las imágenes necesario se basará en analizar los componentes rojo, verde y azul (RGB) de las imágenes adquiridas. El diseño instrumental del OE estará constituido de elementos básicos como: su propia fuente luz para la iluminación, un receptáculo adecuado para alojar la muestra a analizar y un sensor de imagen que permita la adquisición de la imagen.

1.3 Objetivos

Objetivos Principal

El objetivo principal de esta tesis es establecer los fundamentos necesarios de un ojo electrónico capaz de analizar el color en muestras de tequila con la intención de identificar cualitativamente el añejamiento que da origen a los diferentes tipos de este destilado.

Este sistema analítico fundamentará su operación usando la teoría tricromática del color que combinada con herramientas de procesamiento de imágenes adecuadas permitirá la identificación de los tequilas blanco, reposado y añejo descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012.

Objetivos específicos

- Diseño y construcción de un ojo electrónico, que utilice como fundamento la teoría tricromática del color para la evaluación de las diferentes tonalidades presentes en el tequila considerando las tres principales clases: blanco, reposado y añejo.
- El prototipo electrónico estará constituido por una computadora embebida Raspberry Pi 3B+, una fuente de iluminación basada en un diodo emisor de luz (LED), un módulo de cámara Raspberry Pi V2 con un sensor de imagen CMOS, la infraestructura necesaria para la colocación de las muestras por analizar y una pantalla LCD para el despliegado de resultados. Todo el sistema se gestionará a través de un software dedicado que permita la interacción del usuario con el sistema.
- Construcción de calibradores colorimétricos (filtros) físicos que permitan la caracterización de la respuesta de la cámara CMOS del ojo electrónico.

- Estudiar los diferentes espacios de color que suelen emplearse en el procesamiento de imágenes, con la intención de establecer el más adecuado de acuerdo con la teoría tricromática del color y las especificaciones del formato de captura de las imágenes digitales.
- Integrar un conjunto de muestras de tequila considerando las tres variedades del destilado. Estas muestras deberán contar con denominación de origen calificada y de ser posible el productor disponer del reconocimiento del Consejo Regulador del Tequila. Lo anterior a fin de garantizar su contenido y procedencia.
- Una vez que el ojo electrónico sea calibrado, el estudio del color en las muestras de tequila empleando consistirá en la captura de imágenes digitales, su correspondiente traslado a un espacio de color, para posteriormente evaluar de forma indirecta la absorbancia experimental.
- Para validar la respuesta al color del ojo electrónico, los resultados de él obtenidos se validarán replicando la fase experimental de las muestras de tequila usando un espectrómetro comercial UV-Vis.
- La información de absorbancias experimentales del ojo electrónico y las absorbancias medidas (reales) por el UV-Vis, serán modeladas mediante herramientas inteligentes de procesamiento de datos que permitan la clasificación de las categorías del tequila, mismas que tienen relación directa con el añejamiento de la bebida.
- Una vez comprobada la funcionalidad del ojo electrónico. Realizar una comparativa de desempeño considerando el sistema analítico UV-Vis comercial y algunas otras técnicas reportadas en la literatura a fin de establecer el comportamiento del sistema bioinspirado desarrollado en el análisis del añejamiento presente en muestras reales de tequila.

1.4 Estructura de la Tesis

El presente documento se encuentra dividido en cinco capítulos y dos anexos. En este primer capítulo se describe de manera general la problemática abordada, así como los objetivos perseguidos con la realización de este trabajo.

En el segundo capítulo se abordan los conceptos generales que fundamentaron la propuesta de solución y metodología desarrollados en esta tesis. Se presentan los principios de operación del OE, conceptos teóricos, técnicas analíticas utilizadas y de procesamiento utilizadas, así como el estado del arte actual de éstos en aplicaciones relacionadas la temática.

El tercer capítulo presenta la metodología empleada para el desarrollo experimental de este trabajo, incluyendo la fabricación de calibradores colorimétricos, el diseño del OE y construcción del sistema automatizado, así como el procedimiento experimental para la obtención de las imágenes de las muestras de tequila.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos del análisis de los tequilas seleccionados empleando las herramientas de procesamiento propuestas.

En el quinto y último capítulo se presenta una discusión de los resultados obtenidos a partir de los objetivos planteados en este primer capítulo; así mismo, se exponen los potenciales trabajos a futuro derivados de esta tesis.

Finalmente, se anexan los productos científicos obtenidos.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Caracterización de bebidas espirituosas a partir del color

El inicio de la producción de destilados se remonta al siglo IX con el uso de la herbolaria en los monasterios [28], cuando se requería de extractos y/o aceites esenciales de plantas aromáticas y curativas con fines exclusivamente medicinales. La destilación es una técnica de separación de líquidos por evaporación parcial y posterior recuperación de los vapores desprendidos. El fin de la destilación es concentrar y purificar una sustancia líquida. Su perfeccionamiento a través de los años condujo a la producción artesanal e industrial de bebidas espirituosas. Se considera como bebida espirituosa a aquellas bebidas con contenido alcohólico procedentes de la destilación de materias primas agrícolas tales como la uva, cereales, caña, fruta, etc. Hoy en día, existen numerosos tipos de bebidas destiladas, que se producen mediante diferentes procesos de elaboración. Como se indica en la Tabla 1, algunas de estas bebidas espirituosas suelen madurar en barriles de madera durante períodos específicos para conseguir cualidades organolépticas únicas.

Tabla 1. Características de las bebidas destiladas añejadas en su proceso de maduración

Bebida	Tiempo de maduración	Características organolépticas
Whisky: escocés, irlandés y canadiense	mínimo 3 años	Sabor: floral, frutal seco, dulce, amaderado, especiado, aceitoso, sulfuroso. Aroma: dulces por la presencia de vainilla y compuestos derivados de la barrica [29].
Whisky americano	mínimo 2 años	Color: dorado [30].
Brandies	más de 2 años	Aroma: afrutado, floral, amaderado, tostado, nuez dulce y picante [31]. Color: tonos verdosos hasta el amarillo pajizo, el dorado y el topacio [32].
Cachaça	mínimo 2 años	Sabor: vainilla, especias, floral, amaderado [33]. Aroma: humeado, especiado [34].
Tequila	Reposado: 2 meses; Añejo: 1 año	Sabor: amargo, dulce, salado, picante, ardiente. Aroma: balsámicos, frutal, frutos secos, cítricos, menta, vainilla, especiados, herbales [35]. Color: transparente, amarillo pajizo, ámbar, ocre, oro [35].

En general, todas aquellas bebidas destiladas que son fruto de un proceso de fermentación y destilación que posteriormente pasan por un periodo de maduración, sufren cambios químicos complejos durante su permanencia en las barricas de roble, cerezo o acacia. Durante este tiempo, los componentes de la madera se extraen, otorgándole características organolépticas como el color, que está estrechamente relacionado con el contenido de algunos compuestos fenólicos (conocidos también como polifenoles) [28, 36].

Debido a que su presencia está estrechamente relacionada con el tipo de materia prima con las que fueron elaboradas, los procesos de fermentación y destilado a los que se someten, y finalmente al tipo de material y tiempo empleado para su añejamiento.

Tanto los tipos de polifenoles como sus concentraciones varían entre bebidas espirituosas,

Cuando se emplean barricas de roble, por ejemplo, es posible extraer los compuestos desagradables a partir de la superficie interior carbonizada que absorbe los sabores indeseables como los sulfuros; y para el caso de los compuestos agradables surge a partir del subsuelo tostado el cual se liberan en el aguardiente y se forman en él varios compuestos aromáticos importantes, como los ésteres (ver Fig. 1). Los taninos hidrolizables liberados en el aguardiente promueven reacciones oxidativas como la formación de ésteres entre alcoholes y ácidos [37]. La lignina, que es una de las estructuras de la pared celular de la madera, es un polímero complejo que al oxidarse, libera aldehídos aromáticos (como la vainillina y el coniferilaldehído) en los alcoholes [6]. Los componentes de los taninos, como el ácido gálico y el ácido elágico, aportan astringencia y al oxidarse dan color junto con otros compuestos aromáticos adicionales [37].

Así mismo, algunos componentes fenólicos que también son promovidos por los procesos de degradación y oxidación de la lignina del roble durante el añejamiento son: siringaldehído, sinapinaldehído, ácido siríngico, ácido ferúlico, esculetina,

escopoletina y compuestos furánicos [38]. Los fenoles en general, estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor.

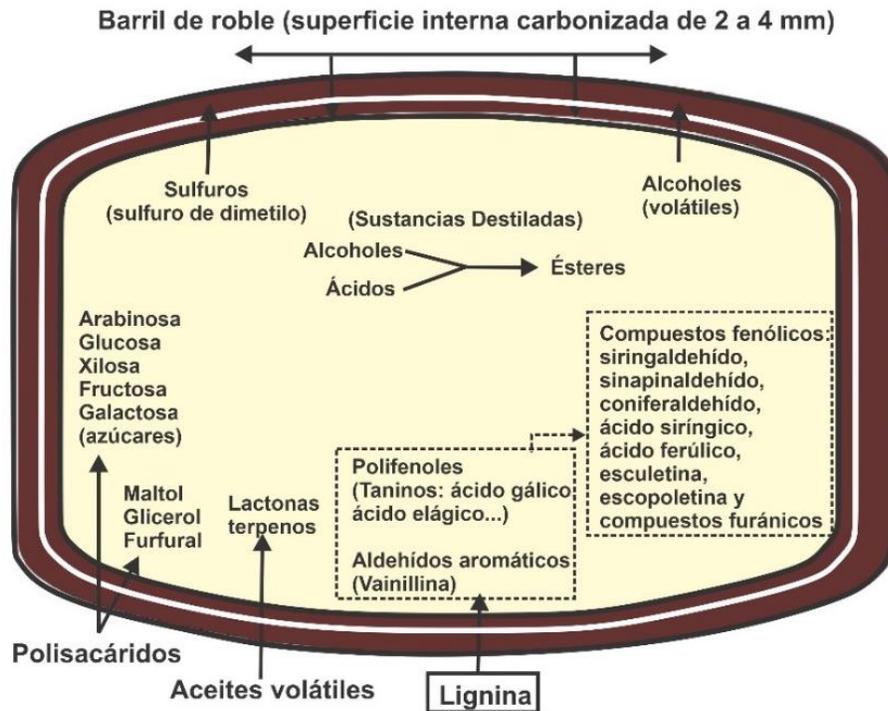


Fig. 1. Maduración de las bebidas destiladas en barricas de roble

Desafortunadamente, los compuestos de origen vegetal mencionados no siempre son la única fuente de color en bebidas como el coñac, brandy, whisky, ron y tequila. Ya que en algunas ocasiones, la normativa permite la posibilidad de agregar pigmentos sintéticos, aditivos o colorantes de caramelo [39].

La prevalencia del uso de pigmentos sintéticos obedece principalmente a que las regulaciones a nivel mundial no son claras del todo y defieren de país a país, aunado a ello, en la mayoría de las ocasiones no existe ningún requisito de etiquetado obligatorio para reportar estos ingredientes al consumidor. Ejemplo de ello es el Reglamento de Información Alimentaria 1169/2011 de la Unión Europea [40], que establece que las bebidas alcohólicas con más de un 1.2% de volumen de alcohol están exentas de reportar la lista obligatoria de ingredientes y de contenido nutricional

[39]. En México, la Secretaría de Salud ha publicado una lista de colorantes permitidos como aditivos en alimentos y bebidas [41]. Dentro de los considerados como legales se encuentra la curcumina, antocianina, diferentes clases de caramelo, amarillo ocazo, azorrubina, beta-caroteno, eritosina, extracto de annato y de cochinilla, tartrazina entre otros más. Todos ellos considerando un límite máximo concentración permitida para cada tipo de producto.

Por ello, la importancia de analizar los colorantes naturales o sintéticos que pueden contener los alimentos (especialmente los licores), ha promovido el desarrollo de diferentes técnicas de “*Análisis sensorial*” [42] con la intención de medir el color. De forma general, este proceso se puede realizar desde dos perspectivas principales: el “*análisis objetivo*” que emplea un análisis instrumental y el “*análisis subjetivo*” en el que se depende en gran medida de interpretaciones que se fundamentan en la experiencia o con la ayuda de referencias.

En el caso del análisis instrumental, aunque existen diferentes sistemas analíticos con capacidad de determinar el color presente en las bebidas. Entre las más difundidas se encuentran: la espectroscopia UV-Visible (UV-Vis), infrarrojo cercano (NIR) y medio infrarrojo combinado (MIR). En la tabla 2 se puede apreciar las técnicas de espectroscopia que se han utilizado para la detección de colorantes en las bebidas destiladas. Sin embargo, es importante considerar que para llevar a cabo el análisis es indispensable llevar a cabo un pretratamiento de la muestra, específico para cada técnica, con la intención de extraer los colorantes contenidos en ella para después ser detectados y cuantificados por la técnica analítica adecuada. En la misma tabla 2, se puede apreciar que la técnica predominante corresponde a la espectroscopía UV-Vis, misma que también puede ser utilizada en combinación con técnicas de cromatografía de gases o de masas.

Finalmente, en lo referente al análisis subjetivo, son quizás el método más simple al determinar el color pues solo se requiere de una inspección visual realizada por un panelista capacitado [43]. Para obtener resultados fiables, los panelistas son

debidamente entrenados para realizar el examen sin la necesidad de requerir ningún equipo analítico especial o la adición de productos químicos para la determinación del color. En este sentido, la toma de decisiones en este método es meramente teórica y se basa simplemente en la opinión o argumento personal brindada a través de la capacidad sensorial de cada panelista. Para estas pruebas, las condiciones de iluminación son un factor crucial, sin embargo, la precisión del color identificado no deja de ser ambigua y no siempre es consistente de un panelista a otro.

Tabla 2. Técnicas Analíticas utilizadas para la detección del color y en el análisis de colorantes sintéticos y naturales

No.	Atributo	Tipo de Producto	Técnica	Ref.
1	Colores estándar (EBC)	Cerveza y bebidas de malta	Reflectometría, GC, Fotometría	[44-46]
2	Colorimetría	Vodka, Whisky, Vino	UV-Vis con fibra óptica	[47]
3	Densidad de Color/Tonalidad	Vinos, Brandy, Coñac, Whisky, destilados de frutas	UV-Vis, NIR, MIR	[48, 49]
4	Colorimetría/ Tonalidad	Vino blanco, rosado y blanco teñido de rosa	UV-Vis	[50]
5		Aguardientes de caña de azúcar		[51]
6		Tequila		[52]
7		Cerveza, Vino blanco, rosado y rojo	UV-Vis con colorímetro	[53]
8	Análisis de colorantes sintéticos	Destilados espirituosos	HPLC, RP-HPLC, GC	[20, 54, 55]
9		Vino, Whisky, Ron, Brandy, Tequila	HPLC /HS-MS con UV-Vis	[56-60]
10		Vinos rojos, destilados, bebidas de malta	Extracción en fase sólida/ CCF	[20, 61]
11		Brandy	GC-FID	[62]

2.2 El Tequila: regulación, clasificación y protección

Como ya se ha mencionado anteriormente, el tequila es considerado la bebida nacional de México, y su historia se remonta a las poblaciones coloniales del actual estado de Jalisco, sin embargo, son cinco las entidades en las que se produce de acuerdo la Denominaciones de Origen (DO) que regula su elaboración. De forma general, la DO tiene como fin resguardar el nombre, regular los componentes y procesos de elaboración de algún producto alimenticio, reseña su calidad, y además proteger la propiedad industrial del mismo. Una DO va asociada siempre a un lugar concreto de un territorio y a las características asociadas a ese sitio geográfico que dan contexto a la calidad y al sentido de propiedades con el cumplimiento de ciertas especificaciones. Por ello, las DO se regulan a través de una serie de reglamentos determinados para su buena puesta en práctica, que incluye el respetar diversos decretos y leyes. Aunado a lo anterior, para que se cumpla todo lo pertinente en la elaboración de un producto con DO, existe la figura de “consejos reguladores” de cada denominación de origen, quienes son los encargados de cumplir todas las pautas que se han establecido.

En el caso de México, estas regulaciones son contempladas en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). El uso ilegal del nombre de un producto con DO mediante usurpación, imitación o el no cumplimiento de los procesos de producción o elaboración de este, es sancionado por la ley. El organismo responsable de emitir y autorizar la protección de una DO en México es el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI). En materia legislativa, existen dos referentes que se encargan de proteger al tequila como un producto único y distintivo: La Denominación de Origen Tequila (DOT) y la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012 [25].

La NOM-006-SCFI-2012 define al tequila como: “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un Productor Autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la Declaración de origen del tequila, derivados de las

Cabezas de Agave de la especie tequilana Weber variedad azul, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos en la presente norma y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío. El Tequila es un líquido que puede tener color, cuando sea madurado, abocado, o añadido de un color específico. El tequila puede ser añadido de edulcorantes, colorantes, aromatizantes y/o saborizantes permitidos por la secretaria de Salud, con objeto de proporcionar o intensifica su color, aroma y/o sabor [25].”

De forma general, el agave azul que se utilice como materia prima para la elaboración de tequila debe ser sido cultivado en el territorio comprendido en la DOT, donde se contempla a ciertos municipios de cinco estados de la República, como se puede ver en la Fig. 2., además de estar inscrito en el registro de Plantación de Predios, el cual debe ser ratificado anualmente por el productor.



Fig. 2. Denominación de Origen Tequila

La NOM-006 que corresponde al tequila, establece dos categorías y cinco clasificaciones de este producto: la primera se refiere al porcentaje de azúcares provenientes del

agave que se establezca en su elaboración y la segunda a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación.

Para la categoría del tequila de acuerdo con el porcentaje de azúcares provenientes del agave se divide en:

- Tequila 100%: Puede ser etiquetado como 100% de agave, 100% puro de agave, %100 agave o 100% puro agave; al final se le puede agregar la palabra azul. Este tequila debe ser elaborado sin añadir azúcares provenientes de otras fuentes ajenas al agave y debe ser envasado en la planta que controle el propio productor autorizado, misma que debe estar ubicada dentro del territorio comprendido en la DOT.
- Tequila: También conocido como tequila mixto, debe ser elaborado con mínimo 51% de azúcares provenientes del Agave Tequilana Weber variedad azul y hasta con 49% de azúcares provenientes de otras fuentes que no sean ningún otro tipo de agave. Puede ser envasado en plantas ajenas a un productor autorizado, siempre y cuando los envasadores cumplan con las condiciones establecidas en la NOM, incluso fuera de la DOT. Para estos tequilas la NOM no especifica alguna leyenda en el etiquetado, salvo la palabra tequila.

Para la clasificación del tequila de acuerdo con las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación ya sea 100% agave o tequila mixto, abarca cinco tipos se puede visualizar en la tabla 3. Los abocantes permitidos por la NOM-006 son color caramelo, extracto natural de roble o encino, glicerina o jarabe a base de azúcar.

Tabla 3. Clasificación del tipo de Tequila acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación

Tipo de Tequila	Descripción
Tequila Blanco o plata.	Producto transparente, incoloro, diluido con agua después de destilación y sin abocante.
Tequila joven o tequila oro.	Producto susceptible de ser abocado. Su contenido alcohólico comercial debe ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de Tequila blanco con Tequilas reposados y/o añejos y/o extra añejo
Tequila Reposado.	Producto que se puede obtener de dos formas: destilado sometido a un proceso de maduración o añejamiento de por lo menos 2 meses en contacto directo con la madera de contenedores de roble o encino, susceptible de ser abocado, cuyo contenido alcohólico comercial debe ajustarse con agua de dilución; o el resultado de las mezclas de tequila reposado con tequilas añejos o extra añejos.
Tequila añejo.	Producto que se puede obtener de dos maneras: mediante un destilado sometido a un proceso de maduración o añejamiento de por lo menos 1 año en contacto directo con la madera de contenedores de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, con contenido alcohólico comercial ajustado con agua de dilución y que puede ser abocado; o el resultado de las mezclas de tequila añejo con tequila extra añejo.
Tequila extra añejo.	Producto sujeto a un proceso de maduración o añejamiento de por lo menos 3 años, en contacto directo con la madera de contenedores de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, con contenido alcohólico comercial ajustado con agua de dilución y que puede ser abocado.

Existen dos instancias públicas y autónomas avaladas por el gobierno federal que tienen la finalidad de proteger la DOT y asegurar el cumplimiento de la NOM para el tequila, al tiempo que también se encargan de promover la cultura de la bebida en el mercado nacional e internacional: el Consejo Regulador del Tequila (CRT) y la Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT). Ambas cumplen con distintas funciones y persiguen objetivos diferentes y son las siguientes:

- Consejo Regulador del Tequila (CRT)

El Consejo Regulador del Tequila A.C. es una organización que, desde 1993, se dedica a verificar y certificar el cumplimiento de la NOM referente al tequila, a salvaguardar la DOT en México y en el extranjero, así como a promover la calidad, la cultura y el prestigio de esta bebida para garantizar su autenticidad.

- Cámara Nacional de La Industria Tequilera (CNIT)

Es la institución líder para representar, promover y defender los intereses generales de la Industria Tequilera y el Tequila. Fundada en el año de 1959 la CNIT es el organismo vigente más antiguo del sector, al cual las empresas se afilian libre y voluntariamente para trabajar de la mano en beneficio del Tequila.

El tequila y su relación con otros destilados de agave

El tequila ha obtenido con los años una distinción en muchos países debido a que es considerado un gran aperitivo o maridaje para acompañar comidas y también para combinarse con otras bebidas. Desafortunadamente, su fama e importancia en el mercado a nivel internacional lo ha hecho vulnerable, pues existen productos que no tienen nada que ver con su naturaleza pero que comparte algunas características con cierto grupo de destilados elaborados con agave. Ya que estas bebidas utilizan como materia alguna otra especie de agave cultivada en zonas de producción con climas semejantes a las DO del tequila, emplean el mismo proceso de elaboración y por tanto producen similares propiedades organolépticas. Por este motivo, al mencionar el tequila en México obliga a repasar, aunque sea brevemente, otros destilados de agave que se ofrecen para tener un panorama completo del mundo del tequila. De todos los destilados de agave relacionados con el tequila, el que le sigue de cerca es el mezcal [63]. En la tabla 4 se muestran bajo que normas están protegidos los destilados de agave y que tipo de variedad de agave se utilizan para su producción.

Tabla 4. Variedades permitidas para los Destilados de agave y su normativa

Destilado	Materia Prima	Normativa
Mezcal	<p>Puede elaborarse a partir de una o distintas variedades de agave [64]: Agave angustifolia(espadín); Agave potatorum(tobalá); Agave tequilana Weber, variedad azul; Agave karwinskii(madrecuixe); Agave mormarata (tepeztate); Agave americana variedad Oaxacensis (sierra negra o arroqueño); Agave cupreata(papalote); Agave duranguensis (cenizo en Durango); Agave americana(serrano); Agave amaericana variedad protoamericana (cenizo de en Tamaulipas) y Agave salmiana (verde o potosino).</p>	NOM-070-SCFI-1994 [65]
Bacanora	Agave vivípara variedad vivípara, conocida en la región como Agave angustifolia Haw.	NOM-168-SCFI-2004 [66]
Sotol	Plantas del género Dasyilirion leiphyllum, Dasyilirion cedrosanum, Dasyilirion durangensis.	NOM-159-SCFI-2004 [67]
Sikua	Agave cupreata o maguey chino	NOM-142-SSA1/SCFI-2014 [68]
Raincilla	<p>Este destilado se produce a partir de varias especies de agave: Agave maximiliana (lechuguilla o pata de mula); Agave inaequidens (bruto o lechuguilla); Agave valenciana/relisero (peligro de extinción); Agave angustifolia (chico Aguiar o amarillo) y el Agave rhodacantha (ixtero amarillo)</p>	El consejo mexicano promotor de la Raincilla busca actualmente que obtenga su DO [63]
Comiteco	Agave americana L. (maguey comiteco)	No tiene DO [63]

2.3 Base biológica de la visión: la retina

El ojo humano también conocido como globo ocular, es un órgano aproximadamente esférico de unos 2,5 cm de diámetro que se comporta como una compleja estructura óptica sensible a las longitudes de onda entre 380 nm y 760 nm [69]. La luz que entra en el ojo se refracta al pasar del aire a través de la interfaz película lagrimal-córnea, posteriormente pasa por la córnea transparente, atraviesa la pupila y el humor acuoso para llegar al cristalino, como se puede ver la Fig. 3.

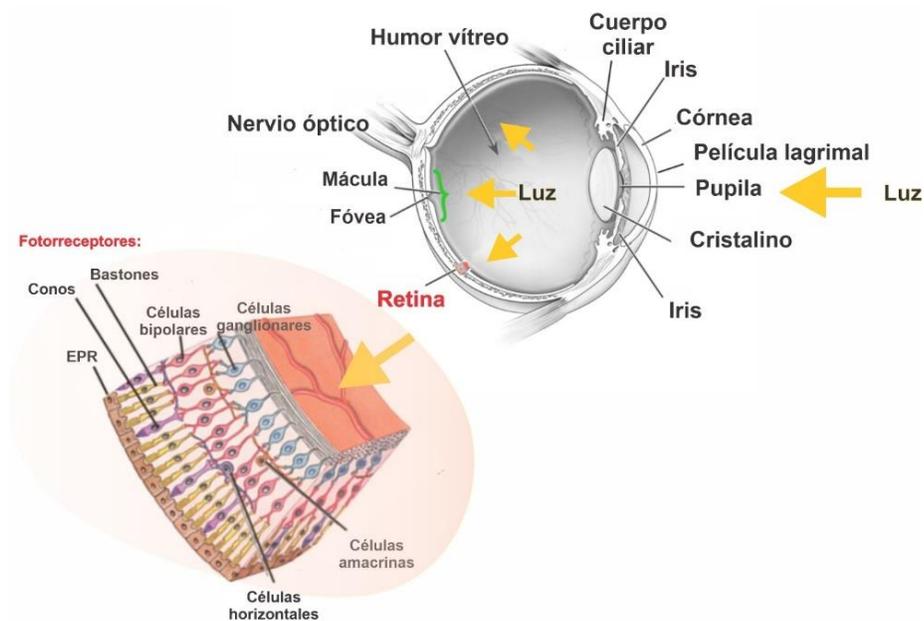


Fig. 3. Anatomía macroscópica del ojo humano y detalle de la retina [70].

Este cristalino enfoca la luz que pasa a través del humor vítreo para llegar a la retina, que es un tejido fino y sensible a la luz que recubre el segmento posterior del ojo. Detrás de la córnea está el iris, el tejido que rodea una abertura redonda llamada pupila. El iris regula la cantidad de luz que pasa controlando el tamaño de la pupila, como el diafragma de una cámara fotográfica. El cuerpo ciliar produce el humor acuoso, el líquido transparente que nutre la córnea y sostiene la pequeña zona de células que mantiene el cristalino en su sitio y altera su forma y grosor en el proceso de la acomodación ocular [69].

La interfaz de la córnea con la película lagrimal junto con el cristalino son los principales componentes refractivos del ojo y actúan conjuntamente como una lente compuesta para proyectar una imagen sobre la retina, que es sensible a la luz. Desde la retina, las señales eléctricas se transmiten a la corteza visual a través de un haz de fibras conocido como nervio óptico. La retina al recibir la imagen enfocada la convierte en un mensaje neurosensorial [69] y se inicia el proceso de la visión. A la retina también se le nombra como “porción neural del ojo”, pues a pesar su ubicación periférica, es en realidad parte del sistema nervioso central (SNC).

2.3.1 Retina y fotorreceptores

La retina funciona como un filtro espacio-temporal [71] muy eficaz que realiza principalmente la adaptación a la luz ambiental, la discriminación de la longitud de onda y el aumento del contraste [72], para finalmente enviar la imagen a través del nervio óptico al cerebro, en donde se realiza el procesamiento complejo de interpretación.

La retina es un epitelio sensorial fotosensible que contiene las células especializadas fotorreceptoras y otros tipos de células que se encuentra en diferentes capas. En principio, dentro de los fotorreceptores se encuentran los conos, que responden a los altos niveles de luminosidad (condiciones fotópicas) y son responsables de la visión a color; y los bastones, que responden a los niveles bajos de iluminación (condiciones escotópicas) sin detalles ni color. Acto seguido están los tipos de células que se encuentran en las capas de la retina: las interneuronas (células bipolares, células horizontales y células amacrinas) y las células ganglionares.

Las señales de estos fotorreceptores son procesadas por los numerosos tipos de células que intervienen en la retina antes de salir hacia el cerebro a través de las células ganglionares y el nervio óptico. Para entender cómo se comportan los fotorreceptores es importante indicar la forma en cómo se encuentran organizadas las

capas de la retina [73]. La Fig. 4 muestra un esquema del orden de las capas de la retina y los grupos celulares relacionadas a ellas.

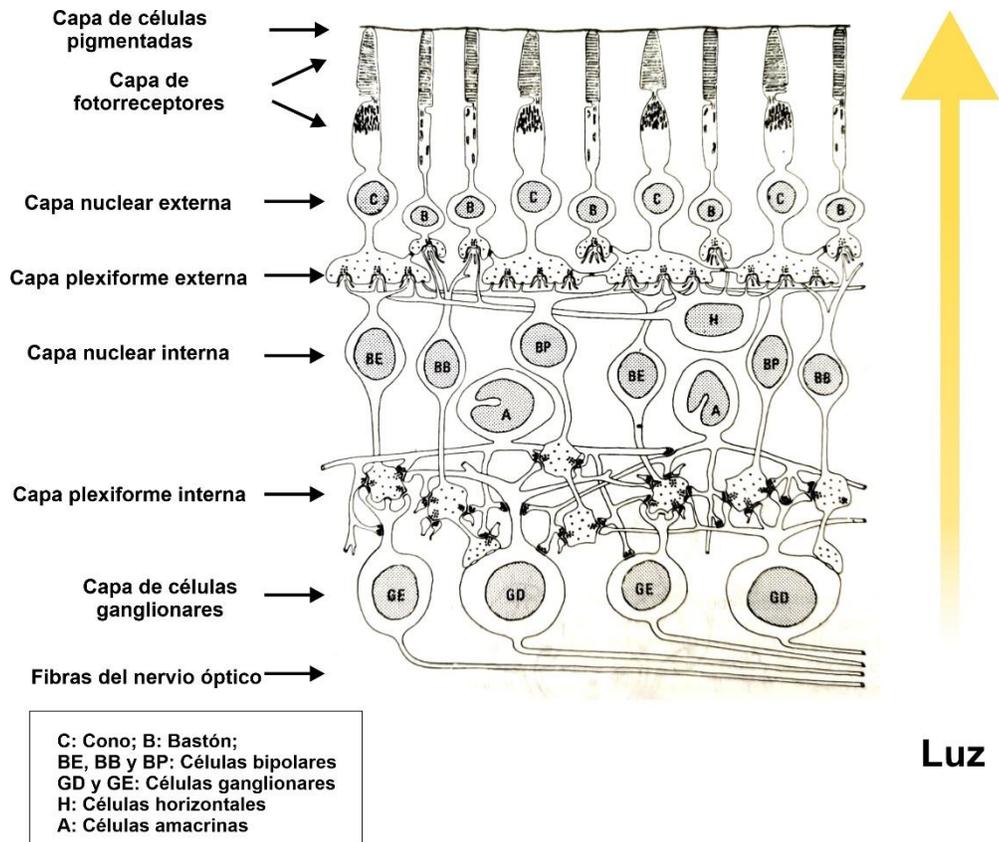


Fig. 4. Esquema de representación de las capas de la retina. Las células de salida de la retina son las células ganglionares retinianas, cuyos axones forman los nervios ópticos.

1. **Capa de células pigmentarias.** La retina comienza justo en el interior de la coroides con una capa de epitelio pigmentario (EPR). Dicha capa absorbe la luz dispersa y tiene prolongaciones similares a tentáculos que se extienden hasta el interior de la capa de fotorreceptores para prevenir la dispersión de la luz entre los mismos. Las células pigmentarias también convierten todo-trans-retinal en 11-cis-rodopsina y suministran la forma 11-cis a los fotorreceptores [74].

2. **Capa fotorreceptora.** Los fotorreceptores son bastones y conos, que consisten en un cuerpo celular, un segmento externo, un segmento interno y terminales sinápticos.
3. **Capa nuclear externa.** Los núcleos de los fotorreceptores se encuentran en la capa nuclear externa.
4. **Capa plexiforme externa.** Es una capa sináptica que contiene elementos pre-sinápticos y post-sinápticos de los fotorreceptores y las interneuronas de la retina. Las sinapsis se establecen entre fotorreceptores e interneuronas.
5. **Capa nuclear interna.** Contiene los cuerpos celulares de interneuronas retinianas, entre ellas células bipolares, células horizontales y células amacrinas.
6. **Capa plexiforme interna.** Es la segunda capa sináptica. Contiene elementos presinápticos y postsinápticos de interneuronas retinianas. Las sinapsis se establecen entre interneuronas retinianas y células ganglionares.
7. **Capa de células ganglionares.** Contiene los cuerpos celulares de las células ganglionares, que son las células de salida de la retina.
8. **Capa del nervio óptico.** Los axones de las células ganglionares retinianas forman la capa del nervio óptico. Esos axones pasan a través de la retina entran en el disco óptico y salen del ojo, formando el nervio óptico.

Los fotorreceptores a su vez se dividen en bastones y conos. Cada fotorreceptor presenta dos regiones:

- **Región externa:** consta de una zona transductora [71] (segmento externo), una estructura conectora (segmento de conexión) y una zona para el mantenimiento de la homeostasis celular (segmento interno).
- **Región interna:** Consta de una fibra conductora y una zona transmisora (cuerpo sináptico)

Siguiendo la pauta de cómo operan los fotorreceptores, la luz que entra a través del segmento interno, posteriormente pasa por el segmento externo, donde se absorbe

por las moléculas del foto-pigmento, o bien continua su camino y sale del fotorreceptor por el otro lado (véase la Fig.5).

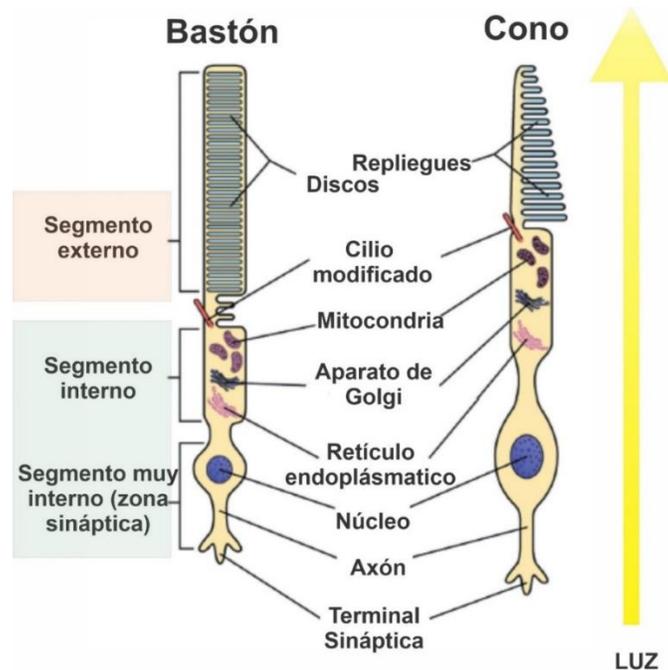


Fig. 5. Esquema para los dos tipos de fotorreceptores

Los fotorreceptores son neuronas y la información que codifican es la intensidad de la luz, la cual está determinada por la retroalimentación de las células horizontales. La intensidad de la luz es una cantidad que varía de forma continua y rápida, por lo que no sería demasiado eficiente para los fotorreceptores codificar esta información como habitualmente lo harían las neuronas del cerebro empleando impulsos disparados en un intervalo de tiempo determinado. En su lugar, los fotorreceptores utilizan una forma de codificación que consiste en cambios graduales en el potencial de membrana. Cuando la neurona está en estado de reposo, el exterior de la célula tiene un potencial eléctrico de 70 mV más alto que el del interior de la célula, llamado potencial de reposo [75]. Un incremento de la intensidad de la luz hace que el fotorreceptor reduzca su liberación del neurotransmisor excitador glutamato, haciendo que la membrana reduzca su potencial o bien se hiperpolarice, mientras que la oscuridad hace que los fotorreceptores aumenten la liberación de glutamato, elevando el potencial de la membrana y produciendo así una despolarización de la misma [76].

Por su parte, dado que el nervio óptico está formado por los larguísimos axones de las células ganglionares, la señal visual que viaja a través de él se codifica como impulsos y no como potenciales graduados. Desafortunadamente durante el proceso de transformación de la señal se generan errores y pérdida de información, por lo que la retina la pospone hasta la última etapa, la de las células ganglionares: por lo que todos los demás tipos de células de la retina, es decir, los fotorreceptores, las células bipolares, horizontales y amacrinas, no disparan impulsos [77].

Una característica destacada de las sinapsis de bastones y conos es una estructura conocida como “cintas”, la cual durante su sinapsis liberan glutamato y contribuyen a las primeras etapas de la visión al apoyar la liberación continua de neurotransmisores [78]. Estudios muestran que la señal generada por un fotorreceptor puede transmitirse de forma diferente en diferentes partes de la sinapsis dependiendo de las propiedades de la cinta, por ejemplo, las terminales de cinta más pequeñas permiten la transmisión de frecuencias más altas[77].

La sensibilidad a estímulos luminosos de cada fotorreceptor está determinada al fotopigmento que poseen. Para el caso de los bastones se tiene la rodopsina, en el caso de los conos, existen tres pigmentos: eritrolabe, clorolabe y cianolabe [78]. Debido a que los conos son los encargados de la visión a color entonces son clasificados de acuerdo con la sensibilidad espectral que exhiben.

2.4 Pigmentos visuales y percepción del color

Los fotorreceptores no son capaces de medir ni codificar la longitud de onda, sólo absorben fotones y éstos tampoco contienen información sobre la longitud de onda. Si la respuesta de un fotorreceptor cambia, puede deberse ya sea a una variación de la longitud de onda de la luz o a un cambio de intensidad (o incluso a ambos), pero un solo fotorreceptor no puede hacer la distinción: este es el principio conocido como univarianza [79]. Para ver los colores se tiene que discriminar longitudes de onda, y esto requiere comparar las salidas de los fotorreceptores, que deben ser de diferentes tipos para que tengan diferentes sensibilidades espectrales.

En condiciones de luz escotópica sólo están activos los bastones y sólo hay un tipo de fotorreceptor en funcionamiento, por lo que la visión nocturna es acromática. En condiciones fotópicas los conos están activos. Existen tres tipos de conos en la retina, cuyas sensibilidades espectrales son unimodales pero que alcanzan su máximo en diferentes longitudes de onda. Los conos S ("longitud de onda corta"), los conos M ("longitud de onda media") y los L ("longitud de onda larga"), que responden a longitudes pico de onda de 420 nm, 534 nm y 564 nm respectivamente [80, 81]. La Fig. 6 muestra la distribución espectral de respuesta de cada uno de los tres tipos de conos.

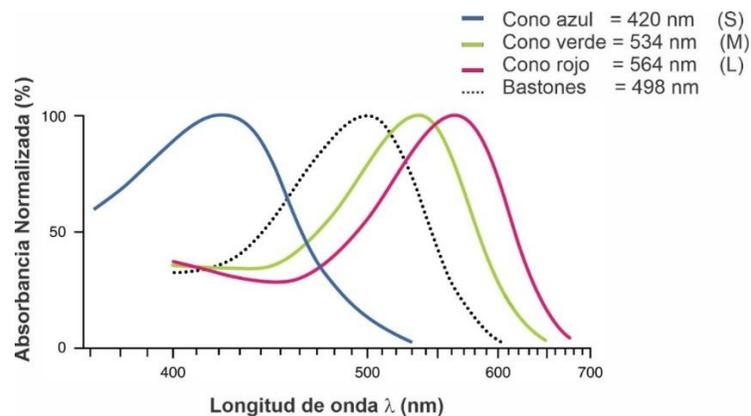


Fig. 6. Distribución espectral de absorancias normalizadas de los tres tipos de receptores: S, M y L, para diferentes longitudes de onda

Así mismo, existe un pigmento visual amarillento que cubre una región de 5° de ancho centrada en la fóvea, llamado pigmento macular [82]. Su densidad cambia considerablemente entre los individuos, por lo que las curvas de sensibilidad espectral para los conos son diferentes entre las distintas personas. Dada la existencia de tres tipos de conos, se dice que los humanos son tricromatas y tienen una visión tricromática [71]. Sin embargo, algunos seres humanos son dicromatas al presentar alguna alteración en los conos. En mayoría de los mamíferos, la presencia de los conos L y S es predominante, mientras que en algunos animales nocturnos sólo tienen un tipo de cono y, por tanto, no pueden ver los colores [79, 83].

2.5 Teoría Tricromática del color

La Teoría Tricromática del color, también conocida como teoría de la visión del color, descrita por Thomas Young y Herman Von Helmholtz [80], se derivó del descubrimiento de la percepción humana de los colores por la existencia de los tres tipos de conos en la retina caracterizados por tres fotopigmentos diferentes. Cada uno de los tipos de conos (L, M y S), tiene un espectro de absorción distinto y, por tanto, responde mejor a una porción diferente del espectro visible.

En 1860 Helmholtz abordó el tema de las mezclas de colores utilizando un aparato compuesto básicamente por prismas y lentes, donde comprobó experimentalmente que para obtener los espectros más puros era necesario utilizar la luz del sol [84] y se percató que la percepción de la mayoría de las tonalidades de color pueden obtenerse mediante la combinación de los tres colores primarios monocromáticos, denominando a este efecto como mezcla aditiva de los colores [85]. Esta combinación se da a partir de los colores: azul, verde y rojo. En la fig. 7 se muestra el principio de la mezcla aditiva de tres luces proyectadas sobre una pantalla, donde los haces de luz se superponen parcialmente para poder ilustrar el efecto de la mezcla, generando tres colores secundarios: amarillo, cian y magenta. Por ejemplo, para obtener la luz amarilla los proyectores se ajustan de manera que provenga de una mezcla del rojo y del verde,

en el caso para conseguir la luz cian es una mezcla de azul y verde. Finalmente, la luz magenta es una mezcla del rojo y el azul. Cuando las tres luces primarias están proyectadas y se combinan por igual, el resultado es la luz blanca.



Fig. 7. Mezcla aditiva de los colores

2.6 Espacios de color

La Comisión Internacional de Iluminación (CIE, por sus siglas en inglés), es una organización internacional sin ánimo de lucro que regula las normas relativas a todos los aspectos de la iluminación, que comprenden la colorimetría y la fotometría. El sistema de color CIE consta de tres coordenadas de color para identificar un color en el espacio de color [80, 86], basado en tres estímulos primarios. El propósito de un modelo de color, también llamado espacio de color o sistema de color es facilitar la designación para describir la gama de un conjunto de colores de una manera convencional y generalmente aceptable [87]. En esencia, un modelo de color es una especificación de un sistema de coordenadas y representarlo de esta manera facilita el diseño y el funcionamiento de la mayoría de los dispositivos de visualización[88] y detección de colores, así como en aplicaciones en la que la manipulación del color es un objetivo, como en la creación de gráficos en color para animación [87] y en procesamiento de imágenes digitales.

Actualmente existen diferentes modelos de espacios de color para representar los colores como puntos en un espacio tridimensional, dentro de los cuales, los que más se destacan son:

- RGB (rojo, verde, azul, por sus siglas en ingles),
- CMY (cian, magenta, amarillo, por sus siglas en inglés) /CMYK (cian, magenta, amarillo y negro, por sus siglas en ingles),
- HSL (tonalidad, saturación, luminosidad, por sus siglas en inglés) /HSV (tonalidad, saturación, valor, por sus siglas en ingles),
- CIE XYZ (conjunto de primarios imaginarios no negativos llamados valores triestímulos donde los valores de X, Y y Z se utilizan para derivar los parámetros de “x” e “y” para poder trazar los colores en la carta de gama CIE),
- CIE L*a*b* *(luminosidad, a*y b* son componentes cromáticos el cual a* oscila del verde al rojo, y b* oscila del azul al amarillo)

Otros espacios de color pueden ser consultados en la literatura, pero su descripción y uso no están incluidos en este trabajo, por lo que si el lector está interesado en otras alternativas para el procesamiento de imágenes por computadora puede consultar la referencia [89].

- **Espacio de color RGB**

En el modelo RGB, cada color aparece en sus componentes espectrales primarios de rojo, verde y azul basado en un sistema de coordenadas cartesianas. Por lo que el subespacio de color forma un cubo como el mostrado en la Fig. 8. En él, los valores primarios RGB están en tres esquinas y todos los demás colores tienen una ubicación particular dentro del cubo. El color negro se sitúa en el origen (pues corresponde a la ausencia de los tres colores) y el blanco está en la esquina más alejada del origen, que indica la cantidad máxima de cada uno de los tres colores.

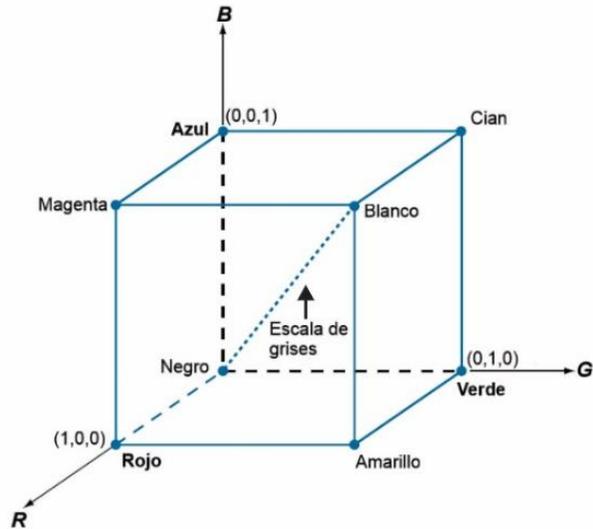


Fig. 8. Esquema del cubo de color RGB

En este modelo, la escala de grises se extiende del negro al blanco en el punto a lo largo de la línea azul punteada que une estos dos puntos (vea Fig. 8). Todos los valores de R, G y B en esta representación se asumen dentro del rango $[0, 1]$. De esta forma, los componentes primarios RGB pueden interpretarse como vectores unitarios que emanan del origen del cubo.

Considerando que las fotografías capturadas por dispositivos ópticos como las cámaras digitales actuales, son versiones digitalizadas de las imágenes reales, resulta común asociarlas como una representación numérica bidimensional. De esta forma, las imágenes contienen un número fijo de filas y columnas en donde a cada elemento se le conoce como 'elemento de imagen' o píxel (acrónimo del inglés picture element). Cada uno de estos pixeles está especificado por tres valores para los componentes rojo, azul y verde de la matriz como se puede ver en la Fig. 9.

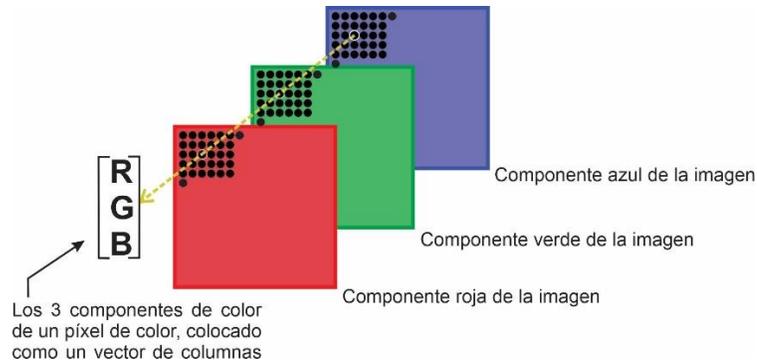


Fig. 9. Esquema que muestra cómo se forman los píxeles de una imagen en color RGB a partir de los píxeles correspondientes de las tres componentes de la imagen.

Esta imagen de color RGB de clase `unit8` (array de enteros sin signo de 8 bits), es una matriz de píxeles $M \times N \times 3$, donde cada píxel de color es un triplete RGB de tres elementos que especifica los componentes rojo, verde y azul de un único color obtenido del mapa de colores y cuyo rango de valores es $[0, 255]$, lo que significa que tiene 256 valores posibles para cada valor primario, por lo que es posible generar 16.7 millones de combinaciones de color diferentes [90]. En la tabla 5 se pueden observar los rangos de los principales componentes de color del espacio RGB.

Tabla 5. Principales componentes del color en el espacio RGB. (a) El rango de valores $[0, 255]$ y (b) El rango de valores $[0, 1]$

Color	Etiqueta	(a)			(b)		
		R	G	B	R	G	B
Negro	N	0	0	0	0	0	0
Rojo	R	255	0	0	1	0	0
Verde	G	0	255	0	0	1	0
Azul	B	0	0	255	0	0	1
Amarillo	Y	255	255	0	1	1	0
Magenta	M	255	0	255	1	0	1
Cian	C	0	255	255	0	1	1
Blanco	W	255	255	255	1	1	1

- **Espacio de color CMY/CMYK**

El modelo CMYK representa un color que contiene niveles de cian, magenta, amarillo y negro. Estos colores enmascaran la reflectancia de ciertas longitudes de onda de la luz y actúan como filtros para producir el color apropiado. En la Fig. 10 se ilustra el modelo CMYK que incluye los colores sustractivos de la luz roja (cian), verde (magenta) y azul (amarillo). A diferencia del modelo aditivo descrito para el espacio RGB, el modelo CMYK es en realidad un modelo sustractivo donde se consideran los colores secundarios de la luz.



Fig. 10. Modelo CMYK

Este modelo se define como [91]:

$$C(x, y) = 1 - R(x, y) ; \quad (1)$$

$$M(x, y) = 1 - G(x, y); \quad (2)$$

$$Y(x, y) = 1 - B(x, y) \quad (3)$$

El modelo CMY fue ampliamente utilizado en las primeras generaciones de impresoras de color de escritorio, sin embargo actualmente está en desuso pues fue sustituido por el CMYK que añade el negro para compensar el hecho de que el cian, el magenta y el amarillo no pueden producir un color negro puro cuando se mezclan [92]. La inclusión del color negro permite sobreimprimir estas áreas y conseguir una imagen con mejor contraste.

- **Espacio de color HSV y HSL**

Los espacios de color HSV y HSL comparten dos de las dimensiones requeridas, el tono y la saturación, difiriendo solo en la tercera. La tonalidad (H) se refiere a la coloración, que suele expresarse en términos angulares de 0 a 359° que puede visualizarse en un diagrama circular [93]; en el centro se ubica el blanco, donde es una combinación de todos los colores, y en la periferia se encuentran los demás colores. La saturación (S) viene dada por la distancia del color al centro. El blanco está totalmente desaturado, y los colores de la periferia están totalmente saturados.

En el espacio HSV, que se muestra en la Fig. 11a, el valor (V) es un indicador de luminosidad que va de 0 a 1. En el 0 no hay luz ni color, es negro, identificado por la punta del cono. A medida que se aumenta el valor, el cono crece en diámetro dando lugar a los colores, mismos que pueden aumentar en saturación a medida que se mueven hacia el borde del círculo. Con un valor de 1, el centro del círculo es blanco y los colores de la circunferencia son muy brillantes y puros.

En el espacio HSV, las tres dimensiones pueden calcularse directamente a partir de los valores RGB y viceversa mediante las ecuaciones 4,5 y 6 [94]:

$$H = \begin{cases} 60 * \left(\frac{G - B}{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)} \right) & R = \max(R, G, B) \\ 60 * \left(\frac{G - B}{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)} \right) & R = \max(R, G, B) \\ 60 * \left(\frac{G - B}{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)} \right) & R = \max(R, G, B) \end{cases} \quad (4)$$

$$S = \frac{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)}{\max(R, G, B)} \quad (5)$$

$$V = \max(R, G, B) \quad (6)$$

Sin embargo, el HSV tiene una limitante cuando las imágenes digitales presentan manchas pues en este espacio de color estos elementos de vuelven muy brillantes tendiendo a formar zonas blancas perdiendo cualquier tonalidad individual.

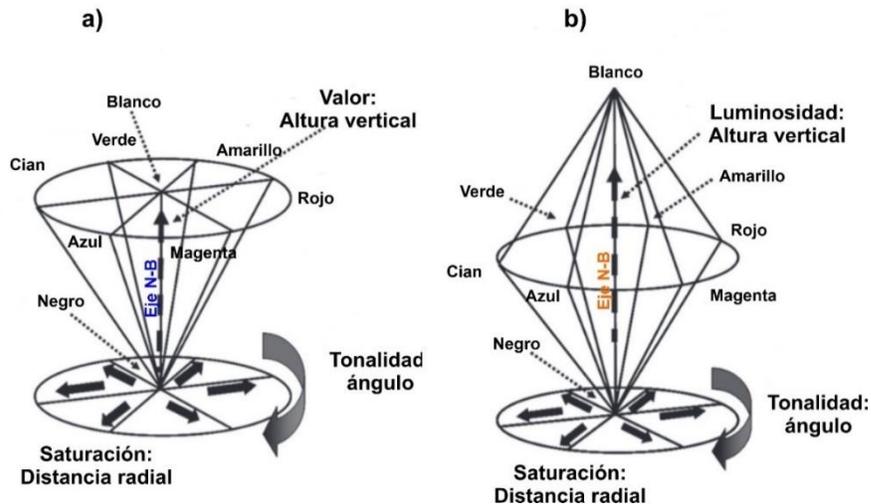


Fig. 11. a) El espacio HSV, el eje negro-blanco (N-B) es una línea punteada que se encuentra verticalmente por el centro del diagrama y los colores se sitúan en la periferia del círculo. b) El espacio HSL, es similar al espacio HSV, salvo que la parte superior consiste en otra forma cónica donde se encuentra el blanco.

Para subsanar este problema, se creó el espacio de color HSL que se conforma por dos conos situados uno sobre del otro, como se muestra en la Fig. 11b. El cono inferior es muy similar al cono del espacio HSV. El cono superior por su parte está invertido, por lo que ahora la punta representa al color blanco en lugar del negro. En este modelo, se comparte la misma definición para la componente de tonalidad del HSV con los componentes RGB, pero la saturación del color y la iluminación se definen mediante las ecuaciones 7 y 8 respectivamente:

$$S = \frac{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)}{1 - |\max(R, G, B) + \min(R, G, B) - 1|} \quad (7)$$

$$L = \frac{\max(R, G, B) + \min(R, G, B)}{2} \quad (8)$$

- **Espacio de color CIE XYZ**

El espacio de color CIE XYZ involucra las cantidades de rojo, verde y azul necesarias para formar un color determinado, denominándoseles valores triestímulos, X, Y y Z respectivamente. Un color entonces, se representa mediante un conjunto de coordenadas de cromaticidad o coeficientes tricromáticos, x, y , y z de acuerdo con la ecuación 9 [80]:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}; y = \frac{Y}{X + Y + Z}; z = \frac{Z}{X + Y + Z} \quad (9)$$

La suma de los coeficientes es igual a la unidad ($x + y + z = 1$), y es evidente que, al despejar z , se convierte en $z = 1 - (x + y)$, por lo que sólo son necesarias dos coordenadas para describir una coincidencia de color. Por lo tanto, las coordenadas de cromaticidad proyectan un plano y se suelen representar como un gráfico paramétrico de “ x ” y “ y ”, y donde z se evalúa implícitamente con las coordenadas de cromaticidad. Este grafico se conoce como diagrama de cromaticidad y está representado en la Fig. 12.

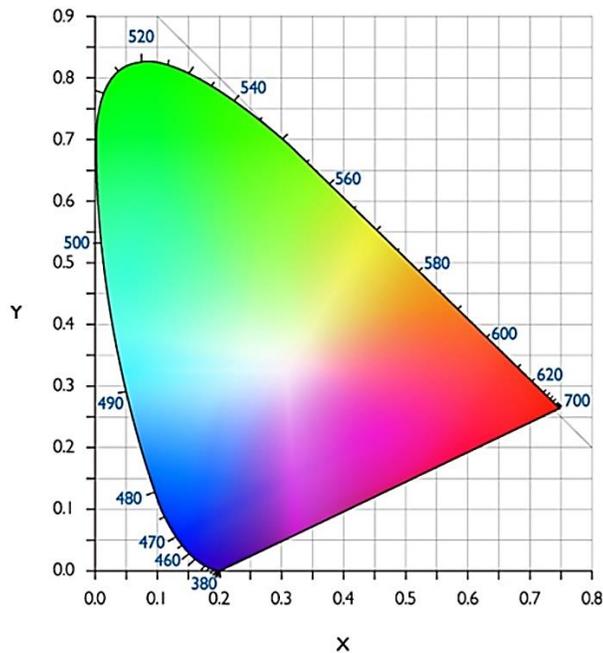


Fig. 12. Diagrama de cromaticidad CIE. Vista en coordenadas (x, y) donde los números azules que se muestran alrededor del borde de la herradura representan la longitud de onda de 380 nm a 700 nm

- **Espacio de color CIE L*a*b**

El modelo L*a*b está definido por tres variables, L* que representa la luminosidad y los componentes del tono a* y b*. El valor de a* define la distancia a lo largo del eje rojo-verde, mientras que b* representa la distancia a lo largo del eje azul-amarillo en el diagrama CIE XYZ. Este modelo de color puede expresar una gama de colores más amplia que el RGB, y normalmente, se utiliza para mejorar las imágenes en color. Las ecuaciones 10, 11 y 12 describen el cálculo de los valores CIE L*a*b a partir el modelo primario CIE XYZ.

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad (10)$$

$$a^* = 500 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right] \quad (11)$$

$$b^* = 500 \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right] \quad (12)$$

Donde $\frac{Y}{Y_n}, \frac{X}{X_n}$ y $\frac{Z}{Z_n} > 0,008856$,

X, Y y Z son los valores triestímulos del objeto medido.

X_n, Y_n y Z_n son los valores triestímulos de un objeto blanco de referencia.

L* es la coordenada de luminosidad visual.

a* es la coordenada cromática que va aproximadamente del rojo al verde.

b* es la coordenada cromática que va aproximadamente del amarillo al azul.

Aunque existe la posibilidad de emplear cualquiera de los espacios de color antes mencionados, el modelo RGB es el espacio de color más frecuentemente utilizado pues está ampliamente difundido en la mayoría de las tareas computacionales, debido a principalmente a que tanto los equipos como las plataformas informáticas han sido desarrolladas bajo este modelo, por lo que se puede utilizar directamente sin realizar un trabajo adicional [95] . En este sentido, el presente trabajo de investigación empleara el espacio de color RGB para efectuar el procesamiento de imágenes

obtenidas digitalmente por una cámara. Además, el uso de componentes RGB permite representar otros espacios de color mediante las ecuaciones de transformación apropiadas. Mas aún, el análisis RGB, posee un estrecho vínculo con el principio de la visión tricromática del color en la percepción de los colores.

2.7 Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis es tal vez una de las técnicas analíticas de laboratorio más utilizadas en la ciencia pues permite el estudio de cultivos bacterianos, la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula, la detección y cuantificación de fármacos, hasta el control de la calidad de los alimentos y bebidas. Se trata de una técnica espectrofotométrica que se utiliza para medir la intensidad de la luz, en donde el espectro “UV” varia en la región de 100 nm a 400 nm, mientras que la región “Vis” se extiende de 400 nm a 700 nm en función de la longitud de onda (vea Fig.13) [96].

En esta gama de longitudes de onda visibles proporciona directamente información sobre el color, permitiendo que dichas longitudes pueden utilizarse para cuantificar pigmentos presentes en las muestras bajo estudio [97].

La espectroscopia que utiliza la radiación en el rango UV-Vis puede dividirse en dos categorías generales basadas en el tipo de interacción de la materia con la radiación que se está monitoreando. La primera categoría es la conocida como espectroscopia de absorbancia y segunda como la espectroscopia de fluorescencia.

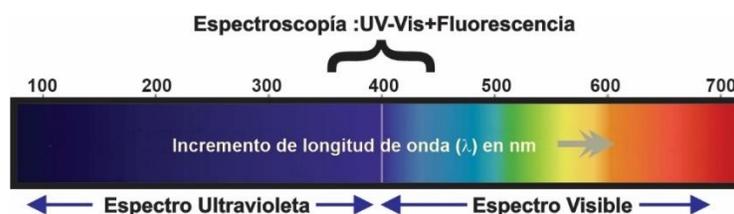


Fig. 13. Rango de detección del UV-Vis

De forma general, la técnica UV-Vis explota diferentes respuestas físicas de la luz debida la interacción de las diferentes radiaciones con los compuestos o analitos que constituyen a la muestra bajo análisis. Este efecto de interacción luz-muestra, da como resultados fenómenos como la absorción, dispersión, difracción, refracción y reflexión de radiación electromagnética incidente [98-101]. Este proceso da pauta a que existan otros métodos espectroscópicos que utilizan otro tipo de radiación electromagnética como los rayos X, rayos gamma, microondas, ondas de radio y resonancia magnética nuclear (RMN), además de otras fuentes de luz como el infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) y el infrarrojo lejano (FIR) que poseen diferentes rangos de longitud de onda dentro del espectro electromagnético [98, 100]. En la Fig. 14 se tiene una representación del espectro electromagnético, en donde se incluye una amplia gama de radiaciones que varían de acuerdo a la longitud de onda en nanómetros (nm), frecuencia en Hertz (Hz) y energía, y las técnicas de espectroscopia relacionadas a ellas [102].

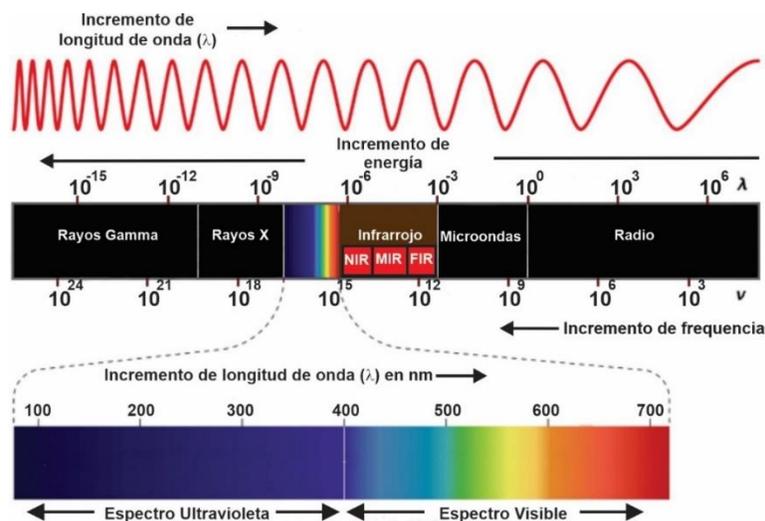


Fig. 14. Espectro electromagnético donde se muestra las radiaciones electromagnéticas de diferentes longitudes de onda

Como ya se mencionó anteriormente, en la espectroscopia, cuando la luz incidente interactúa con las muestras bajo análisis, se suscitan diferentes fenómenos: la luz

incidente (I_0) puede ser reflejada (I_R), dispersada (I_D), absorbida (I_A) o transmitida (I_T). En la Fig.15 se muestra un esquema general de estos fenómenos.

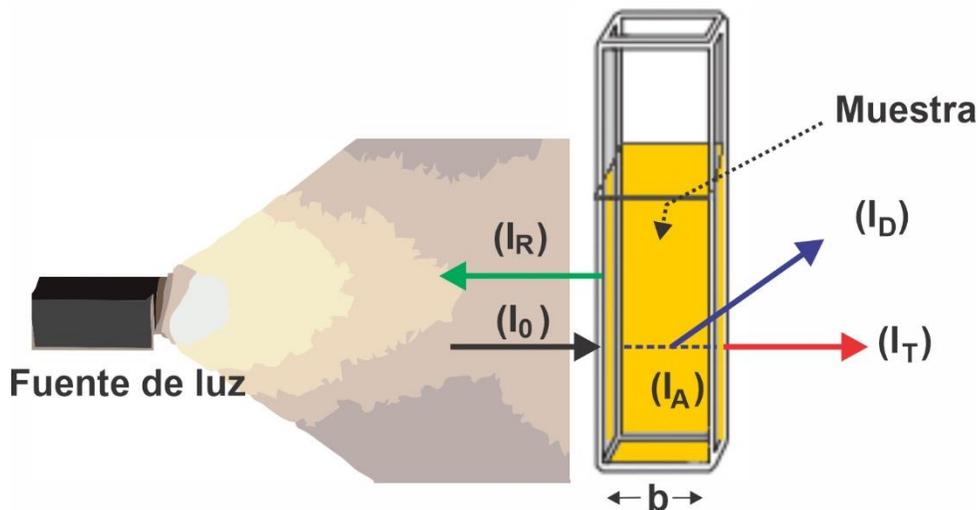


Fig. 15. Energía de la luz incidente al interactuar con las muestras

Las absorciones en la zona UV-Vis surgen debido a excitaciones electrónicas y vibracionales, porque los electrones se excitan por una absorción de energía. Esta absorción se relaciona con la concentración de moléculas absorbentes [97], dando pie a un análisis cuantitativo. El análisis basado en la espectroscopía de absorción UV-Vis puede describirse mediante la Ley de Lambert-Beer [103], en donde interviene la correlación entre la cantidad de luz incidente absorbida por la muestra analizada, la longitud de la trayectoria de la luz y la concentración de los compuestos presentes en la muestra. La ecuación 13 que representa esta ley, es un elemento crucial para evaluar la absorbancia de una muestra:

$$A_\lambda = -\log T = -\log \left(\frac{I_T}{I_0} \right) = \log \left(\frac{I_0}{I_T} \right) = \varepsilon b C \quad (13)$$

donde A es la absorbancia definida a través de la intensidad incidente I_0 (luz incidente sobre la muestra) y la intensidad transmitida I_T (luz transmitida que sale de la muestra), λ es la longitud de onda de la fuente de luz, C es la concentración de la muestra absorbente expresado en $moles * L^{-1}$, b es la trayectoria óptica (espesor de la celda) y ε es el coeficiente de absortividad molar.

La relación entre la absorbancia A y la transmitancia T de una muestra bajo estudio, se define como el logaritmo negativo de la transmitancia. Cuando la absorción de una muestra aumenta la transmitancia disminuye [97].

Debido a que esta Ley demuestra la dependencia de la intensidad de absorción de la radiación electromagnética cuando ésta interacciona con la materia es posible entonces analizar muestras sólidas, líquidas y gaseosas [104-106].

Instrumentación para la Espectroscopía de absorción

La construcción de los espectrofotómetros típicos UV-Vis, poseen generalmente cinco componentes principales:

- (1) una fuente de energía radiante;
- (2) un dispositivo que aísla una región restringida del espectro para la medición;
- (3) un recipiente para contener la muestra;
- (4) un detector de radiación, que convierte energía radiante en una señal eléctrica utilizable; y
- (5) dispositivo de lectura, que muestra la señal transducida en una pantalla digital, una pantalla de ordenador u otro dispositivo de registro.

La figura Fig.16 ilustra la forma como se configuran estos componentes para efectuar las mediciones espectroscópicas, donde un haz de luz procedente de una fuente de luz UV y/o visible adecuada pasa a través de un prisma o de un monocromador de rejilla de difracción, para que después la luz pase a través de la muestra a analizar antes de llegar al detector y se pueda realizar la lectura.

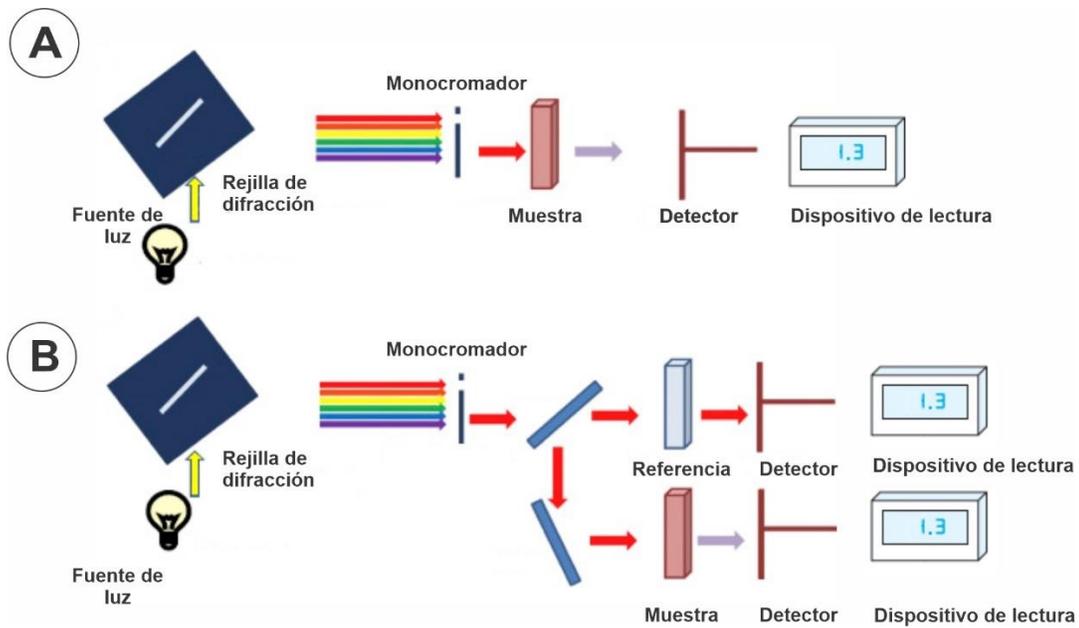


Fig. 16. Espectrofotómetros de absorción típicos. (A) Espectrofotómetro de haz simple y (B) Espectrofotómetro de doble haz.

Existen dos clases de espectrofotómetros: de haz simple y de haz doble. En la configuración de haz único, los componentes están en secuencia; este instrumento es más barato de construir, fácil de usar y mantener. Su uso requiere de medir una muestra de referencia por separado de la muestra de interés para comparar la cantidad de radiación entre una y otra, a fin de determinar la concentración de uno o más analitos específicos. En un espectrofotómetro de doble haz, la luz de la fuente se divide en dos haces separados después de pasar por el monocromador (ver Fig. 16B). Un haz se utiliza para la muestra, mientras que el otro se utiliza para la determinación de la referencia. Esta configuración es favorable porque la lectura de la muestra y de la referencia pueden realizarse simultáneamente, de modo que la medición se vuelve independiente de las variaciones en la intensidad y en la composición espectral de la fuente de luz. Un espectrofotómetro de haz único debe ponerse en operación durante cierto tiempo antes de su uso para permitir que la lámpara utilizada como fuente de luz alcance una temperatura constante.

2.8 Sistemas bio-inspirados: Ojo Electrónico

Aunque los métodos instrumentales convencionales tienen la ventaja de ser altamente confiables y son utilizados como referencia en los ámbitos científicos e industrial, la elección de usarlo depende en gran medida de los analitos por determinar en la muestra. Esto involucra que además de las particularidades instrumentales, es necesario que el analista tome en cuenta: la naturaleza y complejidad de la muestra, preparación, cantidad de muestra disponible, costos y velocidad del análisis.

Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones resulta importante abreviar los tiempos de respuesta por parte del laboratorio analítico, lo que no es posible con los métodos instrumentales convencionales. Por ello, disponer de nuevos sistemas analíticos portables con capacidad de efectuar análisis relativamente rápidos y no destructivos, valiéndose de una detección simplificada, de bajo costo, automatizada y de fácil operación, representan un nuevo enfoque de adaptación a nuevas técnicas de análisis y equipos instrumentales novedosos.

La perspectiva actual en el desarrollo de este tipo de sistemas surgió principalmente de la imitación de la fisiología de los sentidos de los mamíferos para diseñar sistemas analíticos capaces de ofrecer datos confiables y precisos de manera oportuna y rentable [23, 107, 108]. Conocidos habitualmente como sistemas bio-inspirados, hoy en día representan una alternativa analítica competitiva para solucionar necesidades en diferentes aplicaciones del mundo real.

Entre los sistemas bio-inspirados, el ojo electrónico (OE) es quizás quien ha demostrado poseer una ventaja en el análisis del aspecto visual de muestras. Pues es capaz de establecer atributos entre los que se incluyen el color, textura y apariencia [59]. Elementos que son de suma importancia en la industria alimentaria para establecer la calidad, la evaluación de la frescura, la determinación de la vida útil y la evaluación de la autenticidad [18].

Una definición actual del OE en aplicaciones del sector alimentario, esta descrita por Cui YongXia, quien lo define como:

“El ojo electrónico (OE) es un instrumento de detección basado en la biónica para reconocer y analizar la información visual, que puede analizar el color general de una muestra. Suele utilizarse en la clasificación de alimentos y cultivos, así como en la evaluación de la calidad del producto [109]”.

Esta definición nos permite establecer los alcances de este sistema bio-inspirado puede realizar, teniendo como principio de operación la imitación del sentido de la vista con la intención de analizar aquellos atributos visuales presentes en las muestras de interés y en donde intervienen métodos de visión por computadora [110-113].

2.9 Composición de un OE

El ojo electrónico está integrado por un sistema de iluminación (bajo un entorno específico), un sensor de imagen para recolectar imágenes de la muestra u objeto de interés, y una fase de procesamiento de imágenes necesaria para mejorar su calidad y extraer características que puedan ser interpretados por algún tipo de algoritmo computacional (vea Fig. 17) [114].

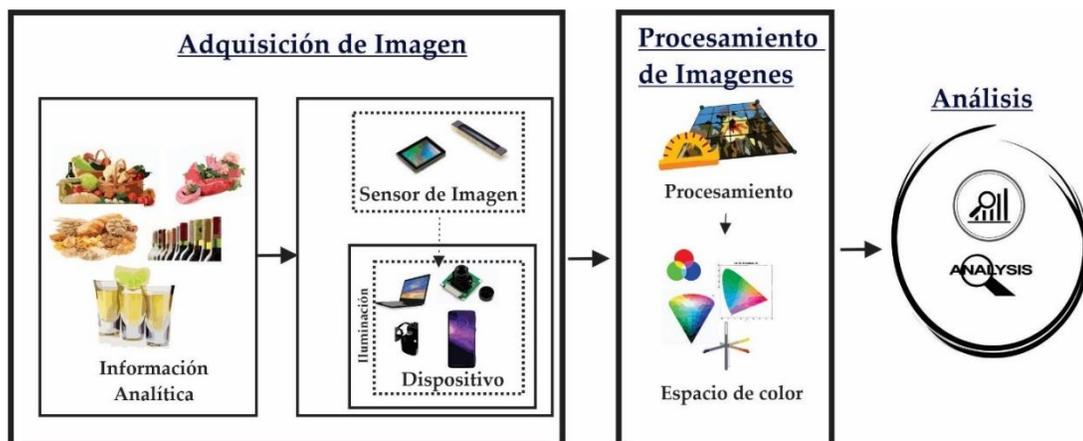


Fig. 17. Estructura esquemática de un OE

A continuación, se describen estos elementos a detalle:

- **Sistema de iluminación**

La iluminación en cualquier sistema de detección óptica debe proporcionar una escena uniforme y controlada de la imagen, evitando en medida de lo posible eliminar variaciones de luz. Tradicionalmente, las bombillas fluorescentes e incandescentes son dos iluminantes ampliamente utilizados, aunque también existen algunas otras fuentes de luz, como los diodos emisores de luz (LED) y las fuentes de iluminación de xenón/halógeno [115] o de tungsteno [27]. La colocación del iluminante puede ser de manera frontal, lateral, estructurada, o bien, poseer una geometría en forma de anillo. La selección del tipo de iluminación influye respecto del tipo de objeto por analizar [111, 116]. Así, para superficies planas se puede utilizar el iluminador de anillo o LED, sin embargo, para objetos con forma de esfera es recomendable utilizar la iluminación difusa desde múltiples ángulos, lo que provee una iluminación más homogénea (vea Fig. 18).

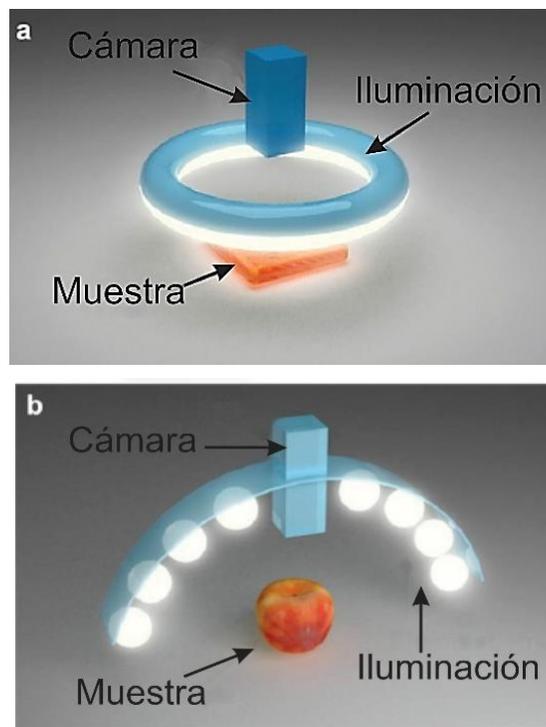


Fig. 18. Dos posibles geometrías de iluminación: (a) iluminación de anillo, (b). Iluminador difuso

- **Adquisición de imágenes a partir de sensores de imagen**

La captura de la imagen de forma electrónica es el primer paso en el procesamiento de imágenes digitales. Los elementos clave son: la cámara y el capturador de fotogramas. En primer lugar, la cámara es la encargada de convertir fotones en señales eléctricas y el capturador digitaliza estas señales en un flujo de datos o una imagen de mapa de bits.

Hay muchos tipos de cámaras y desde su invención no han hecho más que mejorar su infraestructura. La tecnología dominante utilizada en las cámaras actuales hace uso de sensores de imagen y a continuación se describe el comportamiento de estos.

Sensores de imagen

Los sensores de imagen o también llamado sensores de visión son similares a la película fotográfica, es decir, cuando se expone la energía luminosa proyectada sobre la superficie del sensor, se captura una imagen. Hay dos tipos de sensores de imagen, unos pueden estar basados en un dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés) y otros tienen una tecnología de semiconductores de óxido de metal complementario (CMOS, por sus siglas en inglés). Ambos tipos de sensores se componen esencialmente de semiconductores de óxido metálico (MOS, por sus siglas en inglés) distribuidos en forma de matriz en donde, cada uno constituye de forma independiente un píxel.

La diferencia entre ellos radica en que mientras la CCD convierte la carga eléctrica en voltaje y entrega una señal analógica a su salida que debe ser digitalizada y procesada por un circuito dedicado a esta tarea, en los sensores de imagen CMOS las cargas eléctricas se convierten y digitalizan en el mismo píxel dentro del sensor, permitiendo que esta carga fluya a través de decodificadores de columnas y filas [117]. Este hecho ha provocado que los sensores CMOS se estén convirtiendo rápidamente en el estándar para la captura de imágenes digitales [117].

Un sensor de imagen CMOS tiene un área de imagen, que consiste en una matriz de píxeles, circuitos de acceso vertical y horizontal, y circuitos de lectura (vea Fig. 19). El área de imagen es una matriz bidimensional de píxeles; cada píxel contiene un fotodetector y algunos transistores junto con un circuito de acceso empleado para acceder a un píxel específico y leer el valor de la señal [118].

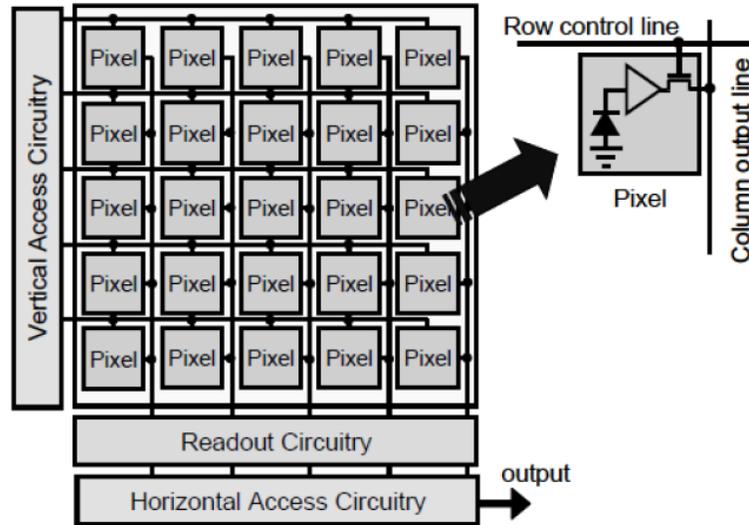


Fig. 19. Arquitectura de un sensor de imagen CMOS

En la Fig.20 se puede observar el proceso de adquisición de una imagen usando este tipo de sensores. Esta figura muestra la energía de una fuente de iluminación reflejada en una escena. La primera función que realiza el sistema de imágenes es recolectar la energía entrante y enfocarla en un plano de la imagen. Si la iluminación es buena, el extremo frontal del sistema de imágenes proyecta la escena vista en el plano focal de la lente de la cámara. La matriz interna del sensor, que coincide con el plano focal, produce salidas proporcionales a la intensidad de la luz recibida. El arreglo de sensores de imagen de la cámara tiene la función de convertir esta señal analógica y digitalizar la información. El resultado final es una imagen digital, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 20(e).

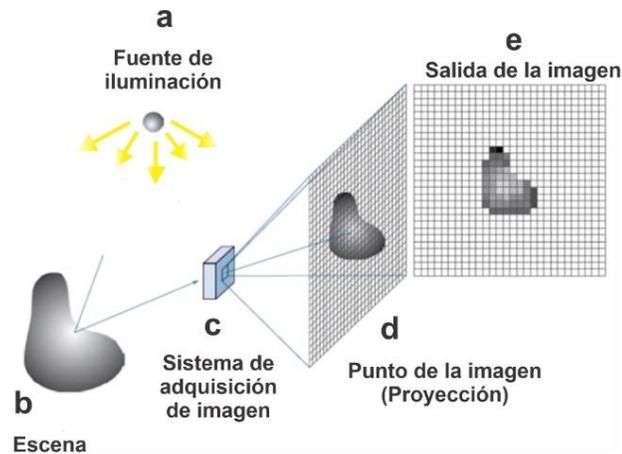


Fig. 20. Ejemplo de adquisición de imágenes digitales. (a) Fuente de iluminación (energía). (b) Una escena. (c) Captura de la imagen. (d) Proyección de la escena en el plano de la imagen. (e) Imagen digitalizada.

- **Procesamiento de imágenes**

El procesamiento y análisis de imágenes es una de las fases importantes en un OE, debido que se utilizan algoritmos y métodos matemáticos avanzados para lograr interpretar las mediciones adquiridas con él. Sin embargo, el procesamiento implica una serie de pasos previos [115, 119], que se pueden dividir en tres niveles:

- (1) Procesamiento de bajo nivel,
- (2) Procesamiento de nivel intermedio y
- (3) Procesamiento de alto nivel.

El primer nivel se presenta después de la adquisición y el almacenamiento de las imágenes, y se asocia con un preprocesamiento sencillo de la imagen, un ejemplo típico es el empleo de recortes de ellas (conocido como *clipping* por su término en inglés) para extraer solo un área de interés. El segundo nivel contempla varios pasos donde se aplican variedad de algoritmos que permitan una mejor representación y mejora de la imagen (como la segmentación). En esta etapa se persigue establecer los límites adecuados para caracterizar el tamaño y la forma de la imagen, mientras que la representación permitirá evaluar la textura y defectos de la imagen generado por el dispositivo o el posible desenfoque que deterioran el aspecto. Para finalizar, el

procesamiento de alto nivel se refiere al reconocimiento e interpretación de la imagen, esta es la etapa crucial en el procesamiento de imágenes pues permite obtener un modelo capaz de reconocer la información útil de las imágenes.

Modelado de señales en el OE

Es claro que en el diseño de un OE el procesamiento de alto nivel es sumamente relevante, pues sin él sería imposible interpretar adecuadamente la información capturada en las imágenes. Esta etapa conocida formalmente como modelado, generalmente demanda de una etapa previa de preparación de la información (preprocesamiento).

El preprocesamiento como se mencionó anteriormente puede involucrar tareas de nivel bajo o intermedio con la intención de acondicionar las imágenes para mejorar su calidad y resaltar su contenido. Esta etapa también se asocia con establecer un método matemático que permita evidenciar el contenido analítico de la información que está relacionado con los posibles patrones inherentes a ella; concluida esta etapa, se continúa con el modelado, mismo que empleando algún modelo computacional es capaz de reconocer patrones, interpreta las características extraídas en el preprocesamiento y las clasifica.

2.10 Técnicas de Interpretación de Datos

La interpretación de los datos es una parte primordial en el desarrollo de los sistemas analíticos bio-inspirados, pues esta fase se encarga de descifrar la información adquirida para la toma de decisiones. De manera general, la interpretación de los datos implica la implementación de procesos a través de los cuales se revisa la información disponible con la intención de llegar a una conclusión informada mediante el uso de alguna técnica de procesamiento de datos.

El poder extraer información útil de la información cruda y ser capaz de interpretar los datos para que puedan ser utilizados en modelos útiles para la predicción o reconocimiento, se ha convertido en una tarea compleja que hace indispensable el uso de herramientas de procesamiento multivariable.

Las técnicas de análisis multivariable permiten determinar la contribución de varios factores en un mismo evento o resultado. Estos factores están relacionados con las variables explicativas del sistema [120, 121], que en el caso de los OE suelen ser determinadas de forma experimental y están relacionadas con las imágenes capturadas de las muestras analizadas [122]. En tanto que la variable de respuesta por su parte puede estar relacionada con algún parámetro por identificar, el tipo de clase a la que pertenece o incluso un valor de concentración de algún analito por determinar.

En las últimas décadas, el incremento de capacidad de los sistemas informáticos para el tratamiento de datos ha hecho posible la implementación de potentes herramientas de análisis multivariable. Permitiendo que el modelado de datos que antaño eran imposibles de concebir, hoy sean posibles gracias al potencial de cálculo que las plataformas de cómputo actuales ofrecen.

La propuesta y desarrollo de diversos métodos basados en cálculos matemáticos, estadísticos y de lógica formal, tiene por fin establecer o seleccionar procedimientos que permitan efectuar tareas para discriminar, cuantificar, clasificar y modelar sistemas tratando de usar la máxima información relevante de los datos analíticos disponibles.

Los métodos de análisis multivariable comúnmente utilizados en los sistemas analíticos bio-inspirados comprenden [123]: Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), el análisis de clúster (CA, por sus siglas en inglés), mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés), el análisis discriminante lineal (LDA, por sus siglas en inglés), K-vecinos más cercanos (KNN, por sus siglas en

ingles), las redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés) y las máquinas de soporte vectorial (SVM, por sus siglas en inglés).

Se describen a continuación algunas de las herramientas más habituales para tratamiento de los datos, y que además han sido utilizadas en el presente trabajo.

Concretamente se introducen el análisis de componentes principales, análisis discriminante lineal, las redes neuronales artificiales y K-vecinos más cercanos.

- **Análisis de componentes Principales (PCA)**

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una herramienta de análisis de datos mediante la cual es posible conseguir información relevante de un conjunto de variables, dispuestas en una matriz (donde las filas corresponden a los objetos de estudio y las columnas corresponden a las variables medidas) mediante una transformación basada en proyecciones ortogonales de los datos. La técnica es capaz de eliminar las posibles redundancias en la información y permite reducir el conjunto de datos a una dimensión menor, siempre y cuando exista una estrecha relación lineal entre variables.

Con un análisis PCA es posible observar de forma gráfica las relaciones ortogonales que describen la variabilidad de los datos. Estas relaciones ortogonales son llamadas Componentes Principales (PCs) y son utilizadas como el nuevo sistema de ejes de coordenadas al que serán transportados los datos.

Cada PC representa un porcentaje de variabilidad del conjunto de datos original. Es así como el primer PC representa la máxima variabilidad contenida en el conjunto de datos completo, el segundo PC corresponde a la máxima variabilidad de los datos una vez excluida la primera componente y así sucesivamente hasta conseguir un número de componentes igual al número de variables consideradas. En general, las últimas componentes suelen asociarse a las pequeñas variaciones debidas al ruido

instrumental o errores producidos al momento de la medición, por lo que hasta cierto punto pueden ser excluidas. Este hecho permite que muchos autores asocien esta técnica como una herramienta de reducción de datos, aunque en realidad no lo es.

Matemáticamente un análisis PCA está representado por la siguiente ecuación.

$$X = TP^T + E = \sum_{a=1}^A t_a p_a^T + E \quad (14)$$

Donde X es la matriz que será descompuesta en el producto de una matriz de cargas P que representa los ángulos establecidos entre los ejes de coordenadas originales y los ejes del nuevo universo de datos; y una matriz de scores T que contiene las coordenadas de los datos en los nuevos ejes. Añadido a este producto una matriz E que almacena los residuos de la matriz original.

El número de componentes principales utilizado para modelar un conjunto de datos es definido mediante el porcentaje de varianza explicada que presenta cada uno de los PCs. Como los PCs se encuentran en orden de importancia, el número adecuado de componentes a utilizar estará establecido hasta que el cambio de la varianza entre una componente y otra no sea significativo.

El análisis PCA tiene gran aceptación en el ámbito de la química analítica debido a su relativa simplicidad de implementación e interpretación. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que, si los datos analizados presentan características de no linealidad, el análisis PCA carece de relevancia [124].

- **Análisis Discriminante Lineal (LDA)**

El análisis discriminante lineal (LDA) es una técnica de reconocimiento de patrones y aprendizaje supervisado que busca reducir la dimensionalidad de los datos de entrada utilizando proyecciones que sean eficientes para la discriminación. A diferencia de PCA donde las proyecciones buscan representar los datos preservando tanta variabilidad como sea posible, LDA busca proyectar los datos en direcciones que sean eficientes al momento de discriminar entre clases. La Fig. 21 muestra de manera grafica la diferencia entre estas dos técnicas.

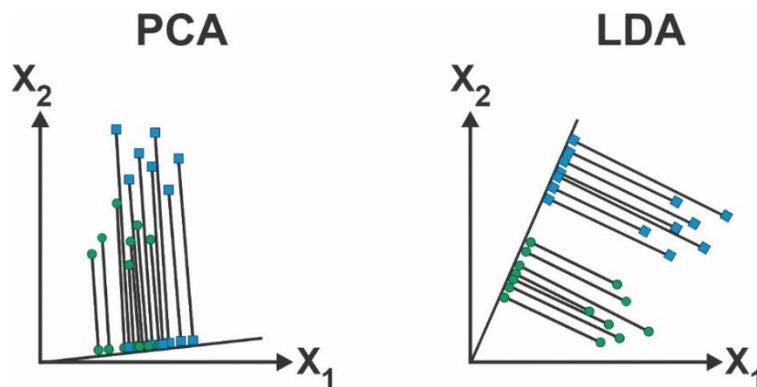


Fig. 21. Representación de PCA vs LDA

En el plano representado en la Fig 21, se muestra un conjunto de datos y dos posibles proyecciones. La proyección de la izquierda corresponde a una componente PCA y la derecha a una función LDA. Como puede apreciarse, al proyectar los datos sobre la componente PCA no existe ninguna separación entre las dos clases mientras que la proyección en LDA permite discriminar entre los dos grupos.

Se considera un conjunto de datos $X = [x_1 \dots x_n]$ con n número de muestras pertenecientes a distintas clases C_i . La función matemática que permite clasificar los datos es la siguiente:

$$g(x) = W^T x \tag{15}$$

Donde W es la proyección lineal que minimiza la dispersión de los datos dentro de la clase mediante la expresión 16 y maximiza la dispersión entre una clase y otra por medio de la ecuación 17.

$$S_w = \sum_{i=1}^c n_i (u_i - u)(u_i - u)^T \quad (16)$$

$$S_b = \sum_{i=1}^c n_i (u_i - u)(u_i - u)^T \quad (17)$$

Donde u es la media de todas las muestras, u_i es la media de la clase C_i y n_i es el número de muestras dentro de esta clase. La relación entre la dispersión dentro de la clase y la dispersión entre clases permite encontrar los ejes del espacio transformado.

Esta relación es el llamado criterio de Fisher y es representado por la ecuación 18.

$$W_{opt} = \arg \max_W \left| \frac{W^T S_b W}{W^T S_w W} \right| \quad (18)$$

Para conseguir esta relación se efectúa una generalización entre los vectores S_w y S_b de tal manera que:

$$S_b W = \Lambda S_w W = S_w^{-1} S_b \quad (19)$$

- **Redes Neuronales Artificiales**

Las Redes Neuronales Artificiales (ANN) son un modelo computacional desarrollado para imitar algunas características del cerebro humano [125]. Aunque todavía se ignora mucho sobre la forma en que el cerebro aprende a procesar la información, estudios sobre la anatomía del cerebro humano evidencian que las neuronas y las conexiones entre ellas (conocidas como sinapsis), representan la clave en el proceso cognitivo. El interés inicial en estos sistemas surgió con la esperanza de permitirnos aumentar nuestro conocimiento sobre el cerebro, la cognición humana y la percepción [126].

El éxito de estos modelos en tareas como la clasificación, la regresión y el pronóstico atrajo la atención de las diferentes comunidades científicas [127, 128], quienes por primera vez tenían a su disposición una herramienta para construir sistemas verdaderamente no lineales con una gran cantidad de variables de entrada

Una ANN trata de encontrar la relación que existen entre un conjunto de datos de entrada denominados variables independientes o descriptores y un conjunto de datos de salida llamados variables dependientes o respuestas. Esta relación entre datos de entrada y salida se lleva a cabo mediante la interconexión de elementos llamados neuronas que forman la estructura de una ANN.

La arquitectura de una ANN se caracteriza por la función activación, la topología de la red y el algoritmo de entrenamiento [129]. Los datos descriptores son presentados en la arquitectura de la ANN por la capa de entrada y conforme llegan a una capa oculta los datos son ponderados, después se efectúa una sumatoria de los datos ponderados evaluados mediante la función de activación de esta capa. Los datos son enviados posteriormente a la capa de salida, donde nuevamente son ponderados y sumados después de ser evaluados por la función de activación de esta capa (véase la Fig. 22) [130-132].

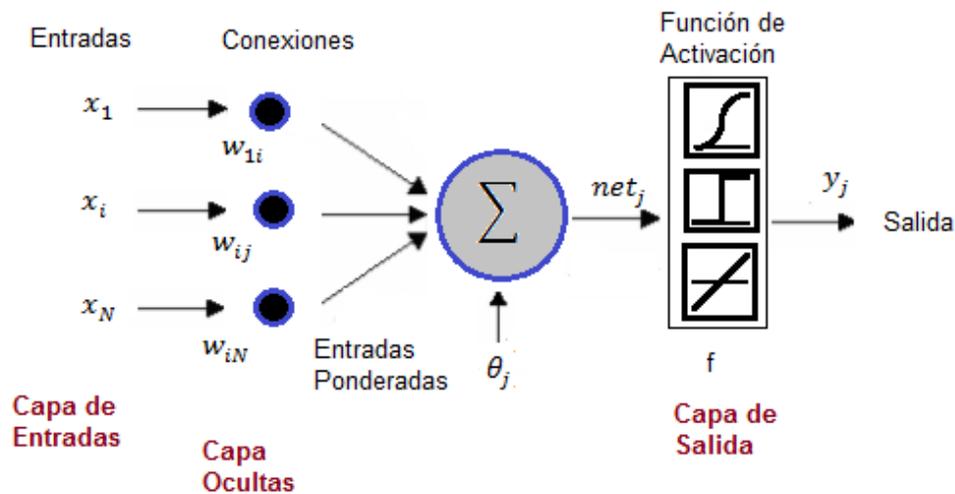


Fig. 22. Arquitectura de una ANN

Para comprender el funcionamiento del modelo, definiremos los siguientes conceptos:

Conexiones ponderadas: Hacen el papel de las conexiones sinápticas, el peso de la conexión equivale a la fuerza o efectividad de la sinapsis. La existencia de conexiones determina si es posible que una unidad influya sobre otra, el valor de los pesos y el signo de estos definen el tipo (excitatorio/inhibitorio) y la intensidad de la influencia.

Función de propagación o de red: Calcula el valor neto de la entrada total a la unidad, generalmente corresponde a la suma de todas las entradas ponderadas recibidas, es decir, de las entradas multiplicadas por el peso o valor de las conexiones, esta suma equivale a la combinación de las señales excitatorias e inhibitorias de las neuronas biológicas. Si asumimos que tenemos un número N de entradas, se tiene la siguiente definición

$$net_j = \sum_{i=1}^N W_{ji} x_i \quad (20)$$

Función de activación: Es quizá la característica principal de la neurona, y la encargada de definir el comportamiento de esta. Entre las funciones de activación más utilizadas están el logaritmo sigmoideal, tangente sigmoideal y función lineal.

Retomando lo anterior, una vez que la entrada neta de la neurona ha sido calculada, se transforma al valor de activación o activación simplemente. Este valor de activación puede escribirse como sigue:

$$a_j(k) = f(a_j(k-1), net_j(k)) \quad (21)$$

De lo anterior es posible observar que la activación $a_j(k)$ es función de la entrada total net_j y que depende también de un valor anterior de la activación $a_j(k-1)$. La notación de $k-1$ denota un paso previo antes del instante k .

En la mayoría de los casos, la activación y la entrada total son idénticas y los términos pueden intercambiarse. De este modo, el único parámetro que es modificado por la función de activación f de la neurona será directamente la suma ponderada net . Por lo que la salida de la neurona y_j está dada por la siguiente expresión:

$$y_j = f(net_j + \theta_j) = f\left(\sum_{i=1}^N W_{ji}x_i + \theta_j\right) \quad (22)$$

El término θ_j que aparece en esta última definición obedece al hecho de que la función de activación no está centrada en el origen del eje que representa el valor de la entrada total, sino que existe cierto desplazamiento debido a las características internas de la propia neurona y que difiere en cada una de ellas, por lo que su valor tan sólo representa un parámetro de ajuste y no una entrada más. Este valor es conocido como bias y representa el nivel de activación de la neurona.

Salida: Corresponde al valor calculado por la función de activación de la neurona, este valor cumpliría la función de la tasa de disparo en las neuronas biológicas.

La selección de los parámetros apropiados en una red neuronal (número de capas y neuronas, funciones de transferencia, error de entrenamiento, etc.) suele ser un proceso que se realiza a prueba y error.

El Perceptrón Multicapa (MLP, por sus siglas en inglés) es tal vez la ANN más usada en la actualidad ya que se puede aplicar en problemas de clasificación, modelado, predicción de series temporales, control discreto, etc. [133].

Dentro de los algoritmos de entrenamiento más utilizados se encuentra el de Retropropagación del Error (*Backpropagation* en inglés) y el de Regularización Bayesiana. El lector puede encontrar información más detallada al respecto en siguiente referencia [134, 135].

- **K-vecinos más cercanos**

El principio básico detrás de este método K vecinos más cercanos (kNN) es que en una instancia dada dentro de un conjunto de datos generalmente existirá en estrecha proximidad con otras instancias que comparten propiedades similares. Por tanto, se puede obtener información adicional sobre una instancia observando otras cercanas a ella, por lo que este método puede utilizarse como técnica de clasificación. Debido a la eficacia del método, se ha convertido en uno de los diez algoritmos clásicos de aprendizaje automático (*machine learning* en inglés) del siglo XXI [136].

Si las instancias dentro de un conjunto de datos están identificadas con una etiqueta de clasificación, entonces la clase de una nueva instancia se puede determinar observando las clases de sus vecinos cercanos.

Para una nueva instancia presentada y dado que el algoritmo kNN es un método no paramétrico [137], encuentra sus vecinos cercanos donde cada uno de los cuales está

identificado con una etiqueta de clase, usando la regla de decisión basada en votación por mayoría para determinar la clase predominante.

En la Fig. 23, las dos clases a identificar están representadas por "▲" y "●", con siete instancias para cada una de ellas dentro de un espacio euclidiano de valor continuo, del mismo modo se muestra una instancia desconocida, que es un nuevo punto de datos para clasificar y está representada como "■" de forma central, teniendo disponibles puntos medidos alrededor de él. Enseguida, se ordenan las distancias en orden creciente, una vez que las distancias se ordenan de esta forma, se pueden encontrar los "k" vecinos más cercanos predefinidos (vea Fig. 23b). De estos "k" la mayoría de los votos se consideran de diferentes clases y la clase dominante se le asigna al nuevo punto de datos. Por ejemplo, si $k = 3$, observe la Fig. 23c donde la clase de la instancia que se desconocía se determina identificando los tres vecinos más cercanos a partir del círculo rojo punteado y al notar que el "●" al ser de la índole dominante se le clasifica como clase "●".

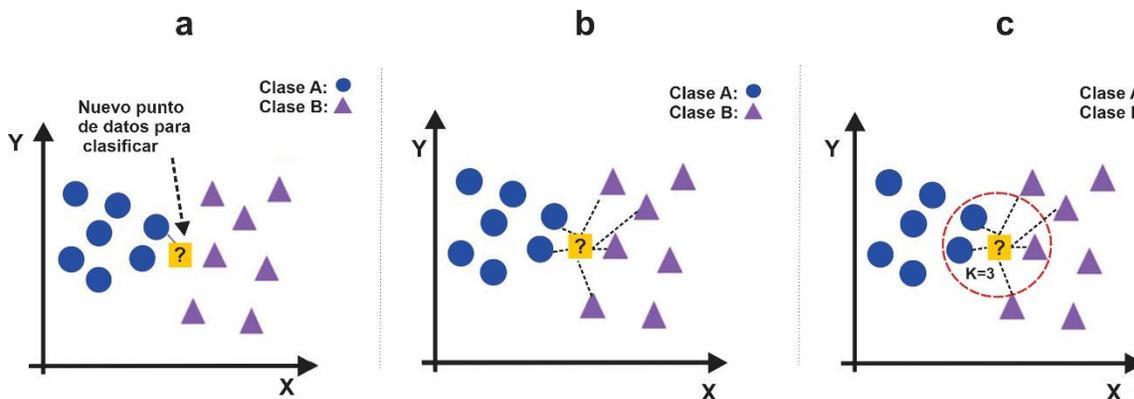


Fig. 23. Resultado del algoritmo KNN que depende en gran medida de la elección del valor k , ejemplo de clasificación cuando $k=3$. (a) Proceso inicial, (b) Cálculo de la distancia y (c) Búsqueda de vecinos y votación de etiquetas.

El método kNN para aproximar una función de valores discretos $f: \mathcal{R}^n \rightarrow \mathcal{C}$ se describe de la siguiente manera [138]:

1. Procedimiento de entrenamiento:

Para cada instancia de entrenamiento $\langle x, f(x) \rangle$, agregar la instancia al conjunto de entrenamiento. $f(x)$ tiene la forma $f: \mathcal{X}^n \rightarrow C$, donde C es un conjunto finito $\{c_1, c_2, \dots, c_{|C|}\}$

2. Procedimiento de clasificación:

Dada una nueva instancia x para ser clasificada, sea x_1, x_2, \dots, x_k denota las k instancias en el conjunto de entrenamiento que estén más cercanos (la mayoría similar) a x .

$$\text{Votos mayoritarios: } y' = \hat{f}(x) \leftarrow \operatorname{argmax}_{c \in C} \sum_{i=1}^k \delta(c, f(x_i)) \quad (23)$$

Donde δ es una función indicadora que devuelve el valor

$$\delta(c, f(x_i)) \rightarrow \delta(a, b) \therefore \begin{cases} \delta(a, b) = 1 ; \text{ si } a = b \\ \delta(a, b) = 0; \text{ en otro caso} \end{cases} \quad (24)$$

Hay varias cuestiones clave que afectan al rendimiento de kNN [136]. Uno de ellos es la elección de k . Si k es demasiado pequeño, el resultado puede ser sensible al conjunto de datos. Por otro lado, si k es muy grande, el vecindario puede incluir demasiados puntos de otras clases. Otra cuestión es el enfoque para combinar las etiquetas de clase. El método más sencillo es votar por mayoría, pero esto puede ser un problema si los vecinos más cercanos varían mucho en su distancia y los vecinos más cercanos indican con mayor fiabilidad la clase del objeto.

La elección de la medida de distancia es otra consideración importante. Aunque se pueden utilizar varias medidas para calcular la distancia entre dos puntos [139] para este método, la medida de distancia más deseable es aquella para la que una distancia menor entre dos objetos implica una mayor probabilidad de tener la misma clase. Algunas medidas de distancia también pueden verse afectadas por la alta dimensionalidad de los datos. En particular, es bien sabido que la medida de distancia euclidiana se vuelve menos discriminatoria a medida que aumenta el número de atributos.

2.11 Estado del Arte

A lo largo de las secciones anteriores, se ha establecido la importancia de la determinación del color en los alimentos, pero especialmente en las bebidas espirituosas, pues su determinación está íntimamente relacionada con el proceso de maduración o añejamiento al que se someten, permitiendo efectuar tareas como la supervisión puntal durante el proceso de elaboración, monitoreo de la calidad y la evaluación de la autenticidad del producto final.

Al respecto, resulta común que, para efectuar mediciones objetivas del color en las bebidas, se empleen sistemas analíticos convencionales principalmente basados en técnicas colorimétricas y espectrofotométricas.

En el mercado existen colorimétricos disponibles capaces de medir el color en muestras sólidas y líquidos opacos, transparentes y traslúcidos. Uno de ellos es el ColorQuest® XE. Este equipo dispone de una abrazadera ergonómica para sostener prácticamente todo tipo de sólidos o líquidos y obtener, de esa manera, mediciones precisas y reproducibles. Además, ofrece la posibilidad de acoplar diferentes aditamentos especiales. Es capaz de obtener una variedad de valores de mediciones de color para toda la escala de color posible en el espectro de 400 nm a 700 nm empleando una lámpara de xenón como iluminación. Su precio de venta al público ronda los 1,295 USD [140].

En este mismo tenor, se encuentra el sistema fotoeléctrico SD-1 de la marca Shanghai Yuefeng Instruments & Meter co, Ltd, el cual es ampliamente utilizado en la industria de la cerveza para medir el color, la malta, soluciones caramelo y líquidos de colores. Tiene una dimensión de 37cm de largo x 26cm de ancho x 21cm de alto, con una interfaz RS232 y una pantalla LCD. Su precio ronda los 125 USD [141].

Otra alternativa comercial empleando la técnica de espectrofotometría, es el que ofrece la empresa PerkinElmer®, con su modelo LAMDA35. El sistema dispone de una

bomba peristáltica, así como el uso de una sonda de fibra óptica que permite el muestreo *in-situ* lejos del instrumento para el análisis de muestras líquidas. Mientras que, para el caso de muestras sólidas, polvos y muestras pastosas cuenta con un sistema de integración en forma de esfera con alta sensibilidad para realizar su análisis. Se controla por una computadora y cuenta con 9 soportes múltiples para colocar las muestras en forma lineal y así realizar las mediciones automáticas. Tiene dos fuentes de radiación, una lámpara de deuterio y una lámpara halógena cubriendo la gama espectral de trabajo en un rango de los 190 nm -1100 nm, con una dimensión de 65 cm de largo x 56 cm de ancho x 23.5 cm de alto. El costo para la versión básica del equipo es de 6,300 USD [142].

Un sistema alternativo es el equipo de la marca Shimadzu UV-1800 UV/Visible, el cual puede ser controlado por una computadora. Es capaz de analizar líquidos y muestras biológicas al disponer de dos fuentes de iluminación mediante una lámpara de deuterio y otra de tungsteno-halógeno. Permite mediciones en un rango de trabajo de los 190-1100 nm, y solamente contiene un aditamento para colocar una muestra dentro de una celda. Su tamaño es de 45cm de largo x 49cm de ancho x 26cm de alto y tiene un costo que ronda los 13500 USD [143].

De forma común, estos sistemas instrumentales requieren de un laboratorio especializado que disponga de instalaciones adecuadas, así como de personal calificado para su operación. Además, su adquisición y mantenimiento representa un elevado costo de inversión, pues son equipos que demandan acciones preventivas que garanticen su correcto funcionamiento. Aunado a lo anterior, tampoco hay que olvidar que, aunque la información de color recolectada por ellos es fiable, no es interpretada directamente por los sistemas, esta labor queda a cargo de un laboratorista certificado.

Recientemente, las tecnologías de visión por computadora también han incursionado en los procesos destinados a extraer información a partir de imágenes digitales con la

intención de examinar atributos como el color en combinación con algún tipo de software dedicado [144].

Particularmente su uso, ha sido reportado en el estudio del color en muestras líquidas y semilíquidas, permitiendo el análisis de productos alimenticios como los néctares comerciales [145], jugo de naranja [146], café [147], té [148], aceite de oliva [149], leche [150] , miel [151] y yogurt [152]. Sin embargo, aunque en todas estas aplicaciones resulta común la adquisición de imágenes digitales de las muestras, el análisis de información capturada se basa principalmente en estudios estadísticos como ANOVA, PCA, y PLS.

Uno de los pocos sistemas comerciales que emplea este tipo de tecnología para la medición del color en aplicaciones generales, es el equipo Digi-Eye® System. Su uso en la evaluación del color en vinos tintos fue reportado por Miret Martin [153], quien estudio diferentes variedades de vino colocándolos en una copa de coctel en una posición fija a 45° para obtener sus imágenes. El sistema incluye un sistema de cámara digital, un ordenador (suministrado con el software adecuado), un sensor de color para calibrar pantallas y una caja de iluminación diseñada por DigiEye Plc, cuya dimensión va de los 86.5 cm de largo x 73 cm de ancho x 76 cm de alto, y su precio de venta al público no es accesible. El software de la computadora incluye las funciones de caracterización de cámara, medición del color, caracterización del monitor y diversas funciones especializadas para el mapeo de texturas de color, selección de zonas e identificación de solidez [154] .

En la tabla 6 pueden observarse un compendio de trabajos científicos que, empleando diferentes técnicas de detección, evalúan el color de bebidas alcohólicas. Cabe destacar que la primera mitad de ellas, reportan el uso de algunas técnicas de procesamiento en combinación con la técnica analítica de espectrometría UV-Vis. En donde resulta fundamental estudiar el comportamiento de absorción en la región visible. El resto de los trabajos, emplean tanto la técnica de colorimetría como de visión

por computadora en sus propuestas, pero no incorporan un modelado propio de la información adquirida.

Tabla 6. Estudios de color de bebidas alcohólicas y sus diferentes aplicaciones

Tipo de Muestra		Técnica Analítica	Herramienta de Procesamiento	Objetivo	Ref
1	Tequila	Espectrometría UV-Vis (SC. Lambda 35, Perkin-Elmer)	PLS-DA/ SVM	Autenticación de tipos de muestras	[52]
2			PLS-KERNEL/SVM	Clasificación no lineal de tequilas comerciales	[155]
3	Vino Tinto	Espectrometría UV-Vis (SC. Shimadzu UV-1800)	ANOVA,	Determinación del añejamiento	[156]
4		Espectrometría UV-Vis (Beckman DU-70)	ANOVA, PCA	Determinar parámetros del color	[157]
5	Vino de arroz chino	Colorimetría (SC. ColorQuest XE)	PCA, MLR, SVM, ANN	Determinación del color	[158]
6	Cachaça	Visión computadora-OE	LDA	Determinar tipos del destilado brasileño	[159]
7	Vino Tinto	Visión computadora-OE (SC. Digi-Eye® System)	-	Determinación del color	[153]
8	Cerveza, Vino, Vodka, Brandy	Varias técnicas de Visión computadora-OE	-	Determinación del etanol en diferentes concentraciones	[160]
9	Cerveza	Colorimetría (SD-1); Visión computadora-OE;	-	Determinación del color mediante análisis de imágenes	[26]
10	Cerveza lager, Vino blanco, rosado y tinto	Visión computadora-OE; Espectrometría UV-Vis (SC. Beckman DU-650)	-		[53]
11	Vodka, Whisky, Licor de frutas, Brandy	Visión computadora-OE; Espectrometría UV-Vis (SC. Shimadzu UV-1800)	-	Determinación del etanol	[161]

Sin embargo, cuando el análisis de muestras alimentarias demanda obtener información inmediata y continua, es necesario el empleo de metodologías e instrumentación analítica confiable como los sistemas bioinspirados. Las propuestas más recientes de OE para analizar bebidas alcohólicas plantean el poder utilizar instrumentos de fácil acceso para realizar la medición de forma rápida, precisa y objetiva [26],[51],[53],[153],[159],[160, 161]. De forma general, en estos trabajos se describen el uso de una fuente de iluminación dedicada junto con una cámara digital para la obtención de imágenes dentro de un algún compartimiento de color negro mate (para eliminar los efectos de la reflexión de la luz exterior)y en algunos casos el empleo de componentes de alta resistencia química [160].

En la tabla 7 se presenta un resumen con las características de operación de los OE más destacados y actualizados para analizar muestras de bebidas destiladas.

Tabla 7. Resumen de las características de los OE más destacados en bebidas destiladas

Característica	Sun Fengxia et al. [26] 2004	Gonzales -Miret et al.[153] 2007	Dos Santos et al. [160] 2015	Segura et al. [53] 2016	Pessoa et al. [51] 2017	Soussa et al. [159] 2019	Martinovic et al.[161] 2021
Tipo de Muestras	Cerveza	Vinos rojos	Cerveza, Vino, Vodka, Brandy	Cerveza lager, Vino blanco, rosado y tinto	Destilado de caña de azúcar	Cachaça	Vodka, Whisky, Licor de frutas, Brandy
Objetivo	Determinar el color de la cerveza bajo la normativa de la EBC	Determinar el color de los vinos tintos	Determinación de Etanol en diferentes concentraciones de las muestras con tinturas colorimétricas	Determinación del color mediante análisis de imágenes	Determinación de Cu para diferentes concentraciones utilizando con tinturas colorimétricas	Determinar tipos de del destilado usando técnicas de interpretación de datos	Determinación de Etanol en diferentes concentraciones de las muestras con tinturas colorimétricas
Tipo de celdas para muestras	Tubos de vidrio	Vasos de coctel	Placa de porcelana	Celda fabricada de acrílico	Placa de porcelana	Platos Petri	Cubeta de cuarzo UV-Vis
Volumen(muestra)	25.4 mL	70 mL	2 mL	35.5 mL	100 μ L	5 mL	2 mL
Sensor para la adquisición de imágenes	Cámara de seguridad Vcam CCD (Ame Corp., Taipei, Taiwan)	Camara digital Nikon D90 Eye® System	1. Sony Cyber-shot; 2. Sony DSC-W50; 3. FujilmFine PixA500s; 4. Móvil Samsung GTC6112; 5. Móvil Mod Aony Q9;	Cámara Digital Samsung ST60;	1. Sony Cyber-shot DSC-W610; 2. Sony Cyber-shot DSC-S730;	Cámara digital Microsoft® WebCam LifeCam Studio	Cámara Digital de un teléfono móvil Samsung Galaxy S10+;
Tipo de sensor	CCD	CMOS	1: CCD; 2:CCD; 3:CCD; 4: CCD ;5 CMOS:	CCD	Ambas son CCD	CMOS	CMOS
Distancia de la cámara y fuente de iluminación a la muestra	-	86.5 cm	15 cm	25 cm	15 cm	25 cm	12 cm
Megapíxeles (MP) del sensor	-	12.3 MP	1: 12 MP; 2: 6MP; 3: 5.1 MP; 4: 2 MP; 5: 0.3 MP	12.4 MP	1: 14.1 MP. 2: 7.2 MP	5 MP	12 MP
Resolución de la pantalla(píxeles)	-	1280 x 720	Para todas las imágenes de las cámaras fue un tamaño de: 42x36	40000 x 3000	1: 4608 X 3456. 2: 3072 x 2304	2880 x1620	3040x1440
ISO	-	200 a 3200	100	100	100	-	-

Característica	Sun Fengxia et al. [26] 2004	Gonzales -Miret et al.[153] 2007	Dos Santos et al. [160] 2015	Segura et al. [53] 2016	Pessoa et al. [51] 2017	Soussa et al. [159] 2019	Martinovic et al. [161] 2021
Formato de Captura	JPEG	RAW	JPEG	JPEG	JPEG	JPEG	JPEG
Iluminación	Iluminación de un cuarto de laboratorio	Diferentes iluminantes: D65	4 LED de color blancos ultra-brillantes (Bluex,12V,1 W)	LED color blanco fluorescentes de un cuarto de laboratorio	4 LED de color blancos (Bluex.)	Lámpara comercial de descarga de gas de mercurio (8 W)	Linterna de LED de un teléfono móvil
Control de Iluminación	-	Sistema para controlar diferentes tipos de iluminadores	Tarjeta diseñada para regular la intensidad y una batería recargable para alimentación (12 V,1.3 A/h)	-	Tarjeta diseñada para regular la intensidad (12 V,)	-	Teléfono móvil
Dimensiones del sistema	-	86.5 cm x 73 cm x 76 cm	21 cm x 7 cm x 15 cm	10.4 cm x 8.5 cm x 8 cm	21 cm x 7 cm x 15 cm	-	-
Espacio de color	HSI	CIE L*a*b*	RGB	RGB, CIE-L*a*b*	RGB	HSI, RGB, Escala a grises	RGB
Control del sistema para la adquisición	Manual	Automático	Manual	MATLAB®	Manual	MATLAB®	Teléfono móvil
Software para el tratamiento de la imagen	Microsoft Visual C	Programado por Digi-Eye	ImageJ	Interfaz gráfica de usuario en MATLAB®	ImageJ	MATLAB®	Gimp 2.10 (Google play app)

Dentro de las características descritas en la tabla anterior, varios elementos importantes a destacar es el uso frecuente del espacio de color RGB, al igual que de cámaras digitales con resoluciones que van desde los 0.3 MP hasta los 14.1 MP. En general, el empleo de estas características brinda la oportunidad de adquirir y procesar imágenes de buena calidad.

Es también importante hacer notar que algunos de los trabajos mencionados describen el uso de ciertas tinturas colorimétricas que permiten resaltar las variaciones de color en las muestras analizadas con la intención de evidenciar atributos que permitan establecer diferencias entre las bebidas. Un trabajo que puede dar indicios de esta tecnología mediante el uso de histogramas obtenidos de un espacio de color es el de Soussa [159], quien empleando espectrofotometría es capaz de identificar la tonalidad de la bebida cachaça asociada a su añejamiento. Sin embargo, en lo que al análisis de tequila se refiere, no existen reportes que describan el uso de un OE para su caracterización con la intención de categorizar variedades por su añejamiento. Lo que convierte al OE en una nueva alternativa para el estudio de esta bebida.

Capítulo 3. Metodología

Este capítulo se encuentra dividido en cuatro secciones principales. La primera sección describe la solución propuesta de este trabajo. La segunda sección expone a detalle el diseño del OE y su funcionamiento. También se explica el desarrollo experimental llevado a cabo para la fabricación de los calibradores colorimétricos que dan pie a la funcionalidad del OE. La tercera sección describe la instrumentación empleada en las distintas etapas experimentales. Y finalmente, la cuarta sección describe los tipos de modelos computacionales propuestos para la construcción de los clasificadores destinados a interpretar las imágenes digitales.

3.1 Solución propuesta

Tal y como se evidenció en los capítulos anteriores, aunque existe una amplia variedad de los métodos instrumentales convencionales en el sector de bebidas destiladas, existe la necesidad urgente alternativas analíticas que sean rápidas, económicas, portátiles y efectivas capaces de efectuar mediciones confiables y no destructivas. Particularmente en este sector, el uso de sistemas bioinspirados es escaso, sin embargo, debido a las prestaciones que ofrecen los convierte en una herramienta adecuada para llevar a cabo la evaluación de las bebidas destiladas como el Tequila.

El presente trabajo tiene por fin establecer los fundamentos necesarios para la construcción de un ojo electrónico (OE) que, imitando el principio tricromático de la visión humana, permita el análisis de diferentes tipos de tequila. En este sentido, el OE capturará imágenes digitales de las muestras, evaluará indirectamente la absorbancia y mediante un modelo computacional las clasificará en categorías relacionadas con el añejamiento.

La Fig. 24 muestra un diagrama comparativo de las etapas del OE y la visión humana, en ella es posible establecer el principio básico para el reconocimiento muestras de tequila.

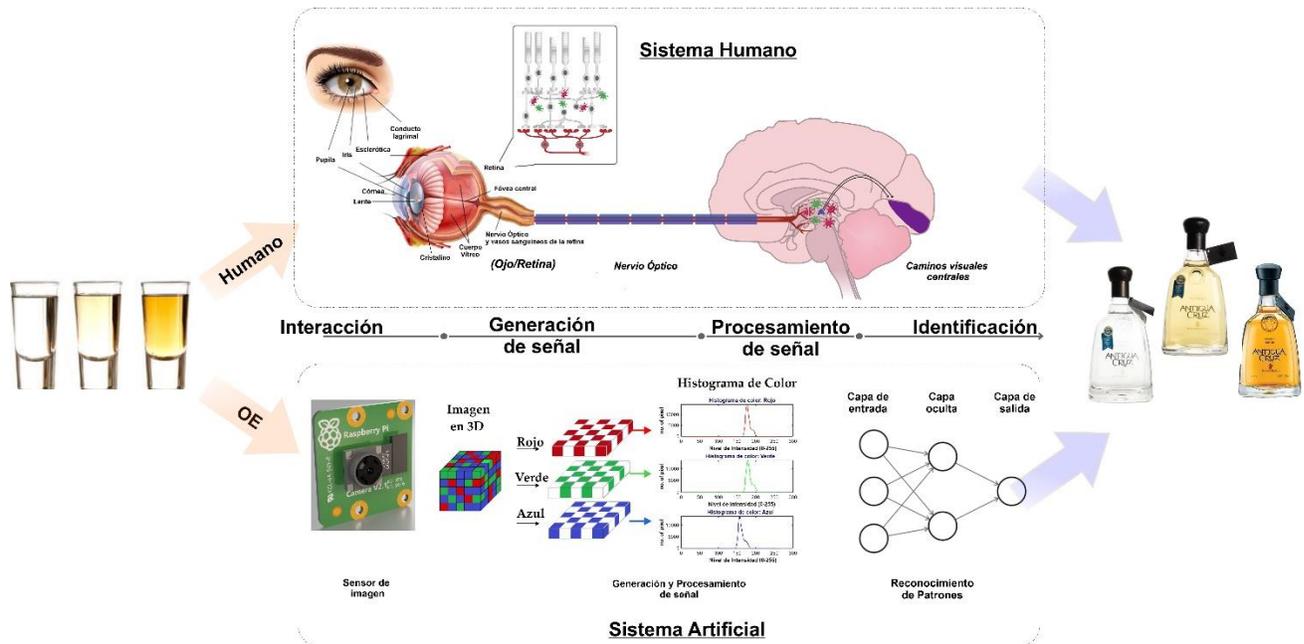


Fig. 24. Diagrama del proceso general del sentido de la vista humano y ojo electrónico (OE)

El desarrollo del OE requiere de una metodología de diseño que involucra las etapas siguientes:

1. La instrumentación electrónica del OE necesita de una tecnología de visión por computadora, compartimientos adecuados y dispositivos auxiliares de control para su operación.
2. El OE será controlado mediante una computadora embebida encargada de gestionar el funcionamiento a través de una interfaz que facilite su operación y el proceso de almacenamiento de la información adquirida.
3. Se considerará una etapa de pretratamiento de imágenes digitales obtenidas de las muestras bajo estudio con la intención de acotar el área de interés en las capturas y evaluar la absorbancia empleando el espacio de color RGB.
4. Con la información preprocesada, se establecerán modelos LDA, KNN y ANNs que permitan categorizarlas para conseguir su clasificación. Estos modelos computacionales estarán implementados en un entorno de MATLAB® R2020b.

- Finalmente, se considerarán las etapas experimentales suficientes que permitan por un lado caracterizar la respuesta del OE desde el punto de vista colorimétrico, así como para validar los resultados de identificación obtenidos con él, mediante el uso de un espectrómetro UV-Vis comercial Mod. S2100UV+ capaz de analizar el rango visible de la luz.

El diagrama a bloques de la Fig. 25 muestra la plataforma general propuesta para el análisis de muestras de tequila. Aquí es posible observar de forma puntual las características necesarias para el diseño que darán funcionalidad al sistema. Las tres etapas principales son marcadas por recuadros. El principal de ellos en color rojo, indicando los elementos propios de la instrumentación electrónica del OE. Por su parte las etapas de procesamiento digital de imagen y el de análisis se encuentran en color negro.

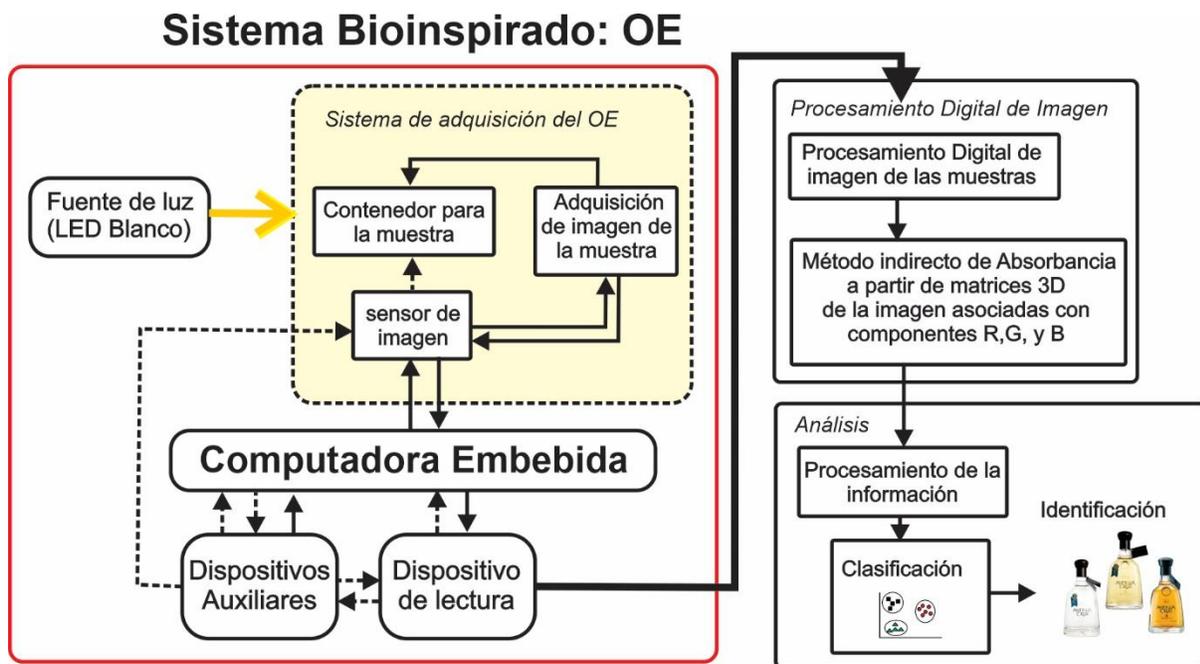


Fig. 25. Diagrama de bloques de la plataforma de OE. (Flecha punteada conexiones internas; Flecha negra control electrónico y transferencia de datos; Flecha amarillo incidencia de luz;)

El prototipo del OE se construirá de forma modular mediante modelos diseñados en SolidWorks versión 2016 y fabricados mediante un método de manufactura aditiva empleando una impresora XYZprinting Da Vinci 3D ver. 1.1.

3.2 Prototipo de OE

El diseño electrónico del OE toma como fundamento la técnica de espectrofotometría del sistema reportado por Rocha A. en 2016 [125], sin embargo, se realizó un rediseño completo del prototipo para implementar en él la técnica de visión por computadora. El OE consta de elementos esenciales como son: la iluminación a partir de una fuente de luz, un módulo de cámara capaz de capturar imágenes digitales, un dispositivo de almacenamiento y una pantalla para interactuar con el usuario. Todos los elementos son controlados de forma automática mediante una computadora mediante una interfaz de usuario.

El prototipo tiene por fin analizar muestras de forma individual al integrar un único compartimiento capaz de alojar una cubeta desechables UV-Vis, PMMA (marca Brand GMBH, Wertheim, Germany). El dispositivo diseñado basa su funcionamiento en la adquisición de la imagen de la muestra a través de una cámara digital, quien a partir de incidir un haz de luz sobre la muestra en estudio, captura la imagen que después es procesada para medir la intensidad del haz luminoso emergente de la muestra aplicando la ley de Lambert-Beer [103].

El fenómeno físico que se mide ocurre cuando la luz sigue su camino desde la muestra, pasa a través del objetivo de la cámara y llega al sensor de imagen, durante este proceso se pierde parte de la intensidad de la luz. Este efecto se debe a que, una vez que el haz de luz atraviesa la cubeta UV-Vis de material transparente que contiene la muestra, su intensidad varía debido a los fenómenos de absorción, reflexión y transmisión [98-101]. En este sentido, es posible comparar la intensidad de luz transmitida por un estándar (que en nuestro caso se trata de una solución patrón o también conocida como blanco) y la intensidad de luz de la muestra de interés. Este procedimiento permite obtener una absorbancia experimental, de acuerdo con lo descrito por la Ec. 25:

$$A_{\lambda experimental} = \log \left(\frac{I_{solvente}}{I_{solución\ del\ analito}} \right) \quad (25)$$

donde $A_{\lambda experimental}$ es evaluada por el $I_{solvente}$ relacionado con la solución en blanco (agua desionizada) considerada como muestra patrón, y la solución de interés que corresponde a cada muestra de tequila a analizar.

Tomando como referencia lo anterior, el sistema del OE cuenta con una arquitectura dividida por bloques como se muestra en la Fig. 26. Inicialmente se requiere de una iluminación a partir de la fuente de luz LED (a), posteriormente se hace la gestión de la captura de la imagen de la muestra recibida por el sensor de imagen (b). Una vez que las imágenes son adquiridas son recibidas por la computadora y almacenadas (c), para este proceso el usuario indica el directorio en donde se almacenaran las imágenes y posteriormente se hace la adquisición de la imagen del proceso (b). Para la visualización y control, el usuario cuenta con un dispositivo de lectura (d) que permite la gestión del sistema y mostrar las imágenes capturadas para su previsualización. Estas imágenes almacenadas son posteriormente preprocesadas, considerando una región de interés (ROI) de la imagen de la que se obtienen los valores de absorbancia experimental empleando el espacio de color RGB. Este proceso se efectúa tanto para la cada una de las muestras de tequila y de la muestra patrón. Finalmente, los valores de absorbancia calculados son interpretados para poder identificar entre tipos de tequila con la ayuda de herramientas avanzadas de procesamiento (f).

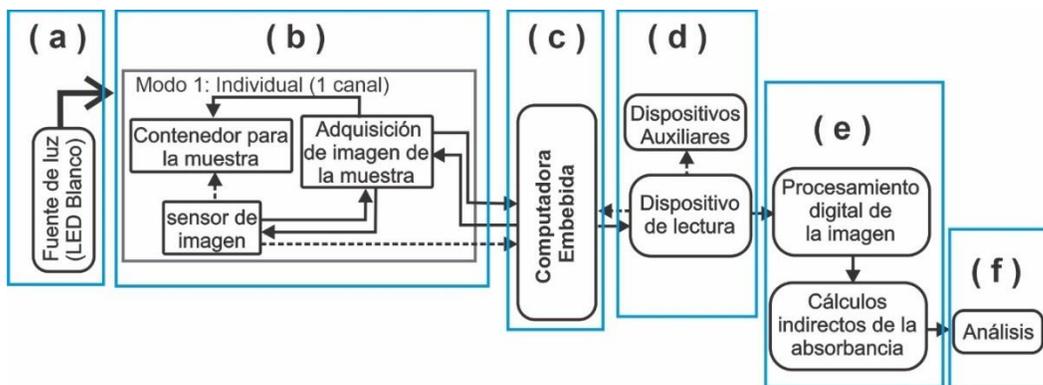


Fig. 26. Esquema de las etapas de la captura, registro y análisis de imágenes del OE

La integración en etapas del esquema presentado en la Fig. 26, permitió obtener un diseño modular que hace uso del siguiente hardware:

- Para la iluminación se utilizó como fuente de luz un diodo emisor de luz (LED) blanco 2xLED a partir del módulo de linterna flash LED de un dispositivo móvil Huawei, Mod. LYA-L09 (Shenzhen, Guangdong, China).
- Un módulo de cámara (Raspberry Pi-camera V2) el cual tiene un sensor de imagen CMOS (Sony IMX219) con enfoque fijo de 8 megapíxeles para realizar la adquisición de imágenes, con una resolución de 3280 x 2464 píxeles que dispone de un conector CSI de 15 pines para hacer la vinculación con la microcomputadora.
- Una microcomputadora (Raspberry Pi 3, mod. B+), con el sistema operativo Raspbian. Para su operación fue necesario la programación de las librerías de usuario para gestionar el OE y el sistema de adquisición de imagen haciendo uso del software Python IDLE 2.7.
- Un dispositivo de interfaz de usuario utilizando una pantalla de cristal líquido (LCD) de 7 pulgadas (Hilitand, Mod.hfpq73zx89) y un teclado genérico.
- Un receptor de muestras que funge como contenedor/canal para colocar las cubetas UV-Vis, construido mediante impresión 3D cuyo diseño incluye una adaptación para acoplar el módulo de cámara.
- Cubetas de plástico desechables semi-micro UV-Vis (BRAND, Wertheim, Germany), con certificado ISO 9001-14001 y una dimensión de 12.5 mm x 12.5 mm x 45 mm y su rango de longitud de onda es a partir de los 340nm-800 nm

En el Apéndice 1, se muestra el diagrama electrónico de interconexión de los dispositivos mencionados.

Estos componentes electrónicos interactúan siguiendo el diagrama a bloques que se muestra en la Fig. 27. En donde se puede observar que la coordinación del control del sistema queda subordinado a la computadora embebida Raspberry Pi 3B+, que se encarga de la gestión de captura de imágenes digitales a través de la Pi-camera,

mediante las solicitudes de usuario a través de teclado y pantalla. El proceso de captura de imágenes de las muestras considera una iluminación constante de la fuente luz sobre el contenedor (canal).

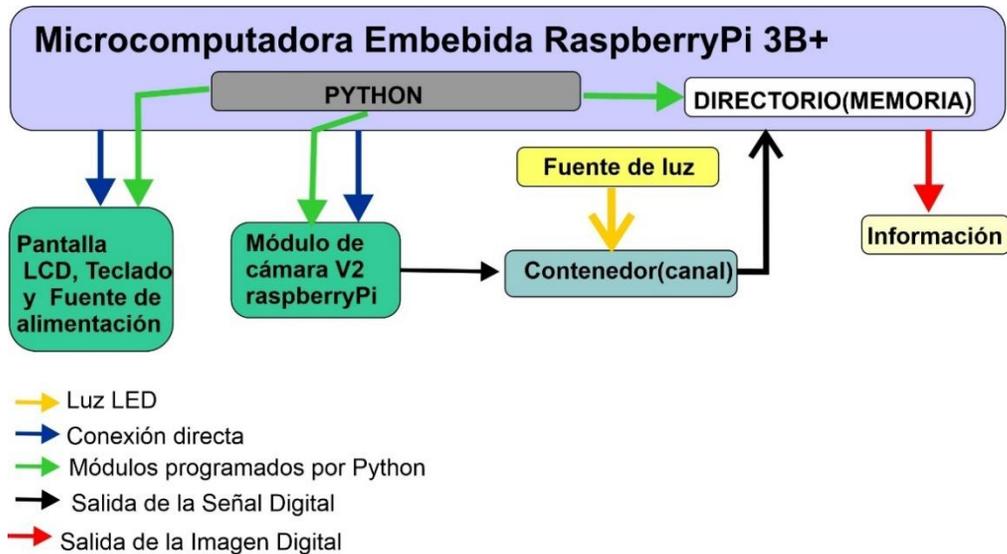


Fig. 27. Diagrama a bloques de la interacción entre los dispositivos que componen al OE

Para la operación completa del OE, se dispone de un set completo de instrucciones para su control (vea Tabla 8).

Tabla 8. Intrucciones que permiten ejecutar el dispositivo del OE

Modalidad	Instrucción/Función	Acción
Individual	Pi camera	Librería que proporciona la interfaz en Python, para el módulo de la Cámara Raspberry Pi para Python 2.7 (o superior) o Python 3.2 (o superior)
	def CameraON():	Permite la habilitación de la cámara, a una configuración a 2592 x 1944
	def CameraOFF():	Permite la activación de apagado de la cámara
	def TomarFoto()	Con ayuda de esta función es posible realizar la captura de solo una foto.

La programación del OE se realizó con un lenguaje multiplataforma de código abierto utilizando el software Python. El proceso simplificado del control se presenta en el diagrama de flujo de la Fig. 29.

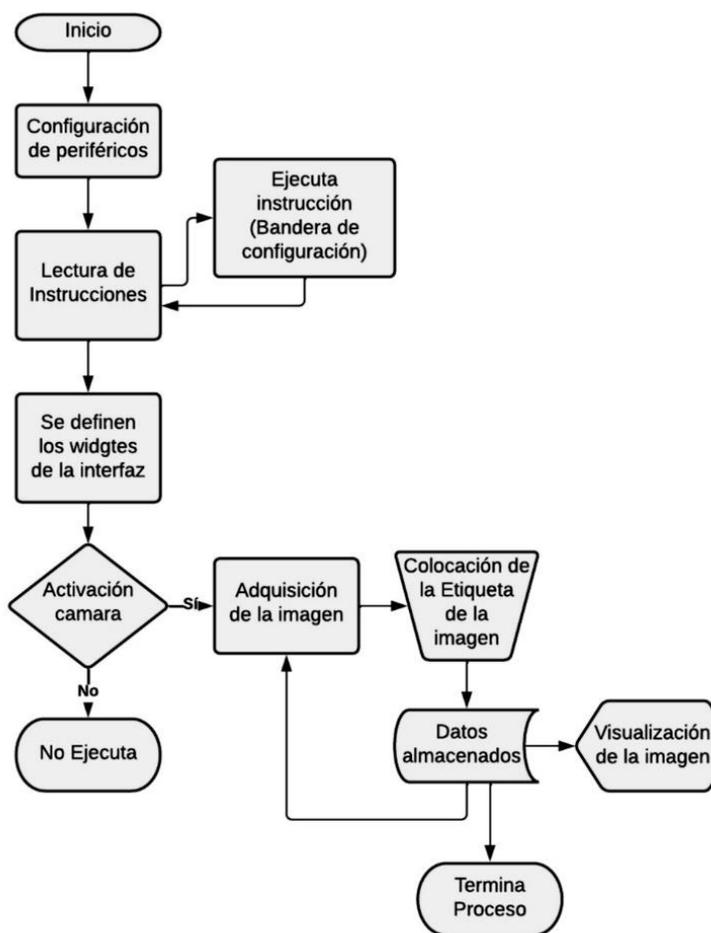


Fig. 28. Diagrama de flujo de programa de control del OE

Para la construcción del OE se consideró el uso de materiales con alta resistencia química y capaces de proteger su interior de la luz externa ambiental durante el proceso de medida con la finalidad de reducir las interferencias ópticas que afecten al sistema óptico diseñado. Se optó por emplear el plástico acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) que forma parte de los termoplásticos más usados en la manufactura aditiva. En este sentido, los modelos fueron impresos utilizando la impresora Da Vinci 3D 1.1 empleando filamento ABS de color negro de un calibre de 1.75 mm de la marca 3Dpn plastic y MC3d México respectivamente.

Adicionalmente, también se elaboraron piezas de ensamble para realizar el acoplamiento para los diferentes modos de operación del OE, así como la carcasa del dispositivo de lectura y el cubo contendedor destinado a recibir las muestras y acoplar el sensor de imagen. Una vez que los diferentes componentes electrónicos del OE se colocan en la estructura modular diseñada y se confirma la operatividad del sistema mediante el programa de control y la interfaz de usuario, es posible desarrollar las etapas experimentales enfocadas a la caracterización de respuesta del propio OE y a la de las muestras de tequila de interés. Así como aquellas tareas de validación que confirmen la correcta operatividad del OE.

3.3 Etapas experimentales

3.3.1 Caracterización de la fuente de luz del OE

El módulo de la fuente de luz se compone de un diodo emisor de luz (LED) blanco 2xLED de tipo flash Mod LYA-L09. Este dispositivo se encuentra integrado al módulo de linterna (ver Fig. 29) conocido como luz de flash de la cámara (número de parte 03025EQN).



Fig. 29. Módulo de linterna Huawei utilizado como fuente de luz para el OE

Como parte fundamental del diseño del OE, es necesario evaluar la cantidad de luz proyectada sobre la superficie interior del contenedor/canal del sistema. Este proceso se llevará a cabo usando un medidor digital de Iluminancia/Luz de la marca NEEWER mod. NW1130B para obtener la cantidad de lux (lumen). Para dicha caracterización se consideró una superficie de 0.1701 m^2 . Para efectuar las mediciones, la fuente de luz

LED se colocó en la parte superior de la carcasa del sistema (vea Fig. 30), en donde se localiza un orificio de dimensiones de 3 cm x 3 cm, mediante el cual se permite incidir la luz blanca emitida por el LED de forma directa al plano de trabajo. Este procedimiento se realizó considerando diferentes distancias relacionadas con la posición de distintos tipos de compartimientos.

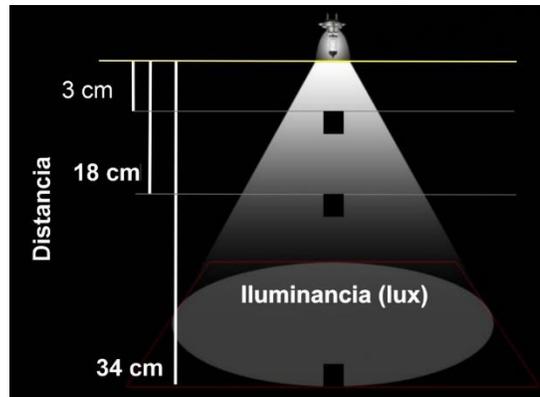


Fig. 30. Esquema representativo de la iluminancia en el sistema del OE

3.3.2 Caracterización colorimétrica del OE

Una de las primeras caracterizaciones en un sistema óptico destinado a evaluar el color presente en las muestras bajo estudio es la respuesta colorimétrica. En este sentido, el OE se sometió a una caracterización de respuesta al color empleando patrones colorimétricos que permitan calibrar el módulo de la cámara Raspberry Pi V2. Con la clara intención de asegurar la trazabilidad en las mediciones del OE a partir de la técnica espectrofotometría usando patrones de medida que servirán para poder identificar el color estándar de estos patrones y posteriormente conseguir relacionar el color de las muestras de interés (bajo estudio) con ellos.

Para esta tarea, se elaboraron un conjunto de calibradores (muestras patrón) destinados a evaluarse con el OE diseñado. Estos patrones de color se elaboraron a partir de una mezcla homogénea de caucho de silicón RTV615A y el catalizador RTV615B (ambos de la empresa Momentive Performance Materials). La combinación de estos materiales permite conseguir un encapsulado solidificado con alta resistencia

química y a la intemperie, capaz de conservar sus cualidades estructurales ante variaciones térmicas. Considerando lo anterior, se decidió incluir a la mezcla diferentes tintas colorimétricas genéricas de colores rojo, azul y amarillo para conseguir la gama de colores del espectro.

Una vez que la mezcla de cada muestra patrón es preparada, se colocaron una cámara desgasificadora con una capacidad de 25 mm de Hg con el fin de extraer las burbujas que se pudieran generar durante la preparación, dejando un tiempo de reposo de 12 hrs. Posteriormente se realizó un tratamiento de curación colocando todas las muestras en un horno de convección (Mod. redLine, BINDER GmbH) a una temperatura de 30 °C por 24 hrs con el fin de conseguir la solidificación de los materiales y facilitar su manipulación.

En la Fig. 31, se muestran los patrones colorimétricos elaborados dentro de las cubetas UV-Vis que se usaran para el análisis espectrofotométrico con el OE.



Fig. 31. Calibradores colorimétricos

Finalmente, en la Tabla 9 incluye la descripción de elaboración de estas 10 muestras patrón, junto con la muestra de referencia (silicón sin tinta), integrando la relación de 10:1 de componentes de caucho de silicón y el volumen de tinta añadido.

Tabla 9. Relación 10:1 de dos tipos de caucho de silicón para las muestras calibradoras

Descripción	Etiqueta de Calibrador	Relación 10:1		Tintas		
		Silicon A	Silicon B	Rojo	Azul	Amarillo
Silicon sin tinta	CB	5.01 g	0.501	-	-	-
Fucsia	C1	5.074 g	0.501 g	3.2 μ l	-	-
Naranja claro	C2	5.023 g	0.502 g	2 μ l	-	1.2 μ l
Naranja	C3	5.027 g	0.503 g	1.2 μ l	-	2 μ l
Amarillo	C4	5.069 g	0.527 g	-	-	3.2 μ l
Verde muy claro	C5	5.042 g	0.514 g	-	2 μ l	2.4 μ l
Verde aguamarina	C6	5.008 g	0.525 g	-	2 μ l	1.2 μ l
Verde Claro	C7	5.013 g	0.501 g	-	1.2 μ l	2 μ l
Azul Marino	C8	5.013 g	0.510 g	-	3.2 μ l	-
Morado	C9	5.006 g	0.505 g	2.2 μ l	1.2 μ l	-
Morado claro	C10	5.020 g	0.520 g	1.2 μ l	2.2 μ l	-

3.3.3 Análisis de muestras de tequila con el OE

Una vez que el prototipo del OE es calibrado considerando la distancia óptima de la fuente de luz y la caracterización colorimétrica se llevó a cabo, es posible utilizarlo en el estudio de muestras de tequila. Además de las consideraciones mencionadas de operativas mencionadas en las secciones anteriores, dado que la vista frontal del contenedor/canal diseñado tiene una abertura, se optó por colocar un fondo de color blanco, de forma similar a lo que equipo comercial DigiEye realiza para la visualización de las muestras.

De esta forma la fuente de luz se coloca a 3 cm en un plano cenital centrado para mejorar la precisión y la adquisición de imágenes (esta posición es muy utilizada para el estudio de muestras con superficies planas) [111]. El diagrama presentado en la Fig.32 se muestra la configuración del OE para la medición de muestras de tequila, donde la sección A muestra un diagrama del manejo interno del sistema y la sección B de su implementación.

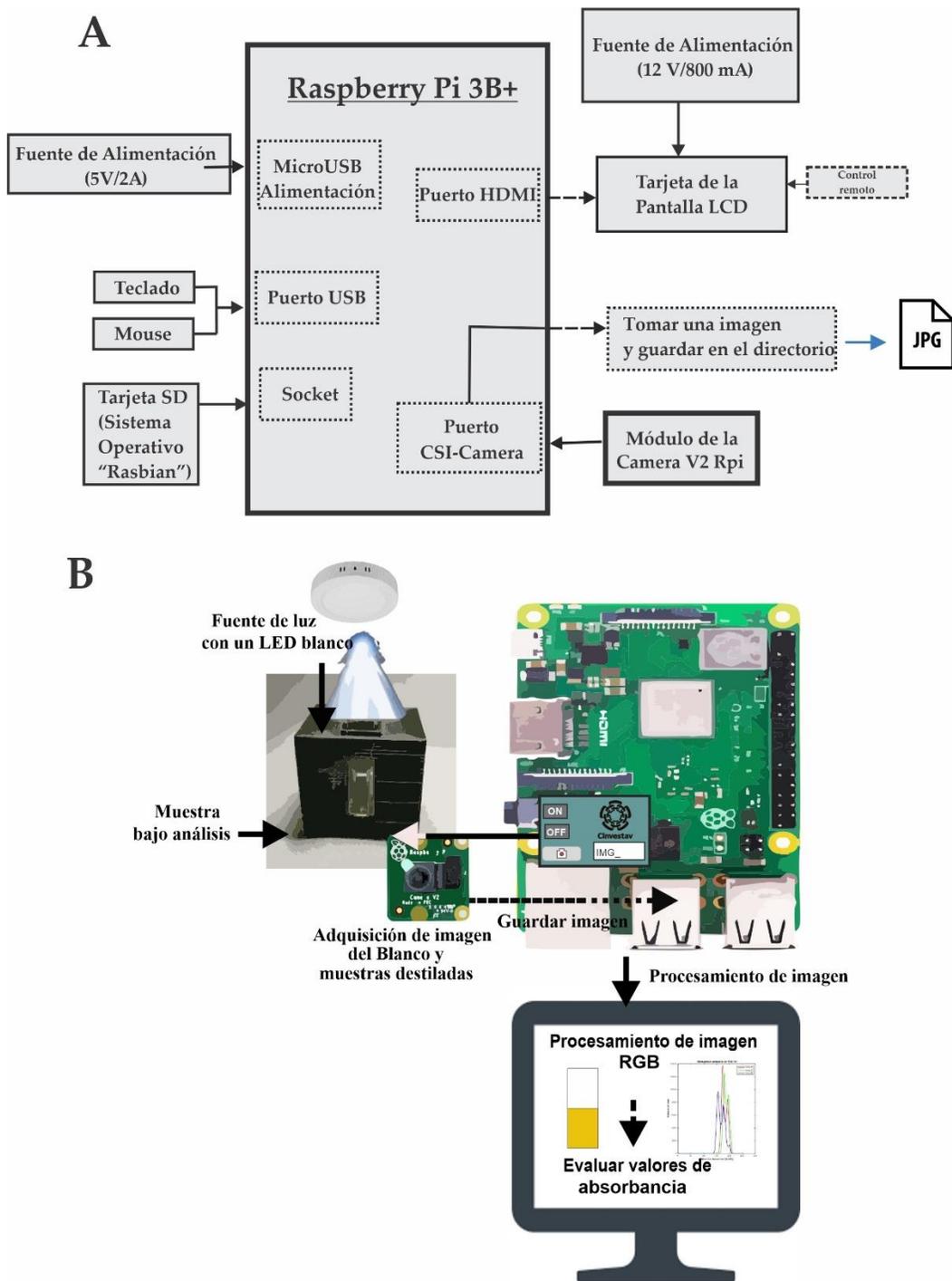


Fig. 32. Configuración del sistema OE: (A) Diagrama Interno del funcionamiento del OE, (B) Diagrama a bloques del sistema OE PRO

Para el conjunto de muestras de tequila se eligieron 25 muestras de diferentes marcas, todas ellas con DO, elaboradas con 100% de agave y con certificación del CRT para asegurar su autenticidad. El conjunto se integró considerando los tres tipos de tequila: blanco, reposado y añejo. No se consideró el uso de tequilas con otros porcentajes de agave o con aditivos añadidos en su elaboración (reportados en su etiqueta contenido). El conjunto formado de las muestras de tequila se presenta en la tabla 10. Dentro del total de las muestras, 23 se elaboran en casas productoras del estado de Jalisco y 2 en el estado de Guanajuato.

Tabla 10. Clasificación de las botellas de Tequila según el tipo descrito en el etiquetado

Característica	Número de muestras	Tipo	Etiqueta de subgrupo	Número de muestras
Clase de Tequila	25	Tequila Blanco	B	8
		Tequila Reposado	R	12
		Tequila Añejo	A	5

Todas las medidas experimentales se realizaron en un ambiente controlado en laboratorio (temperatura ambiente de 25 °C). El proceso para medir las muestras de tequila utilizando el OE considera los siguientes pasos:

1. Tras abrir cada botella de tequila, se tomó inmediatamente su contenido para evitar la evaporación de alcohol de la muestra. Se utilizó un volumen de 1 mL de destilado para llenar directamente (sin pretratamiento alguno) las diferentes cubetas UV-Vis libres de polvo y suciedad para obtener imágenes fidedignas.
2. Una cubeta UV-Vis con el mismo volumen de agua desionizada se utilizó como solución blanco o referencia.
3. La primera muestra medida con el OE correspondió a la solución blanco para establecer una señal de referencia del sistema. Posteriormente, se midieron una a una las cubetas UV-Vis que contenían diferentes muestras de tequila.
4. Las imágenes digitalizadas capturadas se registraron y almacenaron mediante el software de control programado.

Durante toda la etapa experimental, se aseguró que la cámara permaneciera cerrada durante el proceso de captura de imágenes para evitar la entrada de luz externa y obtener imágenes de buena calidad. Mientras tanto, la fuente de luz blanca permaneció encendida, a la espera de que el módulo de la cámara adquiriera la imagen y la enviara al ordenador Raspberry Pi.

Cada muestra se analiza por triplicado, realizando 10 repeticiones cada vez para observar la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas. El tiempo para completar el proceso de medición por el sistema OE es de aproximadamente 10 s.

A partir de las imágenes capturadas por el OE de cada muestra de tequila y de las tres categorías implicadas, se guardaron los archivos por separado en formato jpeg en la memoria de la Raspberry Pi; el tamaño por imagen es de 2,7 MB (resolución de 8 MP, 2592 x 1944 píxeles).

Las imágenes capturadas son preprocesadas considerando un proceso de selección y recorte de una región de interés (ROI), esta etapa se realizó utilizando MATLAB® 2020. La ROI se eligió teniendo en cuenta la ventana de visualización de la cubeta UV-Vis. Esta zona recortada de la imagen y su posición respecto al soporte de la muestra es siempre constante. De este modo, el conjunto completo de imágenes se recortó especificando la posición de un rectángulo y se guardó como un archivo independiente con un nuevo tamaño de 1244 x 231 píxeles. Teniendo en cuenta que las imágenes digitales son una representación numérica de un conjunto bidimensional de datos, una imagen digital contiene un número fijo de filas y columnas de píxeles donde cada píxel se especifica para las coordenadas rojas, azules y verdes de una matriz de píxeles, esta conceptualización de la imagen está relacionada con la teoría tricromática descrita en el apartado 2.5. Como resultado de estas imágenes, se puede observar en la Fig. 33 que es posible representarlas como matrices tridimensionales asociadas a componentes RGB, permitiendo analizar la distribución de color a partir de un histograma y posteriormente evaluar la absorbancia experimental [162] .

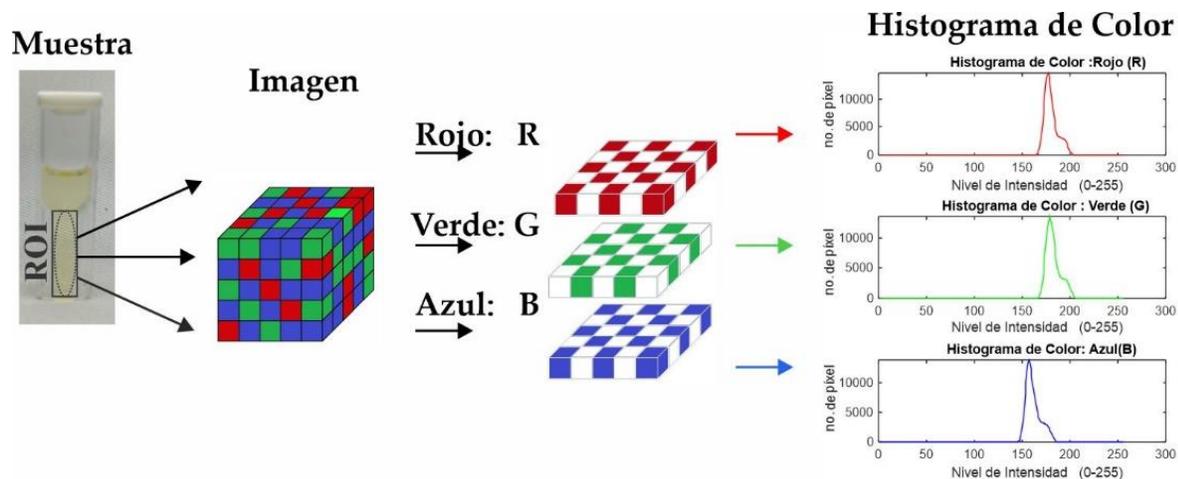


Fig. 33. Selección de ROI de la imagen de muestra de tequila añejo y análisis RGB

De esta forma y a partir de la descomposición en el espacio de color RGB se evalúa la absorbancia experimental de acuerdo con lo reportado en la sección 3.2. Para identificar si existe semejanza entre las medidas para agrupar los tipos de tequila estudiados, se realizó un análisis PCA como método preliminar de *clustering* y posteriormente considerar el uso de diferentes tipos de clasificadores.

3.3.4 Uso de la técnica UV-Vis para la validación del OE

Para garantizar la respuesta del OE en el análisis de muestras de tequila. El sistema diseñado se comparó utilizando un espectrofotómetro comercial mod. S2100UV+ (United Products & Instruments Inc., Dayton, USA) de doble haz, capaz de efectuar un análisis UV-Vis completo. Este equipo utiliza dos fuentes de luz para el rango espectral de trabajo y son: una lámpara de deuterio (200 nm-390 nm) y halógena de tungsteno (390 nm-1000 nm). Los datos de absorbancia se midieron con una resolución nominal de 1 nm en la región de los 200nm-700 nm, utilizando una celda cuarzo de 2 mm de espesor de la marca PerkinElmer (mod. B0631009).

El software que utiliza el equipo para operar se llama UNICO_Test®, el cual permite elegir los parámetros de inicialización para realizar la corrida del espectro. Antes de realizar los barridos de las muestras, se realiza la medición con una solución de

referencia a partir de un blanco, en este caso se utiliza la celda de cuarzo para que se llene de agua desionizada (18.2Ω de conductividad) y se hace el correspondiente barrido para asegurar un espectro de línea de base. Es importante hacer la limpieza de la celda para evitar interferencias con las huellas de dedos y sustancias contaminantes antes de realizar la medición del blanco para evitar tener resultados erróneos. El tiempo que tarda en hacer la lectura del blanco, abarca desde los 200 nm a los 1000 nm, es aproximadamente de 10 minutos. Después se realizan las medidas de cada una de las muestras de tequila en un rango de los 200 nm-700 nm. Al contar con una sola celda de cuarzo, esta se tiene que enjuagar de tres a cinco veces con la solución blanco, para eliminar la muestra residual precedente y secar el interior con aire a presión cuidadosamente después de cada medición, para continuar con el experimental.

El formato de lectura de la información es arrojado en un archivo “.tst” el cual incluye hora y fecha de la prueba, su rango fotométrico de absorbancia: 0 a 3 Abs , y se muestran tres columnas de datos, el cual incluye el rango espectral, la absorbancia y la transmitancia. Para la manipulación de la información, este tipo de formato fue convertido en un fichero de Excel delimitado, debido que el origen del archivo es MS-DOS(PC-8) y se busca la forma de separarse en: tabulación y coma, para que el formato de los datos permita estar en columnas. Los valores elegidos para formar la base de datos y procesarlos en Matlab® son: el rango longitudinal y los valores de absorbancia de todo el espectro utilizado. De esta forma las 25 muestras de tequila analizadas con el OE son medidas con el equipo S2100UV+ (véase la Fig. 34) para obtener el espectro de absorbancia completo.



Fig. 34. Espectrómetro comercial S2100UV+

La intención de realizar la validación del OE es con el fin de realizar una comparativa y ver su respuesta en absorbancia en ambos equipos, así como también buscar la forma de poder relacionarlos (véase la Fig. 35). Anteriormente se explicó la manera de obtener la información que se necesita a partir de una imagen digital en el OE, su procesamiento al descomponer dicha imagen en un espacio de color RGB y partir de ello, obtener valores puntuales de la absorbancia por cada muestra de tequila.

Para el caso de la técnica del UV-Vis, la información se presenta en un gráfico de absorbancia en función de la longitud de onda, donde la información se presenta más a menudo como un gráfico de absorbancia en el eje vertical y, para el caso longitud de onda en el eje horizontal x. Este gráfico se suele denominar espectro de absorción, donde se tienen tantos valores de absorbancia dependiendo del barrido espectral.

Al escoger una longitud de onda del UVVIS que tenga una similitud al OE, podría ser lo óptimo para comparar entre sistemas, así como seleccionar todo el barrido completo del UV-Vis de absorbancias y generar modelos a partir de herramientas inteligentes que permitan interpretar la salida de esta información.

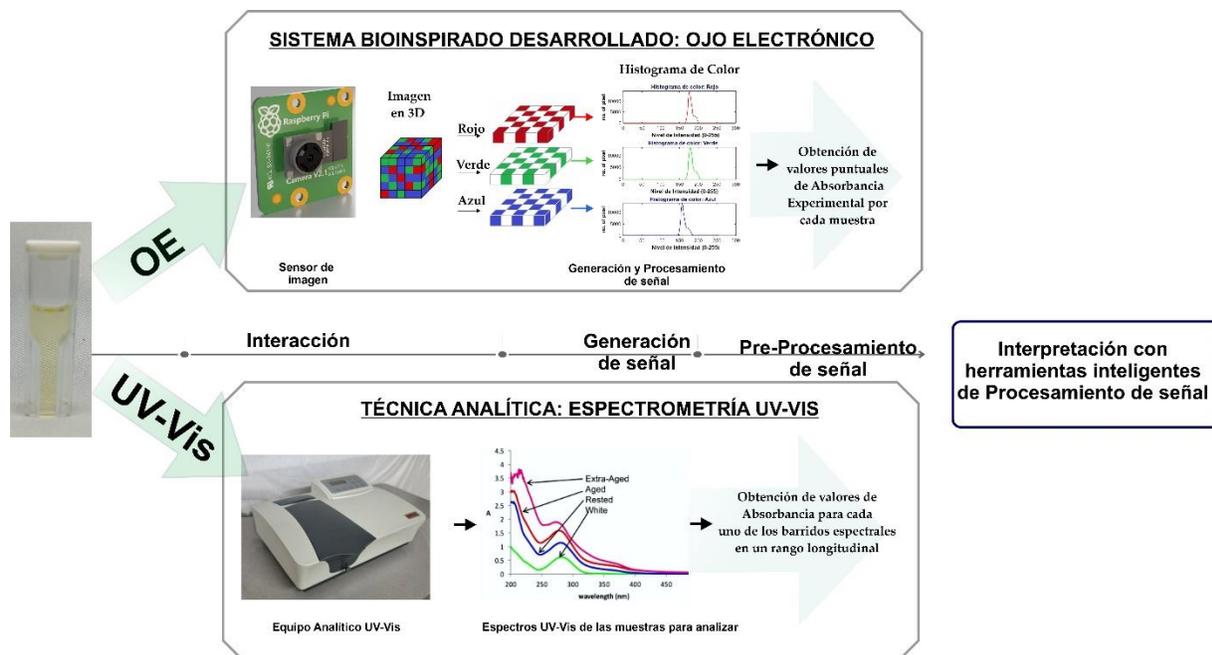


Fig. 35. Comparativa OE y Técnica Analítica UV-Vis

3.4 Modelado de información

Las diferentes etapas de procesamiento de los datos de las imágenes y el modelado se llevaron a cabo utilizando rutinas específicas escritas en MATLAB®2020b basadas en funciones incluidas utilizando el Toolbox de Statistics and Machine Learning Toolbox (v11.7).

Antes de llevar a cabo cualquier modelado de datos, se decidió obtener información sobre las características de la tonalidad de las imágenes adquiridas para corroborar el ajuste óptico del equipo. Para ello, se obtuvieron los histogramas de cada componente RGB para cada imagen disponible y posteriormente se calcularon las absorciones RGB experimentales. Estos valores calculados se utilizaron como entrada para los diferentes métodos de análisis: PCA, LDA, KNN y ANNs.

Con el fin de observar la similitud de las respuestas que arroja el OE y los datos de los espectros que arroja el barrido del UV-Vis es posible aplicar un enfoque en forma individual y en conjunto de las técnicas en varias etapas basado en: PCA + LDA, PCA + KNN, PCA+ ANN. Para garantizar la robustez del modelado, las respuestas de clasificación de cada tipo de clasificador se utilizó un procedimiento de validación cruzada dejando uno fuera (*Leave-one-out* cross-validation: LOOCV, siglas en ingles). Este método iterativo comienza utilizando como conjunto de entrenamiento todas las observaciones disponibles excepto una, que se excluye para utilizarla como validación en la etapa de prueba.

En la tabla 11 se resume la estrategia de modelado propuestos con el fin de identificar el comportamiento entre clasificadores y técnicas de análisis, para evaluar la eficacia del OE vs UV-Vis.

Tabla 11. Modelos propuestos en diferentes etapas

Individual		Conjunto (OE más UV-Vis)	
OE	UV-Vis		
PCA	PCA	PCA	
PCA+LDA	PCA+LDA	OE+ una longitud representativa del UV-Vis: PCA+LDA	Todos: PCA+LDA
PCA+KNN	PCA+KNN	OE+ una longitud representativa del UV-Vis: PCA+KNN	Todos: PCA+KNN
PCA+ANNs	PCA+ANNs	OE+ una longitud representativa del UV-Vis: PCA+ANNs	Todos: PCA+ANNs

Capítulo 4. Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos de las diferentes etapas experimentales descritas en el capítulo anterior.

4.1 Caracterización de la fuente de luz del OE

Para la caracterización de la fuente de luz empleada por el OE, se optó por considerar diferentes distancias entre dicha fuente y la ubicación en donde se coloca la muestra por analizar. Este proceso también consideró la presencia de tipos de iluminación típicos relacionados con el área de una oficina. Los resultados de estas medidas se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Parámetros de Iluminación proyectados sobre un area determinada

Área de la estación (lux) [163]	Distancia (altura en cm)	Lux (lx)	Pie-candela (FC)	Plano de trabajo
Sala de diseño, sala de asuntos: 2000~1500	3 cm	1482	141.5	Celda Individual
Sala de equipos portátiles, salón de acto:750~300	18 cm	361	33.8	Base Montura
Sala de vigilancia nocturna: 150~75	34 cm	98.7	9.25	Base sin monturas

Posteriormente se construyó una gráfica lx vs Distancia para evidenciar la respuesta de la intensidad lumínica de la fuente en relación con su posición. Para ello se consideró ajustar los tres puntos de medida anteriormente descritos y ajustar la tendencia de las medidas. Como resultado se obtuvo un ajuste exponencial (vea Fig. 36) con un error cuadrático medio (ECM) de ajuste de 0.762×10^{-3} . Se utilizó Origin Pro-2016® tanto para evaluar el ajuste como para la generación del gráfico.

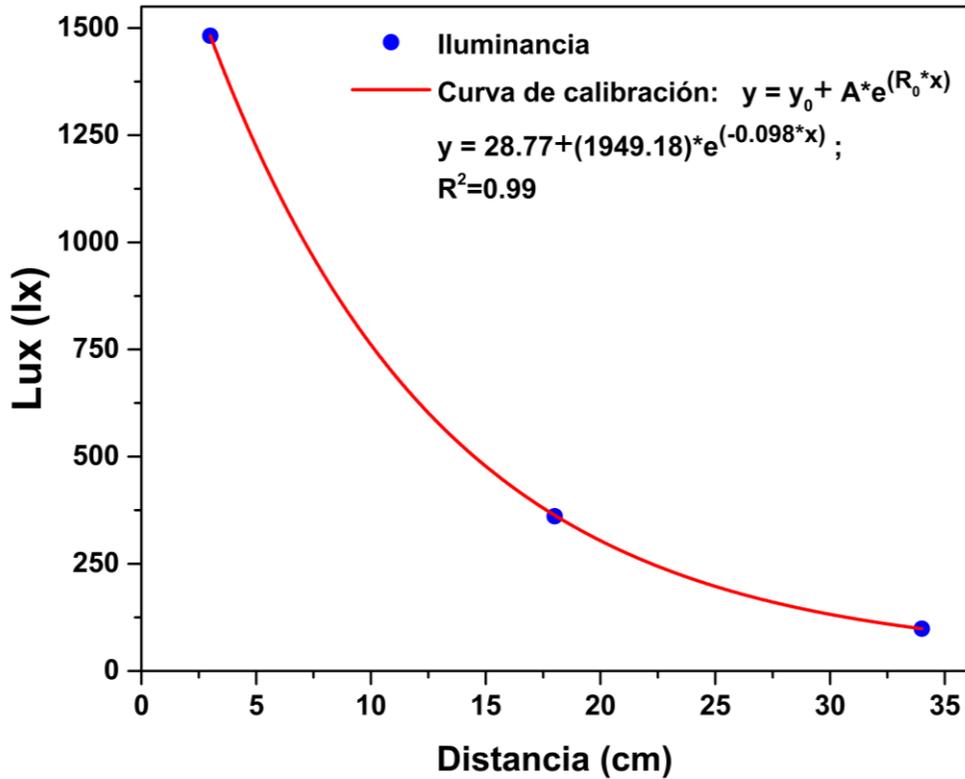


Fig. 36. Caracterización del LED blanco en un plano de trabajo

En la Fig. 36 es posible evidenciar que a medida que aumenta la distancia, la luminancia disminuye gradualmente, este efecto se asemeja a lo reportado por Lianghui [164]. Dado que la luminancia es una medida de la luminosidad con la que se ilumina una zona, cada unidad de lux indica la cantidad de flujo luminoso (lumen) de la fuente de luz que llega por unidad de superficie de un receptor. En este sentido, utilizar la distancia de 3cm asegura obtener la mejor iluminación posible (mayor cantidad de lux).

4.2 Caracterización colorimétrica del OE

Para llevar a cabo la caracterización colorimétrica del OE, cada uno de los calibradores fabricados se colocó uno a uno dentro del compartimiento/canal de análisis del OE y se realizó el proceso de adquisición de imagen descrito en la sección 3.2. Las primeras capturas de imagen obtenidas por la cámara Raspberry Pi V2 se presentan en la Fig. 37. Aquí es posible notar que el módulo de la cámara presenta un claro desenfoque con la configuración de fábrica, provocando una evidente distorsión de la imagen de cada una de las muestras analizadas.



Fig. 37. Imágenes de calibradores colorimétricos (cámara con ajuste de fabrica)

Para mejorar la nitidez de las imágenes, fue necesario realizar un ajuste manual de la lente de la cámara hasta conseguir una posición adecuada en la que se consigan captar imágenes nítidas de la muestra al interior del contendedor/canal diseñado (vea Fig 38).

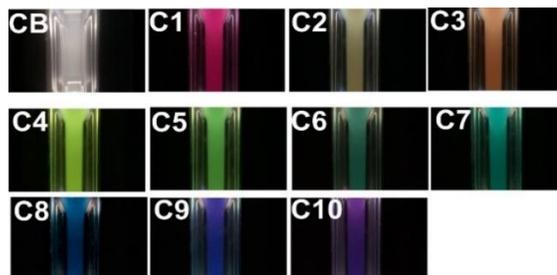


Fig. 38. Imágenes de calibradores colorimétricos (cámara ajustada)

Una vez que las imágenes son capturadas con la nitidez adecuada (vea Fig. 38), se emplea el algoritmo programado en la plataforma de Matlab® para seleccionar la región de interés (ROI) de la imagen que se asocia con la sección con mayor nitidez de la imagen y que es coincidente con el canal central de la cubeta UV-Vis empleada. Posteriormente se analizan los valores de intensidad de pixeles y se realiza la descomposición la imagen en sus 3 diferentes componentes RGB.

Para el análisis de las imágenes de los calibradores, se realizaron 5 pruebas con 10 repeticiones de lectura por cada calibrador con la intención de observar la repetibilidad en el proceso de adquisición de imágenes. En la tabla 13 se observan los valores de descomposición RGB obtenidos de cada uno de los calibradores antes y después del proceso de ajuste de la lente de la cámara. Aquí es posible evidenciar que la determinación de los componentes (de 0-255) para cada calibrador colorimétrico consigue coincidencias de los colores con la cámara correctamente ajustada a diferencia de los valores obtenidos con el ajuste de fábrica.

Tabla 13. Componentes RGB obtenidos de la cámara Raspberry Pi V2, antes y después de su ajuste

Calibrador	Con ajuste por default			Con ajuste correcto de la lente		
	R	G	B	R	G	B
CB	248±0.548	238±0.894	248±0.548	249±0.894	239±0.548	248±1.414
C1	220±0.707	168±0.548	242±0.548	181±0.894	37±1.581	97±0.447
C2	233±1.483	213±1.095	199±0.707	160±0.707	156±0.707	118±1.095
C3	232±0.548	232±1.0	80± 5.367	189±0.894	131±0.548	90
C4	239±0.548	223±1.304	190±0.837	165±0.548	206±0.837	82
C5	236±0.707	231±0.548	215±0.894	103±0.447	171±0.548	82±1.414
C6	115±0.894	216±0.447	171±0.837	10±0.548	151±0.894	137±0.707
C7	198±0.894	221±0.548	199±0.447	60±0.707	114±0.707	95±0.548
C8	208±0.548	232±0.548	228±0.548	81±0.837	90±0.548	151±1.225
C9	187±0.894	191±0.548	220±0.894	111±1.342	58±1.095	146±0.707
C10	218±0.548	219±0.548	219±0.894	108±0.894	25±0.447	160±0.894

De esta forma es posible notar que una vez logrado el ajuste óptico de la cámara, las muestras con tonalidades roja/naranja, amarilla/verde, azules/moradas arrojan valores

de intensidad en pixeles de la componente RGB muy representativos del color real de la muestra, permitiendo su diferenciación entre ellas, caso contrario a cuando existe el desenfoque de la lente, debido a que la distorsión provoca que calibradores como el C1 (con tonalidad roja) se le asocie predominantemente una componente azul (B), el C3 (con tonalidad naranja) tenga mayoritariamente una componente verde (G) y por ultimo las tonalidades amarilla/verde C4 y C5 se relacionen con la componente roja (R).

Una vez que el ajuste óptico del OE permitió de detección adecuada del color. También se evaluaron los histogramas de los calibradores para cada una de las componentes RGB obtenidas y se calcularon las absorbancias experimentales correspondientes (vea Apéndice 2).

Finalmente, los calibradores fueron analizados empleando un espectrómetro comercial UV-Visible (Agilent Technologies, Mod. 8453, Waldbronn- Alemania) aplicando un barrido que va desde 300 nm hasta los 1100 nm. La Fig. 39 muestra el espectro de absorción medido. Si se realiza un acercamiento a la imagen en el intervalo de 700 a 800 nm, es posible observar una separabilidad de los patrones diseñados, por lo que, en este caso particular, a una longitud de onda de $\lambda=740$ nm, se permite obtener un valor de absorbancia propicio capaz de discriminar a cada uno de los calibradores. Ahora bien, no solamente este punto es representativo, existe otro punto casi al iniciar el barrido espectral, es por ello por lo que se tienen dos puntos álgidos en la señal, en 345 nm y en 740 nm. En la tabla 14 se presentan los valores de absorbancia medidos en estos dos puntos representativos con el equipo considerando que la muestra de referencia CB se calibró a 0 nm.

Tabla 14. Absorbancias máximas en el rango de los 345 nm/740 nm

Calibrador	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Abs_{345nm}	1.469	1.417	1.055	1.295	0.504	2.255	0.778	2.072	1.049	0.511
Abs_{740nm}	0.833	0.494	1.103	1.160	0.270	2.025	0.229	1.455	0.897	0.322

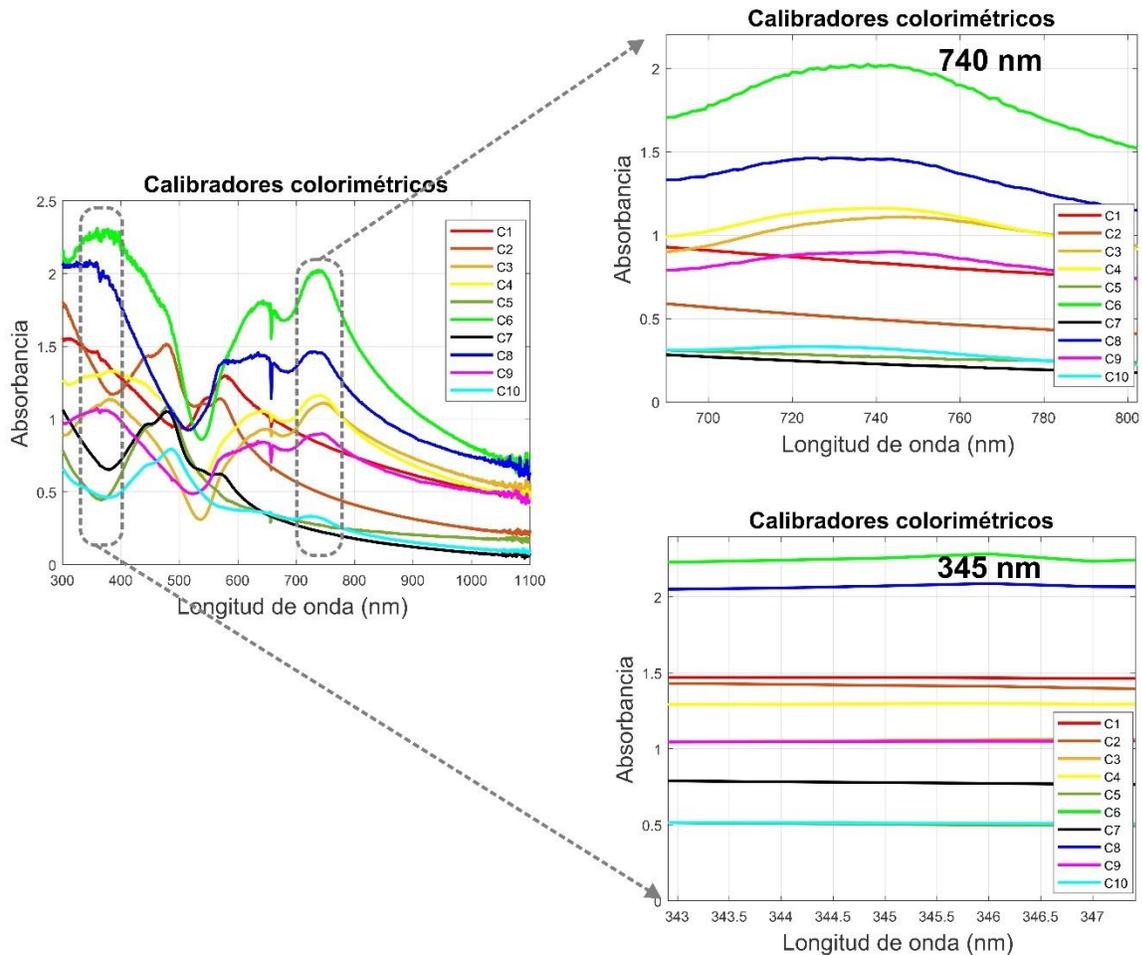


Fig. 39. Señales en el UV-Vis de los calibradores colorimétricos

A partir de estos valores de absorbancia es posible establecer que el calibrador identificado como C6 de tonalidad verde, posee una mayor absorbancia en comparación con los demás patrones. Este efecto también es replicado por el OE al obtener una absorbancia experimental superior (aunque de menor magnitud) que en el resto de los patrones analizados (consulte la tabla del Apéndice 2). La diferencia de magnitudes se debe en gran medida a que el OE utiliza una fuente de luz fija con una longitud de onda aproximada de 345 nm. Es evidente que en el OE no se pueden ver todos los espectros como en el UVVIS, porque se está trabajando en una longitud de 345 nm.

4.3 Análisis de muestras destiladas en el OE

Tal y como se describió en el capítulo anterior, el OE se utilizará para relacionar la tonalidad de los tres tipos principales de tequilas con el proceso de añejamiento característico durante su proceso de elaboración. La tabla 15, describe las 25 muestras de tequila seleccionadas, junto con algunas de las características reportadas por el fabricante.

Tabla 15. Clasificación de las botellas de Tequila según el tipo descrito en el etiquetado

No.	Etiqueta	Marca	Tipo	Alcohol (%Vol)	Contenido Neto	Lote
1	B1	Hornitos	Blanco	38	200 mL	52FP610410
2	B2	Orendain	Blanco	38	250 mL	LB1928A4134
3	B3	Don Nacho	Blanco	38	50 mL	29DNEXB0319
4	B4	Corralejo	Blanco	38	100 mL	19043007
5	B5	Dos Coronas	Blanco	38	50 mL	LMX10619L65
6	B6	Sombrero Negro	Blanco	35	50 mL	7501054837442
7	B7	Antigua Cruz	Blanco	40	350 mL	7465
8	B8	Herradura	Blanco	46	50 mL	10019536
9	R1	Hornitos	Reposado	38	200 mL	52FP610619
10	R2	Jimador	Reposado	35	200 mL	10027341
11	R3	Jarana	Reposado	35	200 mL	7501043710572
12	R4	Don Nacho	Reposado	38	50 mL	17DNEXR1218
13	R5	Cabrito	Reposado	38	750 mL	LT-NMR-280
14	R6	Antigua Cruz	Reposado	40	350 mL	6232
15	R7	Don Julio	Reposado	40	50 mL	75060643000283
16	R8	Dos Coronas	Reposado	38	50 mL	LMX12119LG7
17	R9	Sombrero Negro	Reposado	38	50 mL	7501054837459
18	R10	Reserva del señor	Reposado	35	50 mL	7501054837183
19	R11	Cazadores	Reposado	38	50 mL	L19085MC43
20	R12	José Cuervo	Reposado	38	50 mL	L6110127
21	A1	Corralejo	Añejo	38	100 mL	19062102
22	A2	Don Nacho	Añejo	38	50 mL	37DNEXR1219
23	A3	Antigua Cruz	Añejo	40	350 mL	7409
24	A4	Cazadores	Añejo	38	950 mL	L1626MC36
25	A5	Hornitos	Añejo	35	750 mL	52CO6111059

El análisis de estas muestras se realizó siguiendo las indicaciones descritas en la sección 3.3.3. El resultado final del ensamble del prototipo del OE se muestra en la Fig. 40.

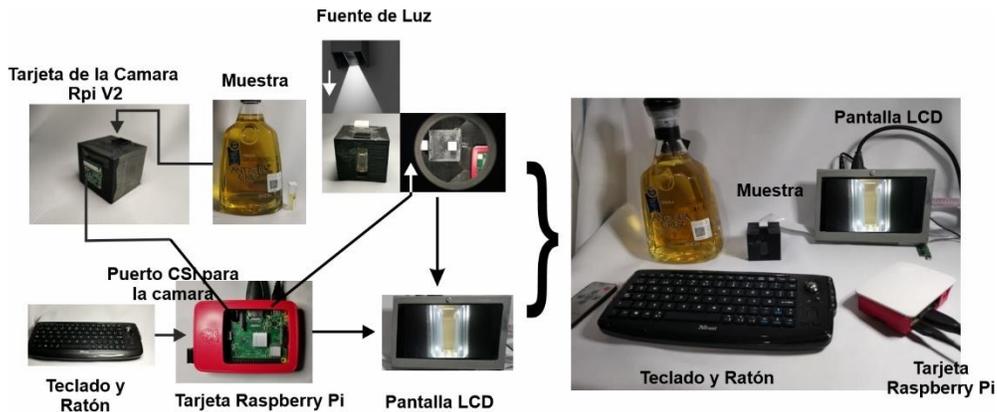


Fig. 40. Diagrama esquemático del Ojo Electrónico desarrollado mostrando las diferentes partes electrónicas ensambladas y la interfaz de comunicación utilizada.

Las imágenes digitales se obtuvieron después de colocar una cubeta UV-Vis con una muestra de tequila en el OE. En todos los casos, los ajustes de cámara utilizados en los experimentos fueron fijos (tiempo de exposición de 1/16 s, apertura de f/2 e ISO 100). Considerando que cada muestra se analiza por triplicado, realizando 10 repeticiones cada vez, se capturaron un total de 750 imágenes. Para cada una de estas imágenes, se seleccionó un ROI especificando la posición de un rectángulo y se guardó como un archivo independiente con un nuevo tamaño de 1244 x 231 píxeles.

En la Fig. 41 se muestran las imágenes de cuatro muestras analizadas por el OE, que corresponde al patrón de referencia (agua bidestilada) y a un tequila por clase (blanco, reposado y añejo). Las líneas negras discontinuas dentro de la imagen de la cubeta UV-Vis denotan el área de imagen seleccionada por el ROI. Al igual que en la etapa experimental anterior, se evaluaron los histogramas a partir de los componentes RGB de las imágenes, evidenciando la presencia de píxeles rojizos, verdosos y. A partir de

ellos es posible observar, que tanto la distribución de estos componentes de color como su intensidad son claramente diferentes para cada tipo de tequila.

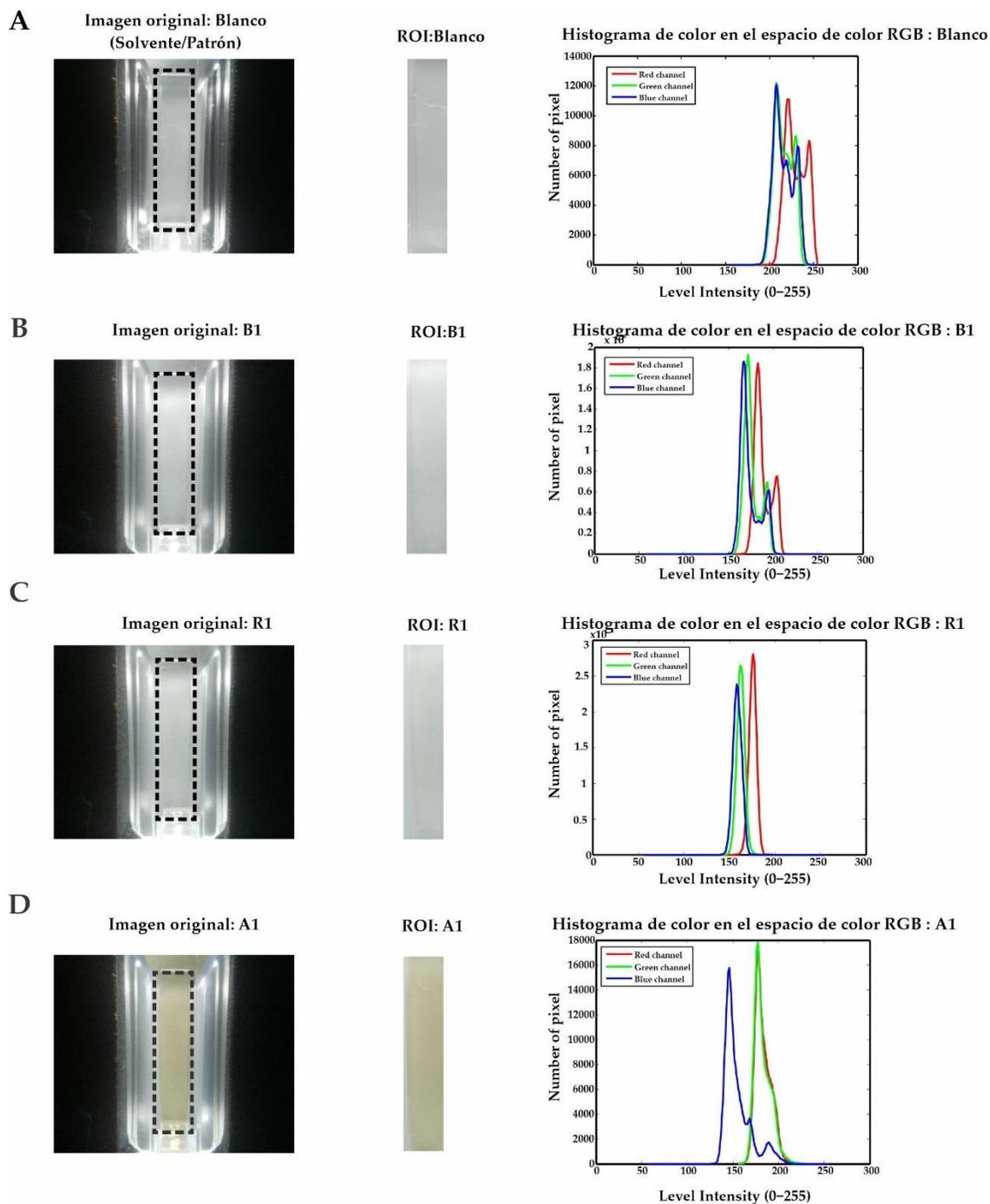


Fig. 41. Imágenes representativas de: (A) Solución en blanco, (B) tequila blanco, (C) tequila reposado y (D) tequila añejo.

El lector puede consultar el Apéndice 3, que integra las imágenes obtenidas por el OE, ROI e histograma de componentes RGB de las 25 muestras analizadas.

Para el análisis de las imágenes adquiridas, se optó por organizarlas en una matriz de dimensión 30×75 , donde las filas corresponden al número total de repeticiones (3 pruebas con 10 repeticiones para cada prueba), y las columnas representan las 25 muestras de tequila analizadas por triplicado. Las intensidades de los componentes RGB se resumen en la tabla 16 junto con los valores de la absorbancia de cada componente RGB y la absorbancia total de las muestras (empleando la ecuación 25). Las etiquetas que incluyen B se refieren a tequilas blancos, R a tequilas reposados y A para tequilas añejos

Para visualizar el comportamiento de las absorbancias RGB de las diferentes muestras de tequila, se construyó una gráfica de radar. En la Fig. 42A se puede observar un patrón o huella característica del conjunto completo de imágenes capturadas por el OE de las muestras de tequila que integran tres categorías diferentes, mientras que la Fig. 42B representa la absorbancia general de cada tequila. Esto permite obtener un único valor que sea representativo para cada muestra analizada.

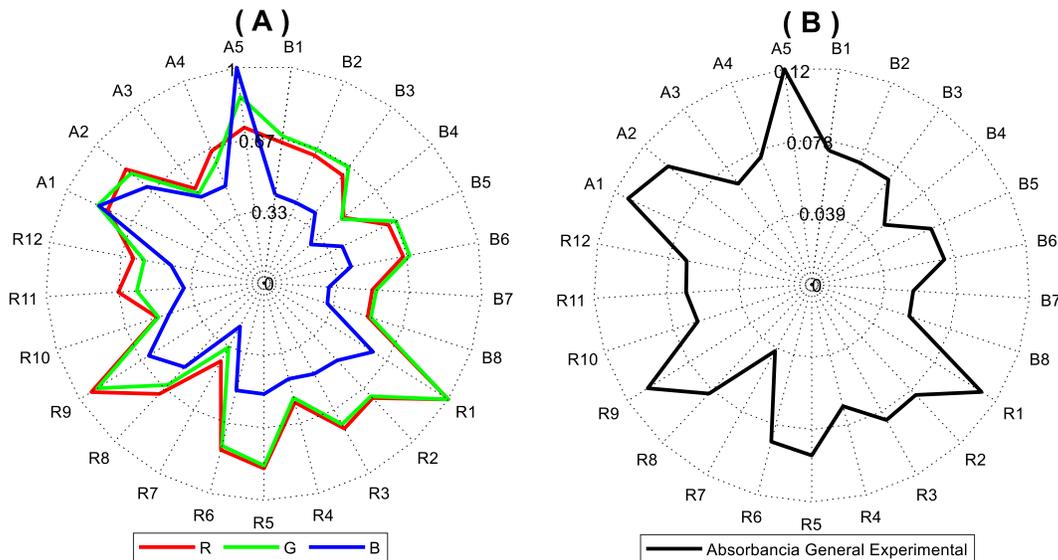


Fig. 42. Absorbancias Experimentales: (A) Absorbancia promedio por componente RGB; (B) Absorbancia Promedio General

Tabla 16. Valores de intensidades y absorciones del componente RGB del OE para las 25 muestras de tequila.

Etiqueta	Componentes promedio del píxel RGB			Absorbancia promedio por componente			Absorbancia General Experimental
	R	G	B	R	G	B	
Blanco	255	251±4.0970	253±3.4674	0	0.0026±0.0040	0.0012±0.0027	0.0016±0.0038
B1	215±0.6915	215±1.1861	215±1.0148	0.0729±0.0014	0.0720±0.0024	0.0729±0.0021	0.0726±0.0020
B2	216±1.1059	216±0.8137	216±0.9248	0.0706±0.0023	0.0696±0.0017	0.0708±0.0019	0.0703±0.0019
B3	217±1.7991	216±1.7340	216±1.6046	0.0685±0.0036	0.0696±0.0035	0.0711±0.0033	0.0697±0.0035
B4	225±3.0820	227±3.5519	227±2.8720	0.0529±0.0061	0.0487±0.0070	0.0496±0.0056	0.0504±0.0062
B5	216±1.1427	216±1.1427	216±1.1427	0.0705±0.0023	0.0705±0.0023	0.0705±0.0023	0.0705±0.0023
B6	215±1.0417	215±2.4542	215±1.3113	0.0727±0.0021	0.0717±0.0050	0.0723±0.0027	0.0722±0.0033
B7	223±1.4794	224±2.2733	225±2.8816	0.0556±0.0029	0.0545±0.0045	0.0530±0.0056	0.0544±0.0044
B8	223±3.1220	224±1.8144	224±1.8144	0.0559±0.0062	0.0543±0.0035	0.0543±0.0035	0.0549±0.0044
R1	196±1.3730	199±1.2972	199±1.3730	0.1118±0.0031	0.1055±0.0029	0.1053±0.0030	0.1076±0.0030
R2	211±1.7682	213±1.4794	208±0.8193	0.0812±0.0037	0.0755±0.0031	0.0870±0.0017	0.0813±0.0028
R3	209±0.6215	212±0.7849	209±3.6928	0.0855±0.0013	0.0784±0.0016	0.0850±0.0076	0.0830±0.0036
R4	219±1.2243	222±1.0417	211±1.7207	0.0635±0.0025	0.0576±0.0021	0.0811±0.0036	0.0674±0.0027
R5	204±0.7303	207±0.4498	206±0.6433	0.0955±0.0016	0.0887±0.0010	0.0910±0.0014	0.0917±0.0013
R6	207±0.6915	210±0.6288	206±0.7849	0.0887±0.0015	0.0817±0.0013	0.0908±0.0017	0.0871±0.0015
R7	229±0.6288	234±0.5252	231±0.6065	0.0459±0.0012	0.0356±0.0010	0.0406±0.0012	0.0407±0.0011
R8	212±1.0807	217±0.9965	204±0.8023	0.0784±0.0023	0.0680±0.0020	0.0945±0.0017	0.0803±0.0020
R9	200±1.8889	204±1.2794	197±2.4011	0.1048±0.0042	0.0955±0.0028	0.1113±0.0054	0.1039±0.0041
R10	223±0.8996	224±0.8996	211±3.1397	0.0574±0.0018	0.0537±0.0018	0.0811±0.0067	0.0641±0.0033
R11	214±1.3493	220±0.8137	218±1.3322	0.0748±0.0028	0.0616±0.0016	0.0654±0.0027	0.0673±0.0024
R12	217±0.6288	222±1.2576	213±0.8841	0.0681±0.0013	0.0590±0.0025	0.0771±0.0018	0.0681±0.0019
A1	207±0.7611	207±1.2015	180±0.4983	0.0884±0.0016	0.0887±0.0026	0.1486±0.0012	0.1086±0.0018
A2	206±0.7240	210±0.8193	191±0.8683	0.0918±0.0016	0.0836±0.0017	0.1236±0.0020	0.0997±0.0018
A3	221±0.9248	224±0.7303	208±0.8469	0.0600±0.0019	0.0537±0.0014	0.0872±0.0018	0.0670±0.0086
A4	215±1.0283	220±0.5509	209±0.8137	0.0731±0.0021	0.0628±0.0011	0.0855±0.0017	0.0738±0.0016
A5	211±1.2576	206±1.1059	169±0.9685	0.0807±0.0026	0.0912±0.0024	0.1780±0.0025	0.1166±0.0025

Además de la representación anterior, es posible evaluar la absorbancia promedio para todas las muestras de tequila. De esta forma los tequilas blancos poseen una absorbancia promedio de 0.0644 ± 0.0034 , mientras que, para las muestras de tequila reposado y añejo, la absorbancia promedio es de 0.0785 ± 0.0024 y 0.0931 ± 0.0019 , respectivamente. La desviación estándar asociada corresponde principalmente a la variación propia entre muestras de tequila del mismo tipo. Estos elementos característicos del producto dependen no solo de la materia prima, sino también de proceso de elaboración que cada productor utiliza. Sin embargo, es posible notar que la absorbancia evaluada a través del OE es capaz de relacionarse con el proceso de envejecimiento presente en la bebida.

De esta forma, los valores de absorbancia más bajos son los obtenidos para las muestras de tequila blanco, pues su valor se asocia directamente con el tono incoloro que posee. Mientras que para los tequilas que son sometidos a un proceso de añejamiento, la bebida adquiere un tono amarillento para los tequilas reposados hasta ámbar para los tequilas añejos. De este modo, mientras la intensidad del tono del tequila aumenta, los valores de absorbancia también lo hacen.

Esta información sobre la absorbancia, aunque representa un primer indicio para la identificación de los tequilas, no sería suficiente para conseguir categorizar todos los tequilas mediante un modelo matemático clasificador. Para superar esta limitante, el análisis de absorbancia se realiza empleando la intensidad de los componentes RGB de las imágenes obtenidas de los tequilas. En la Fig. 43 puede observarse la información de las absorbancias promedio para cada componente considerando las tres clases de tequila involucrados, aquí es posible notar que para las muestras de tequila reposado predominan los componentes rojo y azul, mientras que el componente azul está más presente y tiene la mayor intensidad en las muestras de tequila añejo. Estas diferencias encontradas utilizando el espacio de color RGB, permitirán la identificación de los diferentes matices que presentan las muestras de tequila para conseguir su correcta clasificación por tipo de añejamiento.

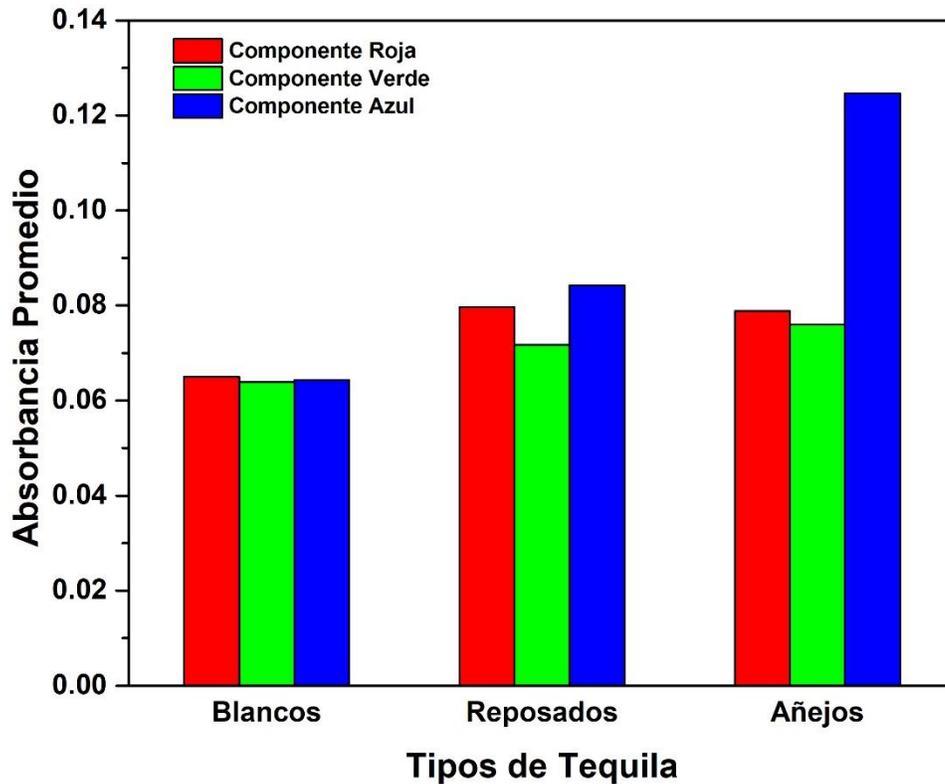


Fig. 43. Comparativa de Absorbancia promedio de los componentes RGB para los tipos de tequila

En este punto es importante hacer hincapié, la alta similitud entre los valores obtenidos para cada clase de tequila pues la desviación estándar obtenidos se encuentra en el orden de 0.0001-0.0005.

Motivados por los resultados obtenidos, se construyeron graficas de radar para cada clase de tequila. La Fig. 44 muestra la absorbancia promedio RGB del conjunto completo de tequilas agrupados en cada una de las tres categorías en estudio. Aquí es posible observar de forma más evidente un patrón característico para cada tipo de tequila y que están relacionadas con sus propiedades ópticas adquiridas por el OE. Este patrón evidente para cada clase de tequila (es decir, blanco, reposado y añejo) ayudará a interpretar esta información por los modelos clasificadores previstos. La idea de un proceso de reconocimiento de patrones es reconocer las regularidades presentes en los datos mediante un modelo computacional que utiliza algoritmos de aprendizaje automático.

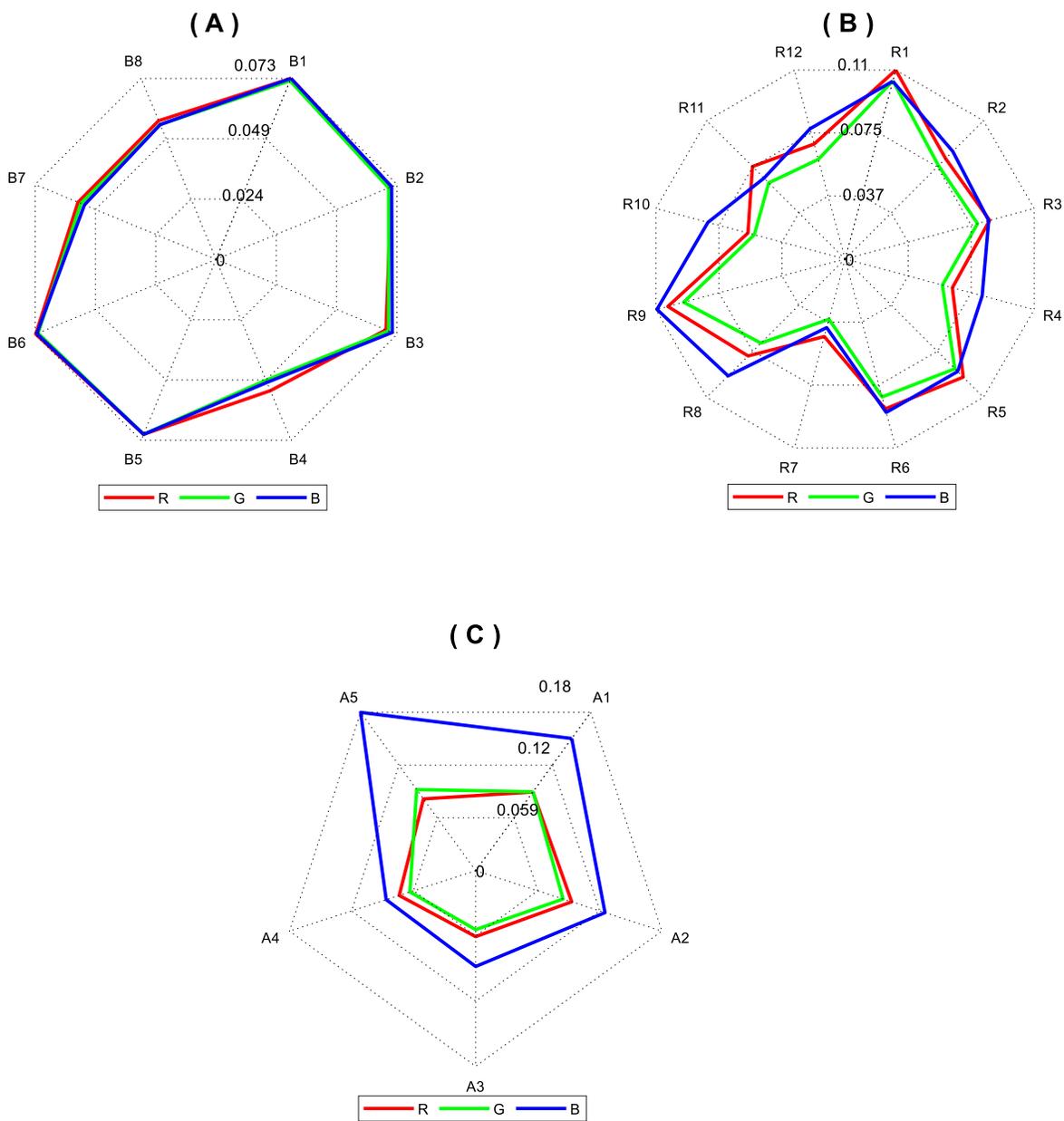


Fig. 44. Gráficos de Radar de las muestras de tequila analizadas con sus respectivos valores de absorbancia por componente. (A) Blancos, (B) Reposados y (C) Añejos

4.4 Validación del OE con el UV-Vis

La intención de emplear un sistema espectrofotométrico convencional que capaz de analizar muestras mediante UV-Vis, es comparar la capacidad del OE en la identificación de las muestras de tequila respecto de una técnica analítica convencional. En este sentido, las muestras ya analizadas por el OE fueron ahora estudiadas con el espectrofotómetro comercial S2100UV+, efectuando un barrido de longitudes de onda de 200nm hasta 700nm. La respuesta UV-Vis se muestra en la Fig. 45, para cada una de las 25 muestras de tequila agrupadas en su respectiva categoría.

Como puede observarse en la Fig. 45A, los tequilas blancos al tener una tonalidad transparente sólo absorben en la región UV, con una banda claramente definida de tipo gaussiano (centrada en torno a 280 nm cuya cola derecha se aproxima a cero a partir de los 350 nm); además, se presenta una pendiente decreciente a partir de los 200 nm hacia los 250 nm. Los tequilas reposados y añejos son más complejos, porque su banda espectral se encuentra alrededor de los 230 nm a los 300 nm y se vuelve confuso para los tequilas reposados (vea Fig. 45B) porque se solapan parcialmente dos bandas porque están en el límite del rango fotométrico del instrumento con valor de absorbancia igual a 3. Además, los tequilas reposados presentan una banda no resuelta en la región de 350-400 nm cuya cola derecha se hace cero sólo después de los 500 nm. Esta situación también se presenta para el caso para los tequilas añejos (observe la Fig. 45C), hay bandas espectrales sin resolver a partir de los 340 nm-400 nm y finalizan a cero a partir de los 600 nm.

Esta complejidad en los espectros de los tequilas reposados y añejos tiene una relación estrecha con el proceso de maduración en barricas de madera durante varios meses, como se explicó en los antecedentes. Al respecto, la presencia de compuestos fenólicos en el tequila debido a los procesos de degradación y oxidación por su contacto con la madera, producen un cambio en la tonalidad de la bebida que se intensifica con el paso del tiempo.

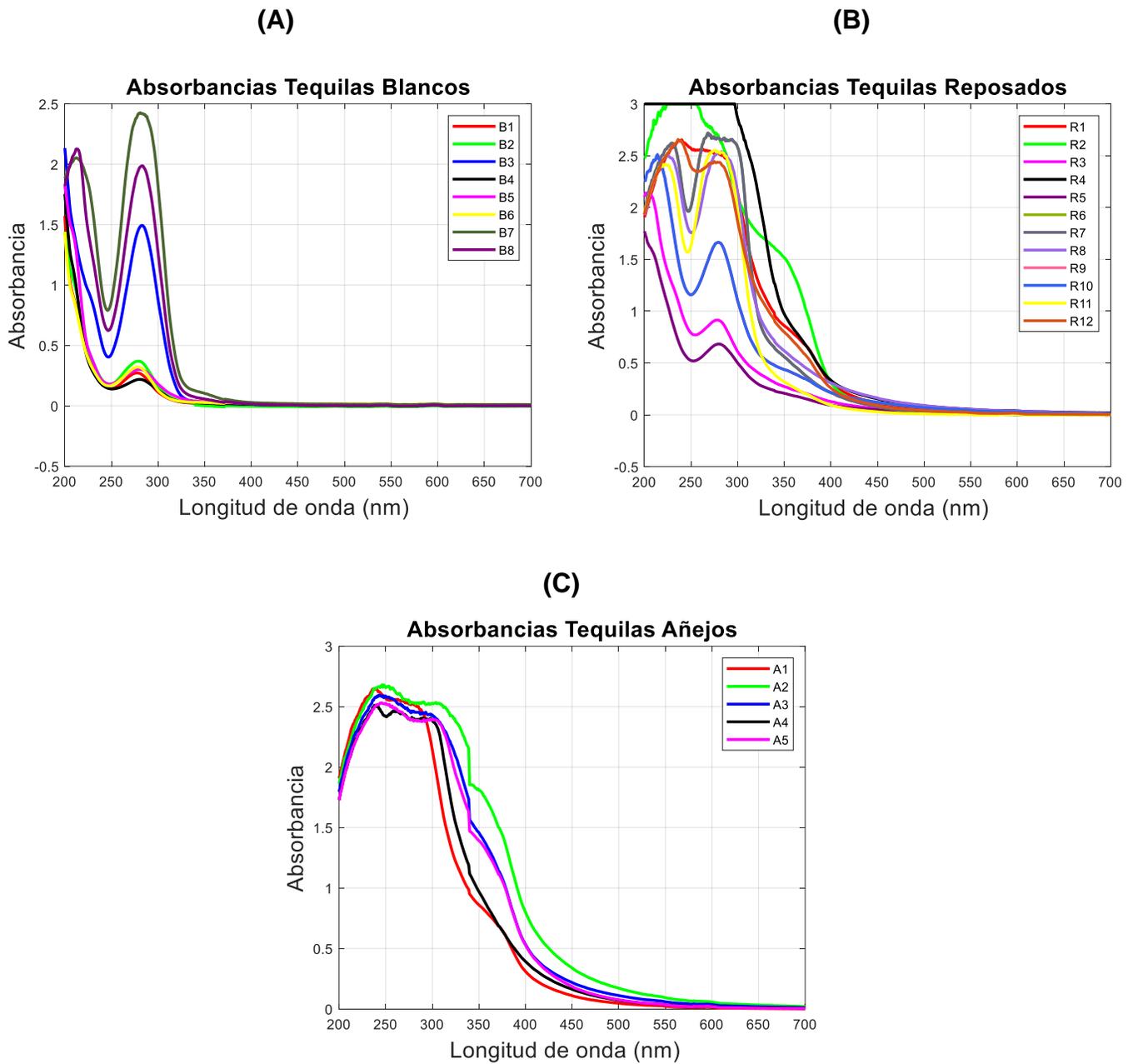


Fig. 45. Señales obtenidas de las variantes de Tequila utilizando la técnica de UV-Vis

Esta información óptica contenida en los espectros del UV-Vis, fue utilizada para obtener los valores de absorbancia en dos diferentes longitudes de onda específicas ($\lambda=345$ nm y $\lambda=375$ nm), considerando la limitante del OE de disponer de una fuente de luz con una única longitud de onda.

En este sentido, los valores de absorbancia del UV-Vis y la absorbancia experimental obtenida del OE fueron comparados empleando una gráfica de radar en la que se pueda observar el patrón característico de los tequilas analizados por ambos sistemas. Estas respuestas fueron normalizadas en el intervalo de 0 a 1 con la intención de evitar problemas de escala (vea la Fig. 46).

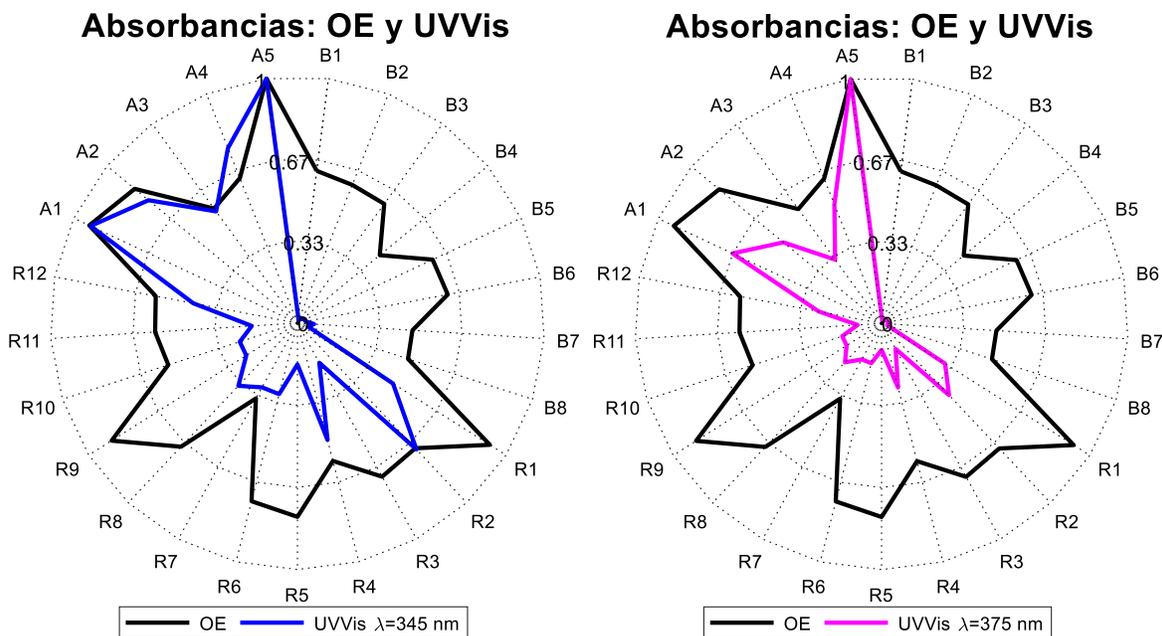


Fig. 46. Gráficos de Radar de las muestras obtenidas por el OE y el UV-Vis (345/375)

En estas gráficas es posible evidenciar el patrón característico de cada sistema analítico presenta un patrón distinto en la interpretación de la absorbancia de los tequilas. Respecto la longitud de onda de 345nm, se puede notar que en algunas muestras de tequilas (específicamente A1, A3, A5 y R1) se presenta una alta coincidencia, en tanto que otras muestras como A2 y R4 son próximas. Sin embargo, para el resto de las muestras de tequilas incluso existe un comportamiento opuesto en la magnitud de la absorbancia. Este efecto puede observarse de forma similar con la longitud de onda de 375nm, sin embargo, en ningún caso se consiguen valores de absorbancia coincidentes excepto para la muestra A5, este efecto indicando que longitud de onda de la fuente de luz del OE es más próxima a los 345nm que a los 375nm.

4.5 Etapa de modelado

En esta etapa se explican los 4 modelos elegibles a partir de un análisis exploratorio de PCA, para después hacer uso de herramientas de procesamiento como LDA, KNN y ANNs destinadas a interpretar la información y categorizarla en alguna de las tres clases de tequila analizadas. En la tabla 17 se muestra la asignación de etiquetas y la combinación de herramientas de procesamiento para modelar y sean las entradas a los clasificadores

Tabla 17. Estrategia de modelado de datos

Modelos Propuestos		Estrategia en el manejo de la información
M1	OE (Absorbancia Promedio RGB)	PCA+LDA PCA+KNN PCA+ANNS
M2	UVVIS ($\lambda=345$ nm)	
M3	UVVIS ($\lambda=345$ nm y $\lambda=345$ nm)	
M4	UVVIS (Barrido completo)	

4.5.1 Análisis Exploratorio PCA

Antes de hacer el modelado propuesto, las absorbancias promedio RGB se normalizaron en un intervalo de 0 a 1 para reducir los efectos de la iluminación y por comodidad en el tratamiento de los datos. A continuación, se realizó un análisis PCA para construir un modelo de reconocimiento preliminar, esperando observar alguna agrupación de muestras causada por las absorbancias propias y relacionadas con la clase de tequila. En la Fig. 48 se muestra el gráfico del PCA del OE, donde utilizan los datos de la absorbancia promedio RGB y se muestran los tres PCs significativos. Aquí la varianza explicada acumulada fue de aproximadamente 99,96% con *clusters* característicos que discriminan parcialmente las diferentes clases de tequila. Es decir, la mayoría de los tequilas Blanco parecen estar agrupados en la región superior derecha del gráfico, mientras que los tequilas Reposados se concentran en el centro, y los Añejos aparecen agrupados en la región izquierda. Sin embargo, aparte de la

marcada dispersión de estas dos últimas categorías de tequilas, existe un claro solapamiento entre algunas de sus muestras.

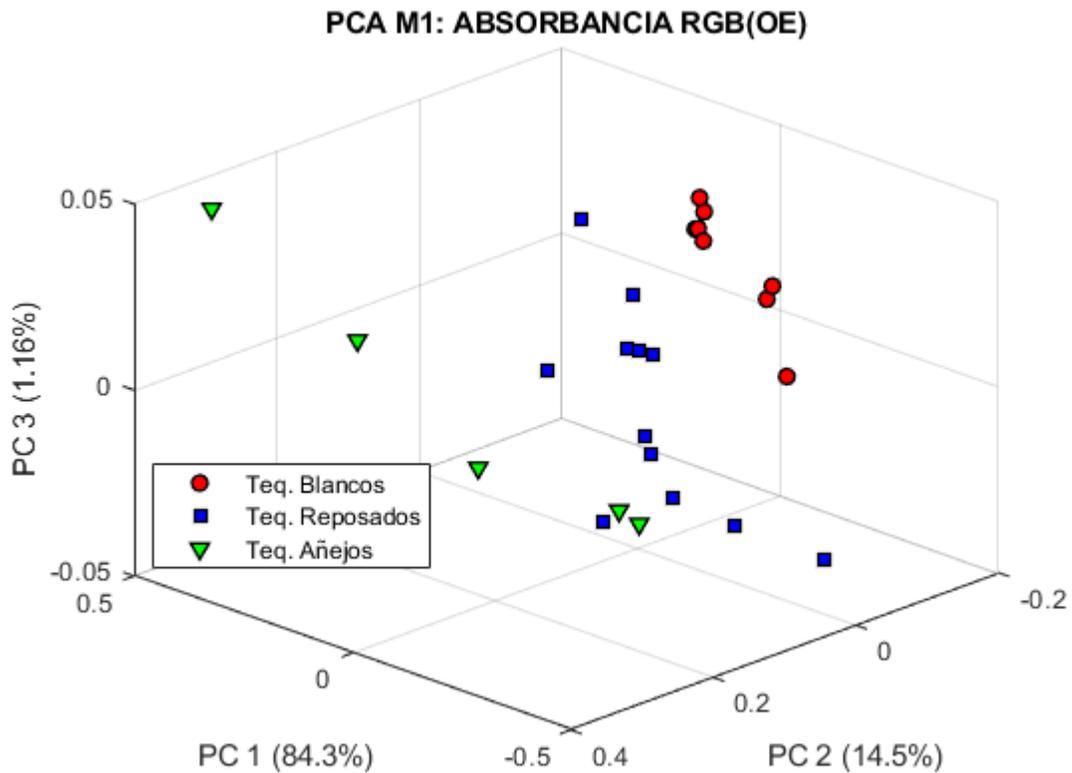


Fig. 47. Gráficos PCA de los 3 primeros componentes obtenidos tras el análisis de las muestras de tequila a partir de la absorbancia RGB del OE.

Considerando que una de las características fisicoquímicas que impacta durante el proceso es el color, es posible entonces suponer que las absorbancias obtenidas con el OE también están relacionadas con el envejecimiento de las muestras de tequila analizadas.

En este sentido, las regiones de *clustering* observadas en el PCA tienen sentido al identificar que las muestras fueron agrupadas dentro de la clase adecuada. Por otro lado, cada *cluster* tiene una relación con un periodo de envejecimiento diferente. Así, la dispersión presente en el *cluster* de tequila reposado y añejo están claramente relacionadas con los tiempos de añejamiento que cada productor estipula para su

producto. Por el contrario, en el clúster de tequilas blanco, la dispersión es mínima porque estas muestras de tequila no tienen un proceso de envejecimiento.

Tomando la estrategia del modelado de PCA, se realiza el mismo proceso para obtener un modelo preliminar, con la intención de ver observar la existencia del agrupamiento entre las muestras de tequila que están en determinada categoría. En la tabla 18 se presenta la dimensión de los datos de los modelos propuestos, el arreglo matricial para realizar el análisis PCA.

Tabla 18. Información inicial para el análisis de PCA

Mod.	Modelos propuestos	Dimensión	Arreglo matricial para PCA (scores)
M1	OE (Absorbancia promedio RGB)	25 × 3	25 × 3
M2	UVVIS ($\lambda=345$ nm)	25 × 1	25 × 1
M3	UVVIS ($\lambda=345$ nm y $\lambda=375$ nm)	25 × 2	25 × 2
M4	UVVIS (Barrido completo)	25 × 400	25 × 24

A continuación, se muestran los gráficos PCA con el primer componente y dos componentes del PCA para el Mod. M2 (Fig. 49) y Mod.M3 (Fig. 50) respectivamente, coloreando los resultados según su tipo de tequila a unas longitudes de onda determinadas. Estos resultados, a pesar de que uno de ellos captura con su 1er PC la mayor cantidad de la varianza de los datos(M2) a 100% y el segundo el 99.96 % (M3) de la varianza acumulada, se puede apreciar el agrupamiento de los resultados por su tipo y este resultado es alentador, porque es indicativo de que existe información analítica suficiente de las señales obtenida por el UVVIS para observar sus diferencias entre clases. Cabe mencionar que el Mod. M4 (Fig.51) utiliza el barrido completo a partir de los 200 nm hasta los 600 nm, debido que, para las tres clases, en su barrido espectral finalizan a cero antes de los 600 nm, y por ello se ajusta hasta este valor. La varianza acumulada para el Mod. M4 ocupa tres componentes y es del 97.64%.

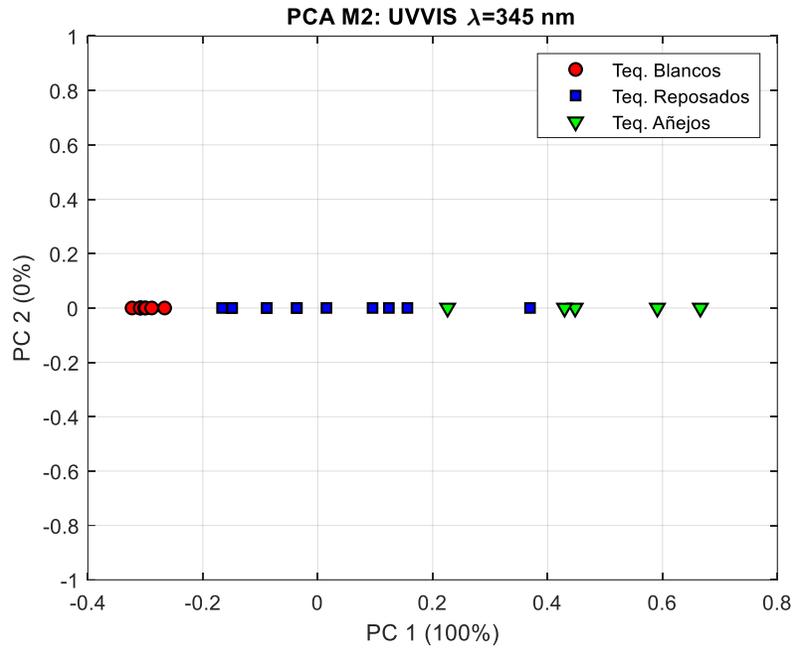


Fig. 48. Gráfico PCA del UVVIS a longitud de onda de 345 nm. Muestra la varianza total en una sola componente

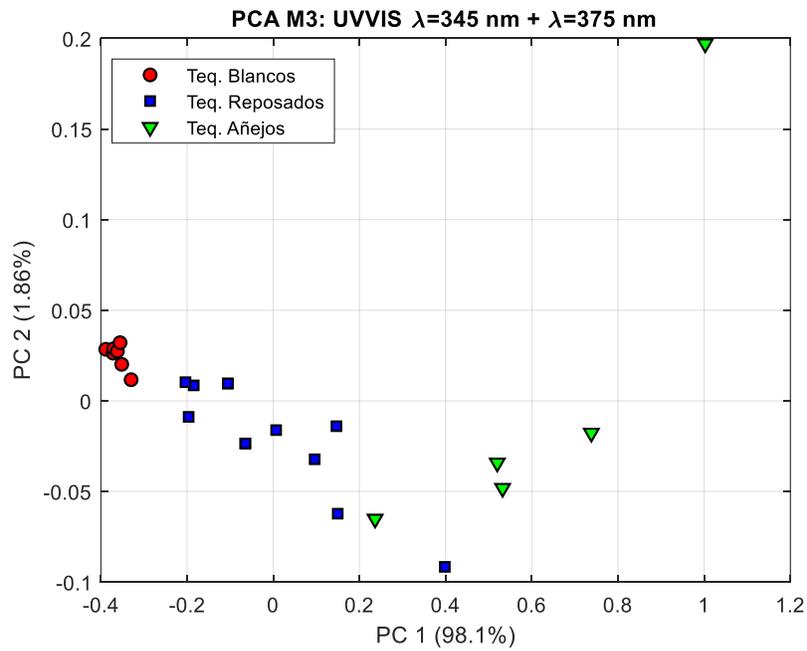


Fig. 49. Gráfico PCA del UVVIS con dos longitudes de onda de 345 nm y 375 nm. Muestra la varianza total en dos componentes.

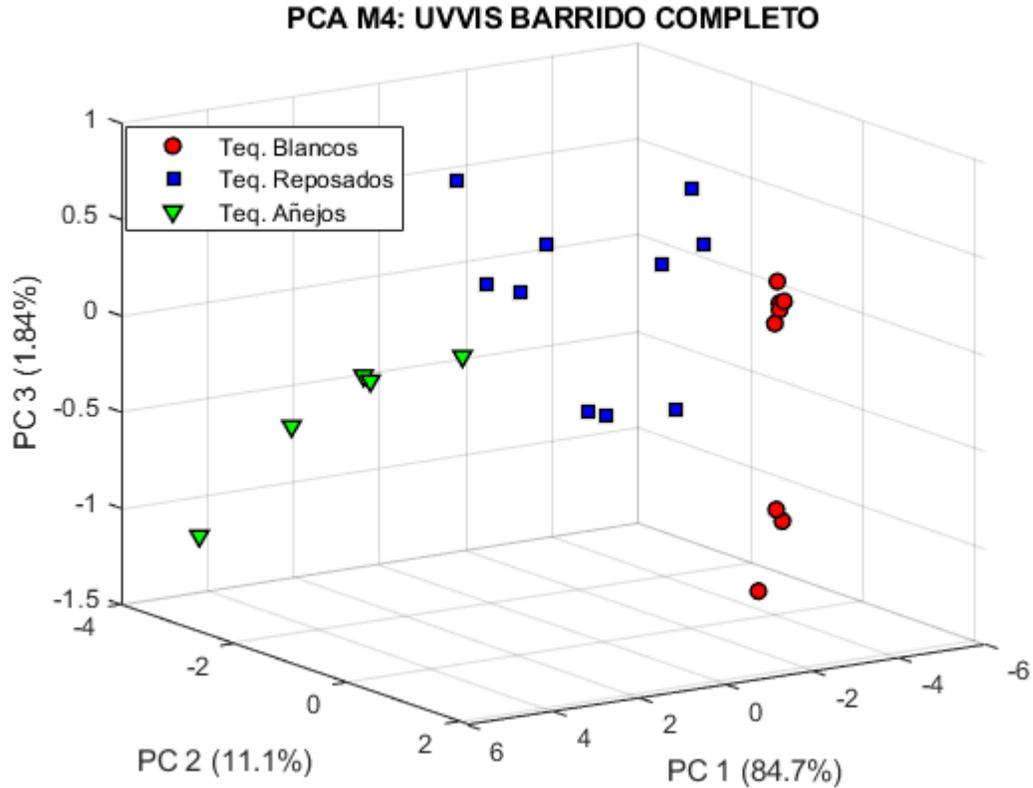


Fig. 50. Gráfico PCA del UVVIS del barrido espectral del UVVIS.

Si se observa los gráficos de PCA de los modelos M2, M3 y M4, sus resultados obtenidos por la técnica de UVVIS, se comportan muy similar al Mod. M1, es decir, existe una tendencia favorable de separabilidad de los datos de información, aun a pesar de que la información arrojada por el OE son datos de absorbancia de menor magnitud en comparativa de lo que arroja el UVVIS.

Por esta razón, para confirmar estas identificaciones iniciales vistas por PCA, el siguiente paso fue analizar los datos mediante el uso de tres clasificadores diferentes: análisis discriminante lineal (LDA), vecinos más cercanos (KNN) y redes neuronales artificiales (ANN).

4.5.2 Clasificación utilizando LDA

Los datos transformados mediante PCA se utilizaron como información de entrada del LDA. Al tratarse de un método supervisado, el éxito de la clasificación se evaluó mediante una técnica de validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV, por sus siglas en inglés). En este esquema, cada muestra se clasifica mediante la función de análisis derivada de las muestras restantes (todos los casos excepto el propio caso). Este proceso se repite tantas veces, como el número de muestras disponible del conjunto de datos dejando fuera una muestra diferente cada vez, considerándola como muestra de validación, por lo que todas las muestras se utilizan una vez para la validación. Bajo este esquema de procesamiento, se construyeron un total de 25 modelos de clasificación para el conjunto de tequilas estudiado.

Como puede observarse en la Fig. 51, se muestra un espacio bidimensional formado por dos funciones discriminantes obtenidas durante el modelado con LDA para el Mod. M1, consiguiendo agrupamientos claros de muestras que categorizan a cada uno de los tres tipos de tequila. Las muestras se agruparon considerando su ubicación al centroide más cercano evaluando la menor distancia euclidiana. El uso de estas funciones lineales permite explicar un 100% de la variabilidad de los datos originales. Los clústeres de la Fig.51 evidencian que las muestras de tequila se agrupan según el proceso de envejecimiento asociado a su clase y permite identificar a los tequilas blancos en la región izquierda del gráfico, los tequilas reposados y añejados al medio y en región derecha respectivamente.

Esta ubicación de las muestras en la proyección del modelo LDA, cobra sentido con el efecto del añejamiento en el tequila, pues las muestras que son del tipo reposado están ubicadas al centro, pero lejos de las muestras de tequila blanco. En contra parte, aunque las muestras de tequila añejo se ubican en una zona opuesta a los tequilas blancos, presenta un solapamiento con algunas muestras de tequila reposado en la región central. En este sentido es importante recordar que el proceso de añejamiento depende principalmente del tiempo de maduración y el tipo de barrica empleado. En

este sentido, los tequilas reposados se quedan en barrica más de dos meses y menos de un año mientras que los tequilas añejos deben cumplir con un periodo en barrica de más de un año y menos de tres años. Dicho proceso de maduración provoca un amplio espectro de variadas entre cada clase (aun considerando tiempos mínimos), pues el tiempo de añejamiento queda estipulado también por el propio fabricante en la búsqueda de aumentar sus características organolépticas y comercializar más su producto.

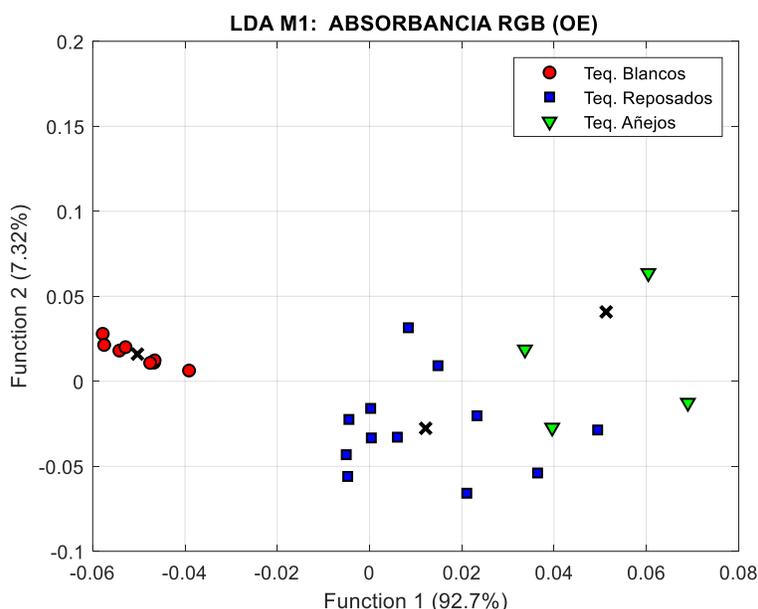


Fig. 51. LDA bidimensional del modelo M1, tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. El centroide de cada clase se muestra con una (x).

Por su parte los modelos LDA para M2 (345 nm), M3 (345 nm acoplada con 375 nm) y M4 (200 nm a los 600 nm) construidos a partir de las longitudes de onda del UV-Vis, son presentados en las Fig. 52 a 54. En la Fig.52, es posible observar al grupo de muestras de tequila blanco, seguido de un agrupamiento en la parte media representando a los tequilas reposados con la presencia de un par de muestras de tequilas añejos y el extremo derecho se encuentran el resto de las muestras de tequilas añejos. Aunque el modelo LDA establece claras regiones de agrupamiento de las muestras de tequila a partir de un único valor de absorbancia la discriminación general se verá afectada por la cercanía entre *clusters*, por lo que es necesario el uso de más

variables de entrada al modelo. Por su parte el modelo M3 representado en la Fig. 53 presenta un comportamiento similar al M2, pero en este caso, la inclusión de otro valor de abosorbancia de otra longitud de onda mas mejora significativamente la separabilidad de las clases de tequila utilizan dos funciones discriminates.

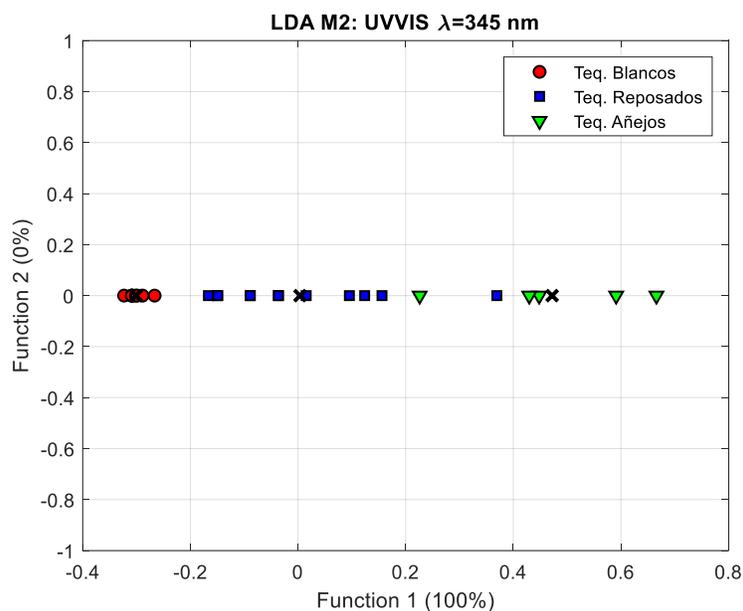


Fig. 52. LDA bidimensional del modelo M2. tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. El centroide de cada clase se muestra con una (x).

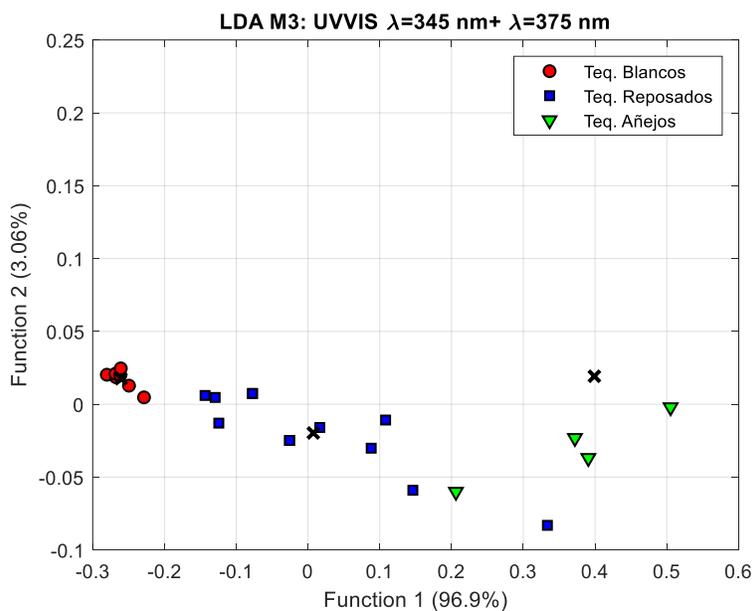


Fig. 53. LDA bidimensional del modelo M3 tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. El centroide de cada clase se muestra con una (x).

Finalmente para el modelo LDA de M4, representado en la Fig.54 es notoria la contirbución de emplear el espectro completo de abosorbancias para el barrido de longitudes de onda de de otra longitud de onda de 200 nm a 600 nm. En este caso, las muestras de tequila analizadas son integradas en clases claramente separadas y distantes entre sí, lo que permite identificarlas sin la presencia de confusiones entre muestras debidas a solapamientos entre *clusters*.

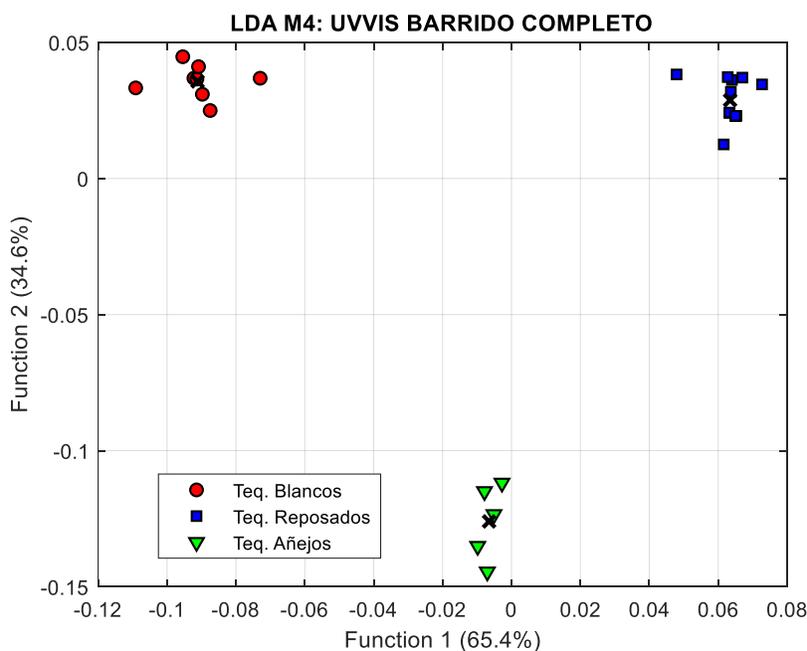


Fig. 54. Gráficos LDA bidimensional del Mod. M4.

Estos resultados gráficos de la clasificación obtenida por el modelado LDA, deben ser corroborados desde el punto de vista numérico. En este sentido, los resultados globales de clasificación obtenidos a partir de la validación de los 25 modelos LDA construidos, se presentan en la Tabla 19. Su eficacia es evaluada mediante los parámetros de exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad.

Tabla 19. Resultados promedio de clasificación del OE para la discriminación de diferentes muestras de tequila empleando PCA-LDA y sus respectivas métricas de desempeño.

Modelo	Categoría de Tequila	% Clasificación	Exactitud	Precisión	Sensitividad	Especificidad
M1: OE	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	91.67	0.92	0.91	0.92	0.92
	Añejos	78.40	0.92	0.80	0.78	0.95
	Promedio	90.02	0.94	0.90	0.90	0.96
M2: $\lambda=345$ nm	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	92.67	0.93	0.92	0.93	0.92
	Añejos	80.00	0.93	0.83	0.80	0.96
	Promedio	90.89	0.95	0.91	0.91	0.96
M3: $\lambda=345 +$ $\lambda=375$ nm	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	100.00	0.95	0.90	1.00	0.90
	Añejos	73.60	0.95	1.00	0.73	1.00
	Promedio	91.20	0.96	0.97	0.91	0.97
M4: UV-Vis	Blancos	99.00	1.00	1.00	0.99	1.00
	Reposados	99.33	0.99	0.98	0.99	0.98
	Añejos	96.80	0.99	0.99	0.97	1.00
	Promedio	98.38	0.99	0.99	0.98	0.99

Estas métricas de desempeño obtenidas por los modelos LDA, permiten confirmar que las muestras de tequila lograron clasificarse correctamente por su tipo de añejamiento. Para el caso específico del mod. M1 correspondiente al OE, es importante resaltar que se observa un porcentaje de clasificación de 100% y 91.67% para los tequilas blancos y tequilas reposados respectivamente, mientras que los tequilas añejos no superan el 78.40%. Sin embargo, la tasa de clasificación global de este modelo para las tres clases de tequila es del 90.02%. En lo que respecta a los modelos LDA alimentados con valores de absorbancia, es posible notar que la categorización de muestras de tequila añejo presenta un porcentaje de clasificación disminuido que va desde el 73.60% para el modelo M3, 80% para el modelo M2 y de 96.80% para el M4. Este comportamiento indica que la clase de tequilas añejos es una de las más difíciles de identificar considerando que presenta ciertas similitudes con la clase de tequilas reposados.

En este mismo sentido, es importante analizar los parámetros de desempeño de los modelos y compararlos entre sí para evaluar la eficacia en la clasificación de los tequilas en relación con su añejamiento de cada propuesta. Para facilitar la lectura de estos parámetros se utilizó una gráfica de barras (vea Fig. 55). En ella es posible notar que de forma general los modelos LDA M1 a M3, relacionados con el OE y el uso de una o dos valores de absorbancia UV-Vis, tienen un comportamiento similar, solo el modelo M4 que utiliza el barrido completo UV-Vis supera a los anteriores. Sin embargo, es importante notar que las métricas promedio de los modelos desarrollados, se encuentran por arriba de 0.9, lo que demuestra su correcto desempeño en la identificación de las muestras para cada una de las tres clases de tequila.

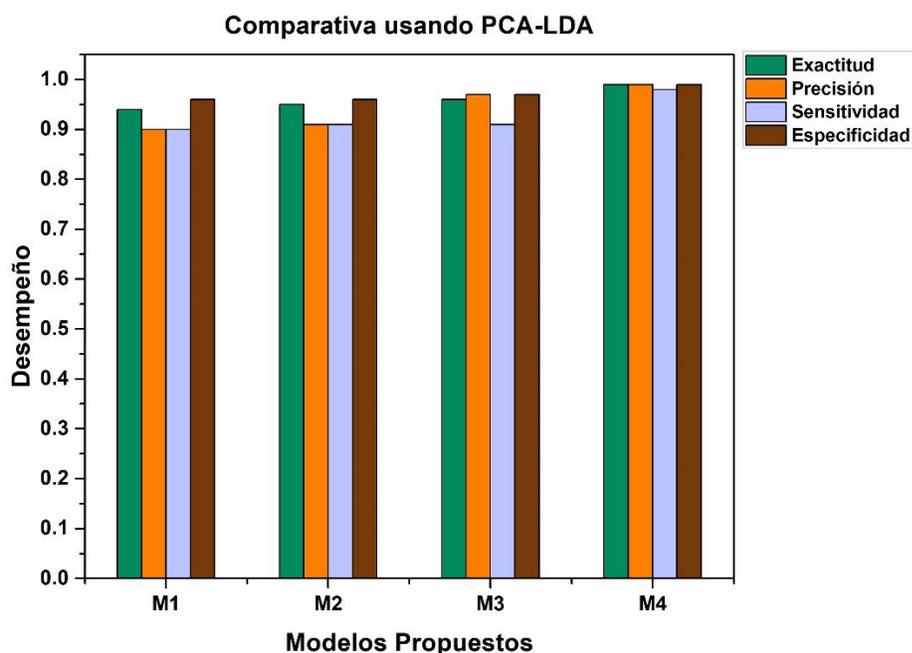


Fig. 55. Comparativa de métricas de desempeño usando PCA-LDA.

Para corroborar que los resultados obtenidos del modelado LDA son significativos, es necesario utilizar otro criterio que refleje con mayor certeza el rendimiento del clasificador en contextos de este desequilibrio. Una medida alternativa a la precisión muy conocida es el coeficiente kappa de Cohen [165]. Para su cálculo se toman los datos de referencia y los datos entrantes determinados por la diagonal principal de la matriz de confusión, véase la definición (26):

$$\kappa = \frac{N \sum_{i=1}^n m_{i,i} - \sum_{i=1}^n (G_i C_i)}{N^2 - \sum_{i=1}^n (G_i C_i)} \quad (26)$$

Donde i es el número de clase, N es el número total de valores clasificados en comparación con los valores de verdad, $m_{i,i}$ es el número de valores pertenecientes a la clase de verdad i que también han sido clasificados como clase i (es decir, los valores que se encuentran a lo largo de la diagonal principal de la matriz de confusión), C_i es el número total de valores predichos pertenecientes a la clase i , y G_i es el número total de valores de verdad pertenecientes a la clase i . Así, kappa es un indicador que adquiere valores entre 0 y 1, el primero representa que no hay acuerdo y el segundo, el acuerdo total. Según su esquema, un valor <0 indica falta de acuerdo, de 0 a 0.20 como leve, de 0.21 a 0.40 como regular, de 0.41 a 0.60 como moderado, de 0.61 a 0.80 como sustancial y de 0.81 a 1 como acuerdo casi perfecto.

Así es como se calcularon los valores kappa para cada uno de los 25 modelos LDA construidos considerando el proceso LOOCV, obteniendo un coeficiente kappa promedio con su desviación estándar. Esta información se concentra en la tabla 20, donde todos los modelos se identifican como "acuerdo perfecto".

Tabla 20. Resultados promedios de kappa empleando PCA-LDA

Parámetro	Modelo			
	M1	M2	M3	M4
κ	0.87±0.04	0.88±0.02	0.91±0.05	0.98±0.03
	"acuerdo perfecto"			

A partir de estos últimos resultados, podemos confirmar que las absorbancias de los componentes RGB obtenidas de las imágenes capturadas por el OE para cada una de las muestras de tequila, son suficientemente representativas para conseguir la clasificación de tres tipos de destilados estudiados considerando sus fases de añejamiento. Del mismo modo, los modelos construidos con las absorbancias medidas

empleando la técnica de UV-Vis permiten discriminar apropiadamente entre los diferentes tipos de tequila.

4.5.3 Clasificación utilizando KNN

Además del modelado utilizando LDA, se consideró utilizar los datos transformados mediante el PCA como información de entrada del KNN considerando efectuar un proceso de LOOCV. Teniendo en cuenta la existencia de la separabilidad de la información, se establece considerar tres nuevas instancias diferentes en el plano tridimensional del PCA, para la elección de estos nuevos puntos.

Estas referencias se encauzan de la siguiente forma: la primera instancia lo preside el punto *mínimo* de valor de entrada (scores), después la siguiente instancia conocido como *medio* escoge el valor promedio de los datos de entrada y por último toma la instancia *máxima* del valor de entrada. Estos serán las referencias del conjunto de datos, para que a partir de cada instancia se utilice la distancia euclidiana para agrupar las muestras de tequila dependiendo de la elección del vecino más próximo. El valor de cada distancia euclidiana relacionada con una instancia será variable para cada una de ellas.

Después de repetidos ensayos de prueba y error, se seleccionaron los valores de $k=4$ y $k=6$ para construir los modelos de vecinos más cercanos, debido principalmente a que con estos valores del parámetro se obtenían los mejores resultados en la clasificación. Siguiendo esta metodología se construyeron los clasificadores respectivos para cada uno de los modelos descritos la tabla 17. Las diferentes imágenes del resultado de la clasificación pueden consultarse en el Apéndice 4, para cada uno de los modelos propuestos.

La evaluación del desempeño se llevó a cabo calculando las métricas relacionadas con la clasificación de los 3 tipos de tequila. Esta información está contenida en las tablas 21 y 22.

Tabla 21. Resultados promedio de clasificación de los diferentes modelos de clasificación del tequila empleando PCA-KNN y sus respectivas métricas de desempeño para k=4.

Modelo	Categoría de Tequila	% Clasificación	Exactitud	Precisión	Sensitividad	Especificidad
M1: OE	Blancos	100.00	0.92	0.80	1.00	0.88
	Reposados	83.33	0.79	0.76	0.83	0.76
	Añejos	35.20	0.87	0.81	0.37	1.00
	Promedio	72.84	0.86	0.79	0.73	0.88
M2: $\lambda=345$ nm	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	87.00	0.90	0.91	0.87	0.92
	Añejos	80.00	0.90	0.72	0.80	0.92
	Promedio	89.00	0.93	0.88	0.89	0.95
M3: $\lambda=345$ nm + $\lambda=375$ nm	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	92.33	0.92	0.92	0.92	0.92
	Añejos	80.00	0.92	0.82	0.80	0.95
	Promedio	90.78	0.95	0.91	0.91	0.96
M4: UV-Vis	Blancos	99.00	0.96	0.90	0.99	0.95
	Reposados	92.33	0.92	0.92	0.92	0.92
	Añejos	81.60	0.96	1.00	0.82	1.00
	Promedio	90.98	0.95	0.94	0.91	0.96

Tabla 22. Resultados promedio de clasificación de los diferentes modelos de clasificación del tequila empleando PCA-KNN y sus respectivas métricas de desempeño para k=6.

Modelo	Categoría de Tequila	% Clasificación	Exactitud	Precisión	Sensitividad	Especificidad
M1: OE	Blancos	95.50	0.88	0.76	0.95	0.85
	Reposados	81.00	0.71	0.66	0.81	0.61
	Añejos	0.00	0.80	0.65	0.00	1.00
	Promedio	58.83	0.80	0.69	0.59	0.82
M2: $\lambda=345$ nm	Blancos	91.00	0.99	0.97	1.00	0.98
	Reposados	89.33	0.91	0.91	0.89	0.92
	Añejos	80.00	0.92	0.80	0.80	0.95
	Promedio	86.78	0.94	0.89	0.90	0.95
M3: $\lambda=345$ nm + $\lambda=375$ nm	Blancos	100.00	0.98	0.93	1.00	0.96
	Reposados	87.00	0.90	0.91	0.87	0.92
	Añejos	80.00	0.92	0.81	0.80	0.95
	Promedio	89.00	0.93	0.88	0.89	0.95
M4: UV-Vis	Blancos	97.00	0.98	0.97	0.97	0.98
	Reposados	97.33	0.92	0.88	0.97	0.88
	Añejos	73.60	0.95	1.00	0.73	1.00
	Promedio	89.31	0.95	0.95	0.89	0.95

De la información contenida en las tablas anteriores es posible notar el efecto en el decremento del porcentaje de clasificación promedio obtenido por el OE conforme el valor de k aumenta, En este sentido, el OE consigue un porcentaje de clasificación del 72.84% con k=4 y disminuye al 58.83% con k=6. Esta situación prevalece también en el resto de los modelos alimentados con absorbancias UV-Vis. Así por ejemplo cuando se usa la absorbancia de la longitud de onda de 345nm, se consigue un porcentaje de clasificación del 89% con k=4 y disminuye al 86.78% con k=6. Por su parte el modelo alimentado con absorbancias a 345nm y 375nm, logra un porcentaje de clasificación del 90.78 con k=4 y disminuye al 89% con k=6. Finalmente, el modelo que emplea el barrido completo de UV-Vis se consigue un porcentaje de clasificación del 90.98 con k=4 y disminuye al 89.31% con k=6. Los parámetros de las métricas de desempeño por su parte también sufren modificaciones al pasar de k=4 a k=6 presentando disminuciones que pueden ser hasta del 10% en el peor de los casos. La figura 56 muestra la representación gráfica de las magnitudes de estos parámetros para cada tipo de modelo KNN programado.

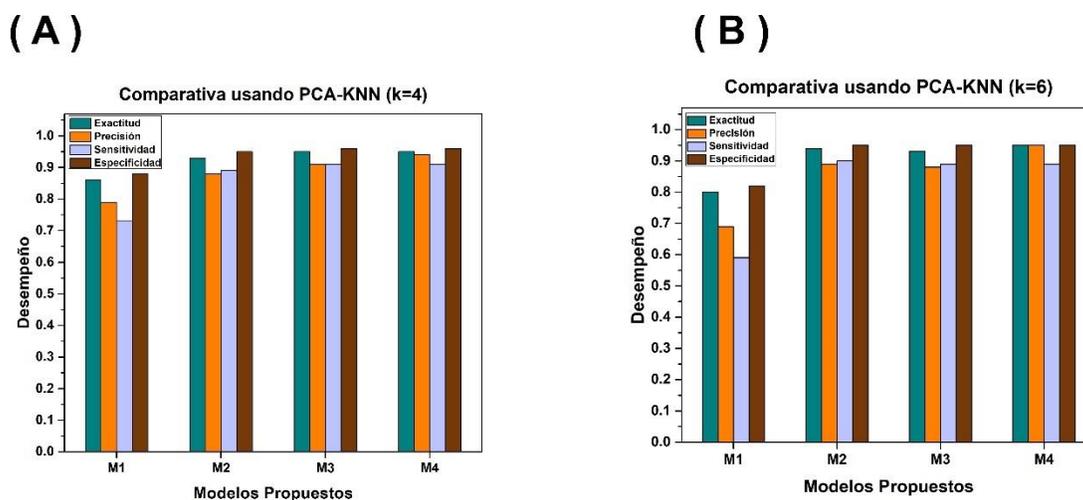


Fig. 56. Comparativa de métricas de desempeño usando PCA-KNN para los modelos programados M1-M4 considerando: (A) k=4 y (B) k=6.

A partir de las gráficas anteriores, se puede apreciar la aparente estabilidad en los valores de los parámetros para todos los modelos alimentados con absorbancias medidas empleando la técnica UV-Vis. Desafortunadamente este efecto no sucede en el modelado del OE, quien muestra una clara disminución en los parámetros de precisión y sensibilidad. Como se sabe, la precisión se relaciona con la dispersión del conjunto de valores obtenidos a partir de mediciones repetidas de una magnitud, de forma que cuanto menor es la dispersión mayor la precisión. Para el caso del clasificador es una medida que representa la proporción de verdaderos positivos dividido entre todos los resultados positivos (tanto verdaderos positivos, como falsos positivos), por lo que de forma práctica corresponde al porcentaje de casos positivos detectados (e.d. correctamente clasificados). Por su parte la sensibilidad, también se le puede definir como la tasa de verdaderos positivos, y corresponde a la proporción de casos positivos que fueron correctamente identificadas por el clasificador.

En este sentido, el OE posee una capacidad limitada para identificar muestras a las muestras de tequila en alguna de sus respectivas clases, situación que se ve reflejada en el decremento de la precisión. Al mismo tiempo, la sensibilidad del OE tampoco es muy alta pues no es capaz de identificar correctamente a todos los tequilas en la clase correcta a la que pertenece.

Esta disminución en el desempeño del OE empleando modelos KNN se debe sobre todo a que KNN es capaz de ajustarse más rápido que LDA conforme se incrementan las dimensiones para resolver el problema de clasificación. Este efecto se vuelve evidente al modelar absorbancias de UV-Vis (pues su contenido analítico es más complejo que el del OE). Así mismo, KNN tampoco funciona bien modelando conjuntos reducidos de datos y/o existe un desbalance en la cantidad de elementos que integran una clase respecto de otra.

Para confirmar este hecho, se obtuvo el valor de kappa para estos experimentales. En la tabla 23 se resume esta información. Aquí podemos notar que el efecto de seleccionar un valor de k adecuado para el KNN. Pues de su correcta selección

depende que un clasificador sea apropiado o no. En el caso particular del OE, cuando $k=4$ el valor de kappa obtenido categoriza al modelo como “sustancial”, pero al incrementar a $k=6$, el modelo es categorizado como “moderado”. Este efecto confirma lo descrito con las métricas de desempeño y los porcentajes de clasificación, provocando que modelado del OE con KNN no sea competitivo con la técnica de UV-Vis+KNN.

Tabla 23. Resultados promedios de kappa empleando PCA-KNN

Parámetro	Modelo			
	M1	M2	M3	M4
K=4	0.65±0.05	0.84±0.04	0.88±0.02	0.88±0.03
	sustancial	acuerdo casi perfecto		
K=6	0.48±0.06	0.81±0	0.84±0.84	0.88±0.07
	moderado	acuerdo casi perfecto		

4.5.4 Clasificación utilizando ANN

Como última fase de modelado, se utilizaron ANNs con la intención de evaluar el efecto del emplear un aprendizaje automático considerando que el conjunto de muestras de los tequila analizados es relativamente pequeño [166].

El entrenamiento de los modelos neuronales se efectuó tomando una muestra de datos (1 valor de las repeticiones por muestra) de entre n muestras (refiriéndose a los 25 tequilas) para construir el conjunto de datos de prueba y las restantes $n-1$ muestras de datos se reservaron como conjunto de entrenamiento (24 repeticiones por muestra). De esta forma, dado que sólo se utiliza una muestra como conjunto de prueba, los modelos pueden generarse utilizando n datos de entrenamiento.

La Fig. 57 muestra una representación esquemática de cómo implemento el LOOVC para usarla con las ANNs. En este sentido, los modelos de ANN construidos fungirán como clasificadores para identificar cada una de las 25 muestras de tequila (8 tequilas blancos, 12 tequilas reposados y 5 tequilas añejos) en sus respectivas 3 clases.

Para la construcción de un modelo neuronal es necesario establecer ciertos parámetros relacionados con la arquitectura y método de entrenamiento. Una vez que se definen estos elementos, el modelo es entrenado, se continua con validación cruzada de LOOCV, y finalmente se generan las tablas de confusión relacionadas con los elementos clasificados por la ANN.

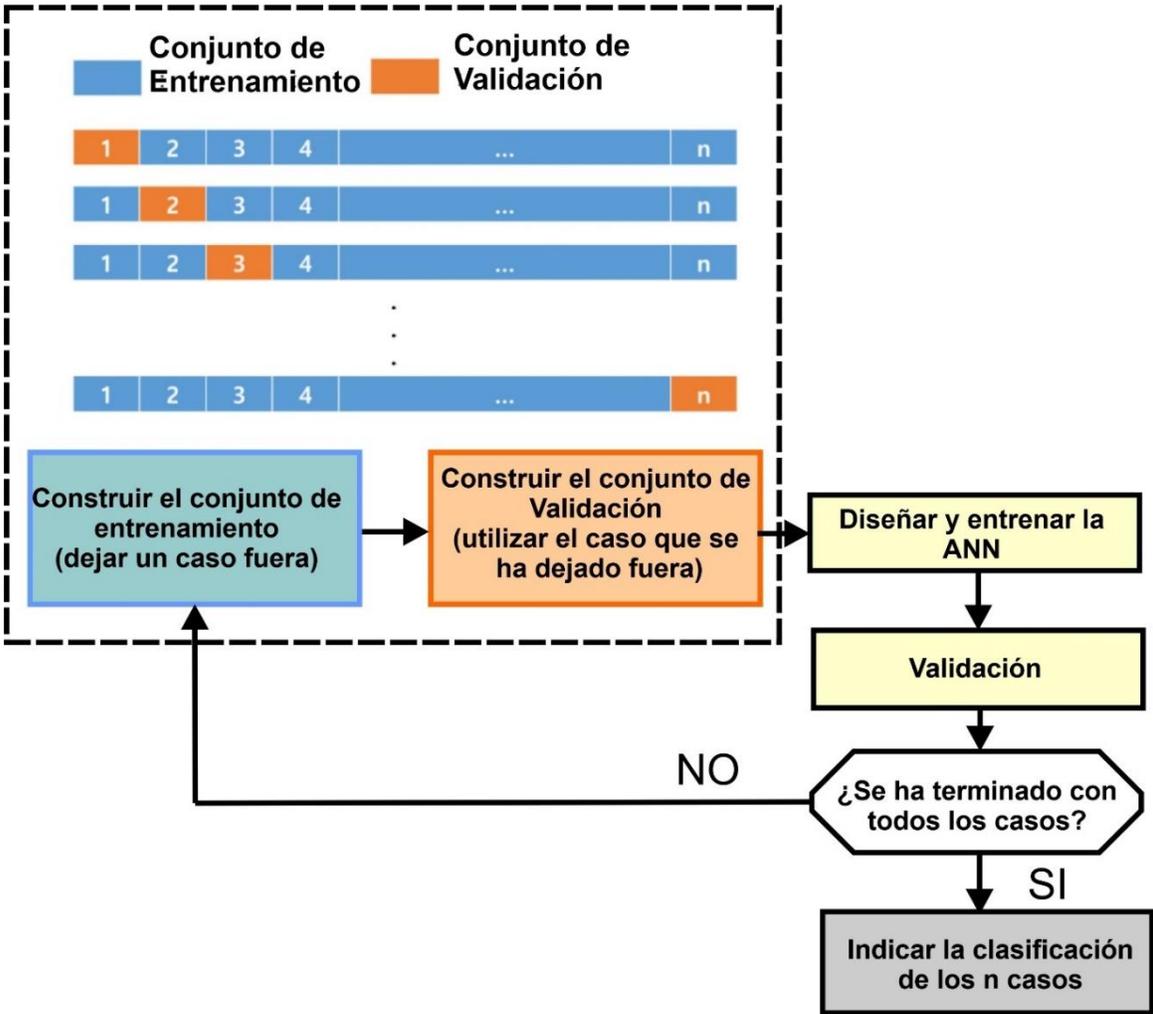


Fig. 57. Estructura de procesamiento y modelado de la red neuronal con el método de validación LOOCV.

Todos los modelos neuronales emplearon una arquitectura de Perceptrón Multicapa (MLP, por sus siglas en inglés), probando diferentes configuraciones usando 5,10 y 15 neuronas en la capa oculta en conjunto con diferentes funciones de transferencia disponibles en el Deep Learning Toolbox de Matlab. Finalmente, de este proceso de refinamiento, se eligió utilizar 15 neuronas en la capa oculta. De forma similar, el algoritmo de entrenamiento elegido fue el de retropropagación Levenberg-Marquardt.

La arquitectura de la ANN utilizada y los parámetros seleccionados para su entrenamiento pueden consultarse en la tabla 24.

Tabla 24. Características de la arquitectura y parámetros entrenamiento de la ANN para la clasificación de muestras de tequila.

Parámetro	Valor
Función de entrenamiento	Retropropagación Levenberg-Marquardt
Meta	0,002
Función de Activación (Capa Intermedia)	Tangente sigmoial
Función de Activación (Capa de salida)	Sigmoide logarítmica
Función de desempeño	Error cuadrático medio
# de Neuronas Capa de Entrada	# de PCs (Componentes principales) de cada modelo
# de Neuronas Capa oculta	15
# de Neuronas Capa de salida	3
Tasa de aprendizaje	0.05
Límite de épocas	1000
Muestras de entrenamiento	24 x tequila
Muestras de prueba	1 x tequila
Validación	LOOCV

Para la clasificación, la salida de la ANN entrega combinaciones de valores binarios (entre 0 y 1). Dado que el ajuste en la red no asegura un valor exacto a la salida una vez terminado el entrenamiento, a las combinaciones binarias se les asignó un valor entero (vea tabla 25) y se consideró que para evitar posibles confusiones de clasificación se empleara un umbral de 0.75. De esta forma cuando la salida de la red entrega un valor menor que 0.75 se ajustará a 0, mientras que si la salida es mayor a

0.75 se ajustará a 1. Este umbral quedo establecido después de reiterados ensayos que permitieron encontrar un intervalo de 0.7 a 0.8.

Tabla 25. Codificación propuesta para las salidas de la ANN

Categoría de tequilas	Valores de Salida	Asignación para identificar
Tequila Blanco	[1 0 0]	1
Tequila Reposado	[0 1 0]	2
Tequila Añejo	[0 0 1]	3
Desconocido	Cualquier otra combinación	4

Una vez que establecidas las características y parámetros de los modelos neuronales a implementar se llevó a cabo la fase entrenamiento siguiendo el esquema de la Fig. 58. Las tablas de confusión completas del proceso LOOCV se pueden consultar en el Apéndice 5 para los cuatro modelos de datos (M1 a M4). Para facilitar la interpretación de los resultados de clasificación, se construyó la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados promedio de clasificación de los diferentes modelos de clasificación del tequila empleando PCA-ANN y sus respectivas métricas de desempeño

Mod.	Categoría de Tequila	% Clasificación	Exactitud	Precisión	Sensitividad	Especificidad
M1: OE	Blancos	99.00	0.99	0.99	0.99	1.00
	Reposados	99.00	0.99	0.99	0.99	1.00
	Añejos	97.60	0.99	0.99	0.99	0.99
	Promedio	98.53	0.99	0.99	0.99	0.99
M2: $\lambda=345$ nm	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	99.00	0.99	0.99	0.99	1.00
	Añejos	99.20	0.99	0.99	0.99	1.00
	Promedio	99.40	1.00	0.99	0.99	1.00
M3: $\lambda=345$ nm + $\lambda=375$ nm	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	99.67	1.00	1.00	1.00	1.00
	Añejos	98.40	0.99	0.98	0.98	1.00
	Promedio	99.36	0.99	0.99	0.99	1.00
M4: UV-Vis	Blancos	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Reposados	98.33	0.99	0.98	0.98	0.99
	Añejos	96.80	0.98	0.98	0.98	0.98
	Promedio	98.38	0.99	0.99	0.99	0.99

Los datos de la tabla anterior nos permiten observar que los modelos de ANN propuestos tienen valores de porcentaje superiores al 98.36 %, siendo particularmente interesante el porcentaje de clasificación obtenido por el modelo M1 del OE quien consigue un 98.53%, consiguiendo identificar el 99% de las muestras de tequilas blancos y reposados, mientras que para el caso de los tequilas añejos se obtiene un 97.60%. Este porcentaje de clasificación global solo es superado por el modelo M2 que se alimenta con las absorbancias correspondientes a la longitud de onda de 345nm del UV-Vis alcanzando un 99.40 %. De forma general, los modelos presentan un comportamiento cercano en la tarea de clasificación, sobre todo si se analizan los valores de los parámetros de desempeño (exactitud, precisión y especificidad) que reportan magnitudes de entre 0.98 y 1.

Un problema común en el entrenamiento de las ANNs, se relaciona con el conocido sobrentrenamiento. Este efecto es evidente cuando el modelo neuronal ajustado no es capaz de identificar muestras nuevas de prueba que no participaron en el entrenamiento. Dado que el proceso de validación utilizó el esquema LOOCV, los valores de desempeño reportados en la tabla 27 podrían atribuirse a un efecto de sobreajuste en los modelos al utilizar solo una muestra de tequila a la vez como elemento de validación o prueba. A fin de analizar que no existe sobreentrenamiento en las ANNs descritas, se calculó el valor de kappa para cada uno de los modelos. En la tabla 28 podemos observar los valores de kappa obtenidos, todos ellos en el rango de 0.97 a 0.98 con desviaciones estándar reducidas que van de 0.023 a 0.034. Dado que los valores de kappa son mayores 0.81 y se aproximan mucho a la unidad, es posible categorizarlos como una respuesta de “acuerdo casi perfecto”.

Tabla 27. Resultados promedios de kappa empleando PCA-ANN para todos los modelos clasificadores propuestos

	Modelo			
Parámetro	M1	M2	M3	M4
<i>K</i>	0.97±0.033	0.98±0.026	0.98±0.023	0.98±0.034
	"acuerdo casi perfecto"			

4.5.5 Comparativa entre clasificadores

Después de analizar las diferentes variantes de procesamiento considerando los modelos de procesamiento descritos en la tabla 17, relacionados con el uso de la información del OE o de la selección de absorbancias de sistema UV-Vis (con tasas de clasificación de entre 98.38% - 99.40% empleando ANNs y 98.38% - 91.29% con el uso de LDA) . En este sentido, la Fig. 58, representa una comparativa general del desempeño de en la identificación de muestras de tequila en los tres tipos estudiados (blanco, reposado y añejo) que se relación con el añejamiento.

En esta gráfica es posible evidenciar que el porcentaje más alto de clasificación es conseguido con el uso del espectro de absorbancias de 200nm a 600nm del modelo M4, empleando ANNs o LDA. Sin embargo, los resultados obtenidos con el desarrollo del OE muestran una perspectiva alentadora del uso de imágenes como medio indirecto para calcular absorbancias que permitan la identificación del añejamiento en el tequila, al aproximarse bastante a técnicas como el UV-Vis incluso, siendo coincidente en que para las tareas de clasificación uso de ANNs y LDA son las mejores opciones (con un 98.53% de tasa de clasificación para el primero y de 90.02% para el segundo).

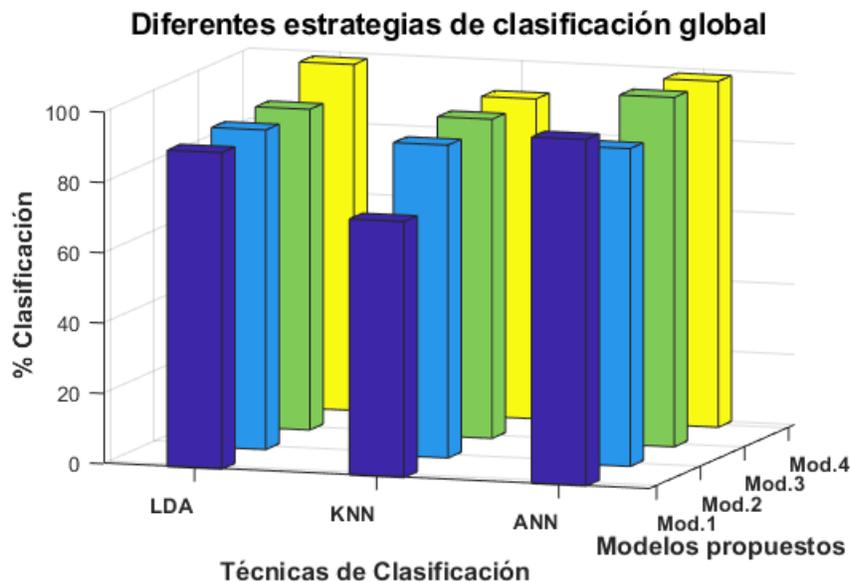


Fig. 58. Comparativa del porcentaje de clasificación para todos los modelos.

Así mismo, aunque el desarrollo de clasificadores usando KNN se integró como una tercera alternativa de modelado, la tasa de clasificación alcanzada por con esta técnica fueron en general menores, sobre todo en lo que al OE respecta (del 72.84%).

Finalmente, la evidencia la concordancia en el proceso de clasificación de los modelos, se graficó el coeficiente kappa de Cohen como medida estadística del modelado en que se empleó LOOCV. La Fig. 59, es una representación del valor evaluado de kappa de cada clasificador. En este sentido, todos los modelos exceptuando el M1 del OE basado en KNN (con kappa de 0.65 - sustancial), presentan valores de entre de 0.81 a 0.97 lo que los identifica como modelos con acuerdo casi perfecto.

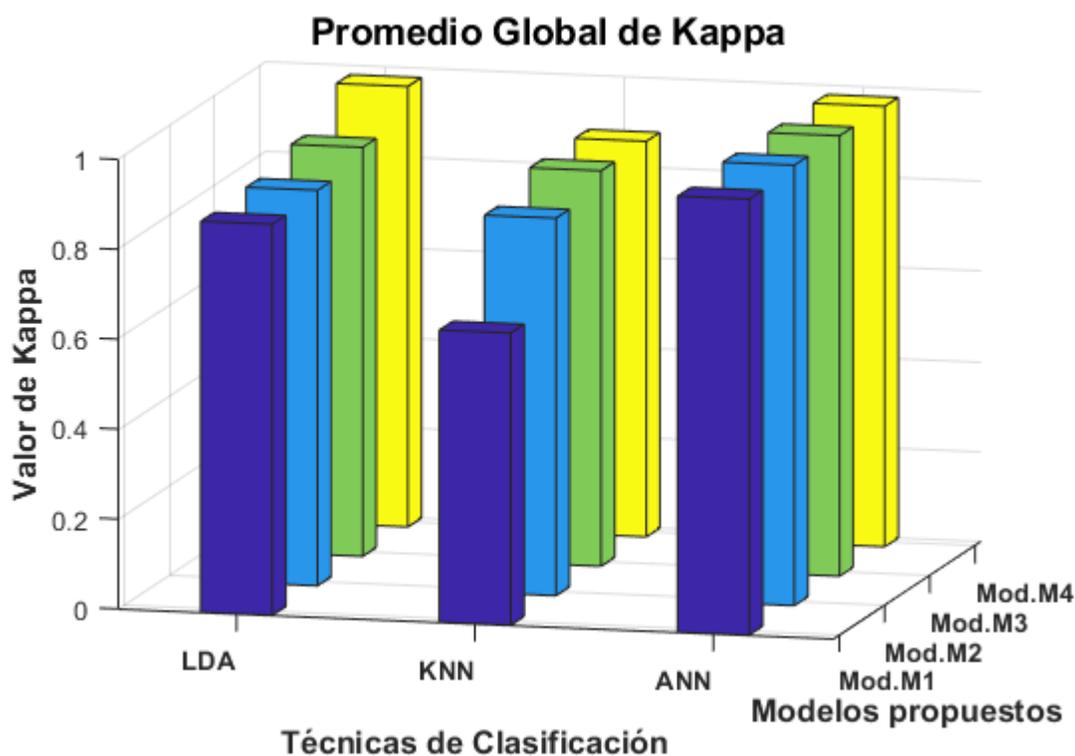


Fig. 59. Valores de kappa para todos los modelos.

4.5.6 Comentarios finales

Los diferentes resultados presentados en la etapa de modelado han permitido conocer la capacidad del OE desarrollado para autentificar las tres categorías de tequila: blanco, reposado y añejo. En primer lugar, a partir del modelo de reconocimiento preliminar construido con PCA, es importante destacar la estrecha relación entre el tiempo de añejamiento de los tequilas y su agrupación a partir del análisis de absorbancia calculada de componentes RGB de una imagen digital.

El efecto del añejamiento de los tequilas se ha estudiado principalmente utilizando métodos analíticos más complejos como el HPLC [38] . En este método se identifican y cuantifican los compuestos fenólicos de bajo peso molecular adquiridos por el tequila durante el proceso de maduración en las barricas de roble. Una vez caracterizados, se relacionan con los diferentes tipos de envejecimiento utilizando el análisis de varianza (ANOVA) generalmente combinado con un análisis discriminante.

Otros trabajos en cambio, estudian el añejamiento a través de la autentificación del tequila recurriendo a métodos de análisis basados en GC-MS [167] y UV-Vis [52] acoplado algunos métodos quimiométricos comúnmente basados en LDA, Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA), Redes Neuronales Artificiales de Perceptrón Multicapa (MLP-ANN), y Máquinas de Vectores de Soporte (SVM) por nombrar algunos.

Sin embargo, aunque estas contribuciones difieren de nuestro estudio en factores como la naturaleza de los datos analíticos obtenidos y el número de muestras de tequila analizadas, representan los aportes científicos más recientes en la identificación de las tres principales categorías de los tequilas certificados. Además, informan de parámetros de rendimiento como la sensibilidad y la especificidad de los modelos clasificadores que utilizaron, lo que permite compararlos directamente con nuestros resultados.

La tabla 28 presenta una comparativa de los parámetros de desempeño de los modelos clasificadores que cada autor empleo en la identificación de los tequilas y su relación con el añejamiento, empleando métodos analíticos convencionales.

Tabla 28. Comparación del OE con publicaciones representativas sobre la identificación del tequila relacionada con su añejamiento (B=Blanco, R=Reposado y A= Añejo)

Referencia	Método Analítico	Modelado de clasificación	Categoría del Tequila	Sensitividad	Especificidad
Ceballos-Magaña et al.[167]	GC-MS	LDA	B	0.66	0.75
			R	0.33	0.92
			A	0.66	0.73
		MLP-ANN	B	1.00	1.0
			R	0.83	1.0
			A	1.0	0.93
Pérez-Caballero et al. [52]	UV-Vis	PLS-DA	B	0.81	0.89
			R	0.71	0.88
			A	1.00	0.93
		SVM	B	1.0	1.0
			R	1.0	0.99
			A	0.96	1.0
Esta investigación	OE	PCA-LDA	B	1.00	1.00
			R	0.92	0.92
			A	0.78	0.95
		PCA-ANN	B	0.99	1.00
			R	0.99	1.00
			A	0.98	0.99

De este modo, queda claro que el modelo adoptado en este trabajo mediante el uso de PCA-LDA logró un rendimiento superior en la identificación individualizada de las 3 clases (sensibilidad para B=1.00 , R=0.92, A=0.78 y especificidad para B=1.00 , R=0.92, A=0,95) que el modelo LDA (sensibilidad para B=0.66, R=0.33, A=0.66 y especificidad para B=0.75, R=0.92, A=0.73) reportado por Ceballos-Magaña et al. [167], y el PLS-DA (sensibilidad para B=0.81, R=0.71 ,A=1,00 y especificidad para B=0.89, R=0.88, A=0.93) descritos por Pérez-Caballero et al.[52].

Estos resultados son notables porque, en este trabajo, la información de analítica de las muestras de tequila se obtiene de forma indirecta a través de una imagen y un modelo lineal fue suficiente para identificar los tequilas a partir de sus absorbancias experimentales RGB.

Aunado a lo anterior, los autores mencionados anteriormente también necesitaron el uso de modelos con estrategias no lineales de ajuste (por ejemplo, MLP-ANN y SVM) que generalmente se relacionan con un costo computacional alto para conseguir modelos de clasificación optimizados. En este aspecto, el OE basado en PCA-ANN demostró una eficacia equiparable (sensibilidad de 0.99 para B,R y 0.98 para A y especificidad de 1.00 para B y R mientras que para A=0.99) con el modelo MLP-ANN (sensibilidad para B=1.00, R=0.83, A=1.00 y una especificidad para B=1.0, R=1.00, A=0.93) reportado por Ceballos-Magaña et al. [167], y SVM (sensibilidad para B=1.00, R=1.00 ,A=0.96 y especificidad igual que la del OE PCA-ANN) descritos por Pérez-Caballero et al.[52].

Finalmente, en la investigación del presente trabajo también se consiguieron resultados obtenidos del análisis UV-Vis de los tequilas. Cuya primera intención consistía en validar al sistema de OE desarrollado. Sin embargo, es posible identificar que existe un comportamiento semejante a los ya reportados por Pérez-Caballero et al.[52] (observe la Fig. 60).

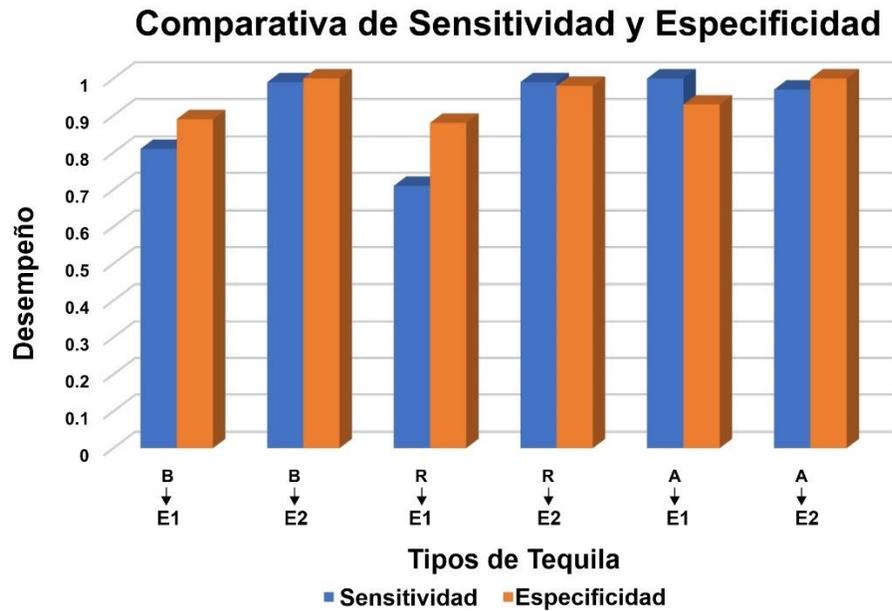


Fig. 60. Comparativa de estudios usando la técnica UV-Vis para los tres tipos de Tequila (B=Blanco, R=Reposado y A= Añejo; E1= Estudio realizado por Pérez-Caballero[52], E2= Estudio de esta investigación)

Lo que permite corroborar que la estrategia de análisis UV-Vis empleada como método de validación del OE fue adecuada.

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

El objetivo de este trabajo fue establecer los fundamentos necesarios para el diseño y construcción de un ojo electrónico para analizar el color en muestras de tequila con la intención de identificar la tonalidad del añejamiento que da origen a los diferentes tipos de este destilado. Para lograrlo se abordaron varios aspectos como el desarrollar la instrumentación necesaria para la adquisición de la imagen y la correspondiente clasificación de la información proveniente del sensor de imagen CMOS de la cámara para después transformar la información de la imagen digital a datos útiles. A través de los resultados descritos en el capítulo 4 de este trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones y las perspectivas a futuro del trabajo desarrollado.

5.1 Sistema Analítico de Ojo Electrónico

Se diseñó y construyó un ojo electrónico basado en instrumentación desarrollada en laboratorio junto con una etapa de procesamiento de imágenes para construir un sistema de inspiración biológica capaz de distinguir entre diferentes tipos de tequila, a saber, blanco, reposado y añejo. La repetibilidad del sistema se demostró mediante el análisis estadístico de las imágenes capturadas utilizando información del espacio de color RGB. El análisis preliminar de estos datos empleando PCA fue relevante para observar su comportamiento y evaluar el agrupamiento de clases de tequila principalmente relacionado con el proceso de añejamiento.

Para el proceso de clasificación formal destinado a la identificación de las variedades del tequila, se construyeron modelos LDA, ANN y KNN para reconocer tequilas a través de las absorbancias RGB evaluadas utilizando un esquema LOOCV para identificar las muestras correctamente. De esta forma el modelado LDA permitió obtener una tasa de clasificación global de 90.02%, mientras que con el uso de ANN se mejoró sustancialmente consiguiendo una tasa de clasificación global de 98.53% para las tres clases de tequila involucradas. Por su parte el modelado con KNN ($k=4$) solo consiguió una tasa de clasificación global de 72.84%, situación que para el caso

particular del conjunto de muestras analizadas lo convierte en una estrategia deficiente frente a las anteriores.

Respecto de los parámetros de desempeño tales como la sensibilidad promedio obtenida por parte del LDA fue de 0.90, en tanto que la especificidad fue de 0.96. En el caso de las ANN, se mejoran estos parámetros al obtener valores para la sensibilidad y especificidad promedio de 0.99. Considerando que las muestras de tequila analizadas están agrupadas en clases desequilibradas, se calculó el coeficiente kappa para corroborar que las medidas de desempeño no fueran demasiado optimistas. De esta forma, el valor medio del coeficiente kappa para los modelos LDA fue de 0.87 y de 0.97 para las ANN, lo que implica que los modelos interpretan datos confiables sin privilegiar ninguna clase de tequila después del ajuste.

Estos resultados muestran que la estrategia de análisis de imágenes desarrollada basada en la información RGB obtenida de las imágenes JPEG comprimidas, junto con la etapa de modelado PCA-LDA y PCA-ANN, no dificultó la identificación de los tequilas al retener suficiente información de color de las muestras analizadas. Otro punto notable es que el método presentado aquí concuerda con los resultados informados por algunos estudios previos que emplean técnicas analíticas convencionales como GC-MS [1] y UV-Vis [2] combinadas con métodos de clasificación no lineal. En este sentido, el ojo electrónico desarrollado constituye una herramienta confiable y fácil de usar que permite un análisis rápido y no destructivo de los tequilas para autentificarlos según las tres categorías principales que se estudiaron.

5.2 Calibradores de color

La implementación del uso de calibradores de color, basados en muestras colorimétricas de silicón permitieron garantizar la trazabilidad de las mediciones realizadas en la fase de calibración del OE. Teniendo en cuenta la necesidad de revisar periódicamente la exactitud fotométrica y la longitud de onda del sistema, los calibradores construidos tuvieron la ventaja de no presentar variaciones asociadas al

cambio de temperatura y a la degradación debida al tiempo. Lo que los convierte en una alternativa fiable como patrones de referencia colorimétrica ante los calibradores estándar (filtros) que suelen utilizarse en la técnica de espectrofotometría que generalmente son contruidos con vidrio [168], que aunque son capaces de tolerar altas temperaturas, son sensibles a los choques térmicos que pudieran ocurrir dentro del sistema de medida, suelen tener un costo elevado y deben ser manipulados con sumo cuidado para evitar dañarlos.

La alternativa de los calibradores de silicón brinda la posibilidad de emplearlos como referencia colorimétrica en la caracterización de otros sistemas ópticos. Su correcta respuesta fue analizada con la técnica UV-Vis demostrando que los calibradores presentan una clara separabilidad entre sí a través de su absorbancia, además, su construcción ofrece una alta reproducibilidad a un bajo costo de fabricación, por lo que podrían fabricarse sets de patrones colorimétricos de acuerdo con cada aplicación.

5.3 Sugerencias para trabajo a futuro

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación, es posible evidenciar aplicaciones potenciales en las que el OE puede brindar ventajas respecto de sistemas analíticos convencionales. De entre las más relacionadas podemos mencionar las siguientes:

Dado que el OE es capaz de analizar la información del color en los tequilas, se puede ahondar más en la temática para realizar más estudios que permitan la identificación de tequilas falsos o mixtos, empleando como punto de partida la metodología descrita en este trabajo con la intención de reconocer aquellos adulterantes directamente relacionados con las modificaciones colorimétricas en el tequila.

También resulta factible, utilizar el OE en el estudio de otras bebidas espirituosas mexicanas, en particular, variantes del tequila como el mezcal, el sotol o la bacanora. Pero también sería su uso en el análisis de vinos, coñacs, brandies y whiskies.

Así mismo, aunque el OE realiza estudios colorimétricos para conocer cualidades como el color en los tequilas y su relación con el añejamiento como una de las características organolépticas más importantes relacionadas con la calidad, el sistema podría emplearse en la determinación cuantitativa de elementos químicos específicos, si la información de las imágenes digitales se relaciona con la información analítica de concentraciones específicas de compuestos (obtenidas de técnicas electroquímicas como la voltamperometría, la espectrofotometría y la cromatografía de gases-masas).

Un aporte importante desde el punto de vista instrumental es el empleo de la tecnología CMOS como media de captura de imágenes digitales que, en conjunto con el uso de una computadora de bajo costo, permiten un diseño compacto y portable del OE. Sin embargo, este diseño puede migrarse al uso de un teléfono inteligente al que con un mínimo de adaptaciones podría operar de forma similar al diseño del OE actual, pero aprovechando los recursos de procesamiento y almacenamiento del propio teléfono. Permitted incursionar en lo que algunos autores llaman: teléfonos inteligentes como herramientas analíticas.

Aunque el espacio de color RGB es el modelo más utilizado en el análisis de imágenes, existen otros modelos de color que también podrían utilizarse con la intención de mejorar la interpretación de las imágenes digitales. Sin embargo, esto también implicaría estudiar a profundidad otros formatos de imagen como el RAW. La intención principal sería limitar el efecto de las interferencias ópticas, así como el uso de otros tipos de fuente luz.

5.4 Productos Científicos obtenidos del desarrollo de la tesis

Derivado del desarrollo de la presente tesis doctoral, se generaron los siguientes productos científicos:

Artículo publicado en revista internacional indexada (factor de impacto de 5.743)

- **Gómez, A.**; Bueno, D.; Gutiérrez, J.M. Electronic Eye Based on RGB Analysis for the Identification of Tequilas. *Biosensors* 2021, 11, 68. [doi: 10.3390/bios11030068](https://doi.org/10.3390/bios11030068)

Capítulo de libro publicado en Editorial de Prestigio Internacional (colaboración de Elsevier y Book Aid International):

- Bueno, D, **Gómez, A**, Domínguez, RB, Gutiérrez, J.M., Marty, J.L., 2021, Chapter 3. Optical methods using smartphone platforms for mycotoxin detection. En *Smartphone-Based Detection Devices: Emerging Trends in Analytical Techniques*. Elsevier, pp. 37-56. ISBN 9780128236963. [doi: 10.1016/B978-0-12-823696-3.00003-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823696-3.00003-9)

Artículos Publicados en Memorias de congreso Nacionales con arbitraje estricto:

- **Gomez Rocha**, Gutiérrez Salgado. Caracterización colorimétrica de un ojo electrónico (OE). Tomo VI: Ingeniería. pp.412-421. *Miscelánea Científica en México Centro de Investigaciones en Óptica*, octubre 2020 con ISBN Obra completa 978-607-835-886-1.
- **Gomez Rocha**, Gutiérrez Salgado. Sistema de Espectrometría para caracterización de Líquidos. Tomo 09. pp.7-12. *Memorias del Congreso*

Internacional de Investigación Academia Journals Celaya 2019 con ISSN 1946-5351, Volumen 11, No. 9, 2019

Artículos Publicados en Memorias de congreso Internacionales con arbitraje estricto:

- **Gómez, A.**; Bueno, D.; Gutiérrez, J.M. Electronic Eye for Identification of Tequila Samples. *Proceedings 2020*, 60, 44. [doi: 10.3390/IECB2020-07073](https://doi.org/10.3390/IECB2020-07073)
- **A. I. Gomez**, J. M. Gutiérrez and R. Muñoz, "Design of an optical portable system for detection of pH," 2018 Global Medical Engineering Physics Exchanges/Pan American Health Care Exchanges (GMEPE/PAHCE), 2018, pp. 1-6, [doi: 10.1109/GMEPE-PAHCE.2018.8400745](https://doi.org/10.1109/GMEPE-PAHCE.2018.8400745)

Este trabajo también ha sido difundido a nivel nacional en:

- Conexión Cinvestav
Acceso: viernes 30.09.2022 - 18:06
URL:<https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/con-tecnolog237a-garantizan-tequila>
- Revista: CRÓNICA ACADEMIA:
Acceso: viernes 30.09.2022 - 18:10
URL:<https://www.cronica.com.mx/academia/desarrollan-cinvestav-ojo-electronico-identificar-tequila-falso.html>

Artículo Indexado-Biosensors

Article

Electronic Eye Based on RGB Analysis for the Identification of Tequilas

Anais Gómez , Diana Bueno  and Juan Manuel Gutiérrez * 

Bioelectronics Section, Department of Electrical Engineering, CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico; arochag@cinvestav.mx (A.G.); dbuenoh@ipn.mx (D.B.)

* Correspondence: mgutierrez@cinvestav.mx; Tel.: +52-55-5747-3800

Abstract: The present work reports the development of a biologically inspired analytical system known as Electronic Eye (EE), capable of qualitatively discriminating different tequila categories. The reported system is a low-cost and portable instrumentation based on a Raspberry Pi single-board computer and an 8 Megapixel CMOS image sensor, which allow the collection of images of Silver, Aged, and Extra-aged tequila samples. Image processing is performed mimicking the trichromatic theory of color vision using an analysis of Red, Green, and Blue components (RGB) for each image's pixel. Consequently, RGB absorbances of images were evaluated and preprocessed, employing Principal Component Analysis (PCA) to visualize data clustering. The resulting PCA scores were modeled with a Linear Discriminant Analysis (LDA) that accomplished the qualitative classification of tequilas. A Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV) procedure was performed to evaluate classifiers' performance. The proposed system allowed the identification of real tequila samples achieving an overall classification rate of 90.02%, average sensitivity, and specificity of 0.90 and 0.96, respectively, while Cohen's kappa coefficient was 0.87. In this case, the EE has demonstrated a favorable capability to correctly discriminated and classified the different tequila samples according to their categories.

Keywords: biologically inspired; electronic eye; optical methods; RGB analysis; tequila



Citation: Gómez, A.; Bueno, D.; Gutiérrez, J.M. Electronic Eye Based on RGB Analysis for the Identification of Tequilas. *Biosensors* **2021**, *11*, 68. <https://doi.org/10.3390/bios11030068>

Received: 29 January 2021
Accepted: 25 February 2021
Published: 2 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tequila is the traditional Mexican spirit made with agave *tequilana weber* (blue variety), which is grown in five states of Mexico, namely: Guanajuato, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas, and Jalisco. Those geographical regions are established in the Protected Designation of Origin (PDO) [1], which guarantees both the manufacturing procedures and the quality necessary to comply with the strict export specifications from the United States [2] and the European Union [3].

Three main categories of tequila are recognized. The first category is Silver tequila. It is obtained directly from the distillation process without additives; it has a transparent appearance, not necessarily colorless proper to an unaged tequila. The second category is called Aged tequila, which means that the tequila has been aged at least two months using oak casks. This process produces a mellowed product with rich color and flavor. Finally, the third category is known as Extra-aged. This tequila is considered more sophisticated because it has been aged for at least one year in wood or oak recipients with $V \leq 600$ L, which has enhanced its flavor with predominant woody notes in its color and aroma [1].

These spirits, whose world consumption ranks fourth after whiskey, vodka, and rum, have a significant presence in more than 120 countries, representing sales of more than 200 million liters per year [4]. Hence, quality control is increasingly important to know, characterize, and monitor its aging process, alcoholic content, and volatile composition that define each kind of tequila's flavor, color, and characteristic aroma.

Nowadays, several tests are carried out in the laboratory to analyze tequila, most of them performing conventional analytical methods such as UV-Vis spectrophotometry [5],

Raman spectroscopy [6], Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) [7], High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) [8], Surface Plasmon Resonance (SPR) [9], and electrochemical analysis [10]. Nonetheless, despite their reliability and accuracy, they have several flaws related to long protocols demanding an analysis period from hours to days to carry out the tests, expensive equipment, and the need for technically qualified personnel, without forgetting that their use is confined to special installations with no online quality control possibilities.

Hence, there is an urgent need for fast, inexpensive, portable, and effective alternatives that achieve reliable, non-destructive analytical measurements. Today, biologically inspired analytical systems are beginning to play an important role in the food industry [11,12]. These technologies, sometimes defined as artificial senses, have the perspective of evaluating complex composition samples by emulating the human senses to determine their relevant characteristics. Essentially, the electronic eye has been designed to mimic human eyesight to analyze color and some other attributes related to the sample's appearance [13,14]. This task can be performed using computer vision, colorimetric, or spectrophotometric methods [15–17].

Usually, an electronic eye is built of technology capable of converting optical images into digital images, subsequently analyzed to identify particularities that allow the characterization of what is being observed, avoiding the subjective interpretation of a person [18]. In this sense, image sensors based on a Charge Coupled Device (CCD) or a Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS) technology are commonly used. Both types of sensors are essentially made up of metal oxide semiconductors (MOS) distributed in a matrix form, and that each independently constitutes a pixel [19]. Once the images are collected, they are subjected to an image processing phase to improve their quality and extract characteristics requiring specific computational algorithms for their interpretation [20].

Electronic eyes have been proven to have an advantage in foodstuff analysis; their applications cover different food industry areas such as quality control, freshness assessment, shelf-life determination, process monitoring, and authenticity assessment [14]. Although the use of electronic eyes in the analysis of some liquids have widely described during the last two decades, these works were focused on samples such as orange juice [21], coffee [22], virgin olive oils [23], milk [24] and some semi-liquids like honey [25], and yogurt [26]. Only a few studies reported the analysis of alcoholic beverages mainly related to wine [27,28], beer, and vodka [29]. Comparatively, the tequila study still continues using conventional techniques instead of an electronic eye. Most tequila analyses have been focused on the determination of quality characteristics [30], sensory properties related to the distillation process [31], evaluation of volatile compounds [32], the relevance of the aging process [33], authenticity [34,35], and adulterations [36].

This work aims to establish the foundations for using an electronic eye in the qualitative identification of different kinds of tequila. The developed analytical system comprises an acquisition image platform that captures and digitalized images directly from tequila, coupled with a biomimetic processing stage based on the trichromatic theory of color vision [37]. In this context, RGB absorbances of images were evaluated and subsequently discriminated against using a Principal Component Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA), with was possible to correctly classify the three main tequila categories coming from the Jalisco state region.

The paper is divided into five sections as follows: Section 1 introduction and state of art, Section 2 describes the materials and methods, including details of tequilas set under study, the electronic eye hardware design, experimental setup, image analysis, and data modeling of the proposed biomimetic vision system; Section 3 reports the experimental results obtained from the proposed RGB component analysis, followed by Section 4 where it discusses and compares the key results achieved with our work compared to those reported with conventional analytical techniques. Finally, Section 5 contains the conclusion together with some directions for future work.

2. Materials and Methods

2.1. Tequilas under Study

A total of 25 samples of different brands were acquired at the local supermarket, all of them with POD, made with 100% agave and certified by Consejo Regulador del Tequila (CRT, for its acronym in Spanish) to ensure their authenticity. These samples were chosen according to the main described categories and considering that they were made in the state of Jalisco. In this way, the formed set includes 8 Silver, 12 Aged, and 5 Extra-aged tequilas. Table 1 summarizes detailed information about the tequila samples used.

Table 1. Tequila samples under study grouped by category.

Type	Brand	Tag	Alcoholic Strength (vol %)
Silver	Hornitos	S1	38
	Orendain	S2	38
	Don Nacho	S3	38
	Corralejo	S4	38
	Dos Coronas	S5	38
	Sombrero Negro	S6	35
	Antigua Cruz	S7	40
	Herradura	S8	46
Aged	Hornitos	A1	38
	Jimador	A2	35
	Jarana	A3	35
	Don Nacho	A4	38
	Cabrito	A5	38
	Antigua Cruz	A6	40
	Don Julio	A7	40
	Dos coronas	A8	38
	Sombrero Negro	A9	38
	Reserva del Señor	A10	35
	Cazadores	A11	38
	Jose Cuervo	A12	38
Extra-aged	Corralejo	EA1	38
	Don Nacho	EA2	38
	Antigua Cruz	EA3	40
	Cazadores	EA4	38
	Hornitos	EA5	35

2.2. Electronic Eye System

A single-board computer Raspberry Pi (Model 3B+, Pencoed, Wales, UK) with a Raspbian operating system was chosen as a core for developing the Electronic Eye (EE) prototype. The light source was a white Light-Emitting Diode (LED) 2xLED (Flash Module Huawei LYA-L09, Shenzhen, Guangdong, China), and a camera module (Raspberry Pi Camera V2, Pencoed, Wales, UK) with an 8 Megapixels image sensor (Sony IMX219, Minato, Tokyo, Japan) to perform the image acquisition. It also has a 7-inch Liquid Crystal Display (LCD) (Hilitand hfpq73zx89, Shenzhen, Guangdong, China) that allows interaction with the equipment through a Graphical User Interface (GUI) created in MATLAB®2020a (MathWorks, Natick, MA, USA). The complete system is managed via Python IDLE 2.7 software, using specific routines programmed by the authors. Figure 1 shows a schematic diagram of the developed EE.

Different EE electronics parts are placed in an enclosure designed in SolidWorks 2019 and printed with a Da Vinci 3D 1.1 printer (Xyzprinting, New Taipei City, Taiwan) to operate as a PC peripheral. The design allows the light source location, camera module, and a disposable plastic UV-cuvette (BRAND, Wertheim, Germany) within a dark chamber. The cuvettes' filling volume has a range of 1.5 to 3.0 mL, with external dimensions of 4.5 mm × 23 mm that fits into an internal holder of the chamber, allowing it to be located at

a fixed distance of 30 mm from the focal plane of the image sensor of the camera. The white LED was positioned in a centered zenith plane to improve accuracy and image acquisition (this position is widely used for samples with flat surfaces) [16]. In this way, white light can propagate from the source, passes from the chamber through the sample held in a cuvette, and reaches the image sensor avoiding possible external interference. At this point, it is possible to acquire the sample's corresponding digital image. The set of images captured by the EE system were saved automatically in a USB (Universal Serial Bus) device and processed offline employing the GUI designed for this purpose.

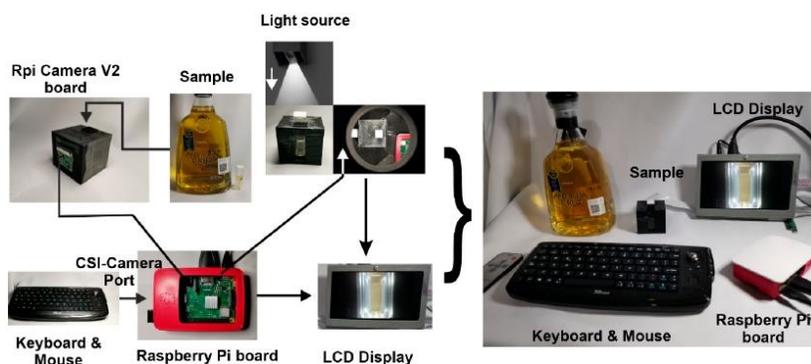


Figure 1. Schematic diagram of the developed Electronic Eye showing different electronic parts assembled and communication interface used.

2.3. Experimental Procedure

After opening each tequila bottle, the spirit was immediately taken. A sample volume of 1 mL of spirit was used directly without pretreatment to fill different UV-cuvettes free of dust and dirt to obtain trustworthy images. Additionally, a cuvette containing the same volume of deionized water was used as a blank solution. All experiments were carried out at room temperature (25 °C). The first measured sample with the EE corresponded to the blank solution to establish a system's reference signal. Subsequently, the UV-cuvettes containing different samples of tequila were measured one by one. The captured digitized images were recorded and stored using the programmed control software. During the entire experimental stage, it was ensured that the chamber remains closed during the image capture process to avoid the entry of external light and obtain good quality images.

Meanwhile, the white light source stayed on, waiting for the camera module to acquire the image and send it to the Raspberry Pi computer. Each sample was analyzed in triplicate, performing 10 repetitions each time to observe the repeatability and reproducibility of measures. The time to complete the measurement process by the EE system is 10 s.

2.4. Image Analysis

Digital images were obtained after placing a UV-cuvette with tequila sample in the lab-made EE system described above. In all cases, the camera settings used in our experiments were fixed (exposure time of 1/16 s, an aperture of $f/2$, and ISO 100). From the images captured by the EE of each tequila sample and the three categories involved, separate files were saved as a *jpeg* format on the Raspberry Pi memory; the average size per image is 2.7 MB (8 Megapixels resolution, 2592×1944 pixels). Although using compressed *jpeg* image format implies a loss of information regarding the *raw* format, some works have reported that the RGB obtained from them contained comparable information to those in large raw files [38,39]. Likewise, *jpeg* files retained the residing color information and allowed ease of handling due to the smaller file size, mainly when some multivariate calibration techniques were used to interpret them [39,40]. In our case, using the *jpeg*

format also allowed efficient use of hardware resources (in terms of data storage and computational power requirements), as well as, this image format is closest to the images obtained by the human visual system since they are transformed using color-matching functions [41].

For the image analysis process, it is necessary to perform a preprocessing task that consists of selecting and clipping a region of interest (ROI). The ROI was chosen considering the viewing window of the UV-cuvette. This cropped area of the image and its relative position concerning the sample support is always constant. In this way, the complete set of images were cropped and saved as a separate file with a new dimension size of 1244×231 pixels.

Taking into account that digital images are a numeric representation of a two-dimensional collection of data, a digital image contains a fixed number of rows and columns of pixels where each pixel is specified for the red, blue, and green coordinates of a pixel array. This conceptualization of the image is related to the trichromatic theory of color vision based on the work of Maxwell, Young, and Helmholtz [37]. This theory states that there are three types of photoreceptors in the human eye, approximately sensitive to the red, green, and blue region of the spectrum, which are related to the three types of cone cells, generally referred to as L, M, and S (long, medium, and short wavelength sensitivity). These cells are responsible for the perception of colors; analogously, in the RGB color model, the image can be represented by the color's intensity, which indicates how much red, green, and blue is present in the image [42]. Hence, each component varies from zero to 255 [43]. If all the components are zero, the result is black color. In the opposite case, the result is a white color.

In the same way, considering that the obtained images are true-color images, it is possible to represent them as 3D matrices associated with RGB components. Making it possible to observe its tonal distribution through a histogram and evaluate its corresponding absorbance [44]. The critical steps followed for the EE acquisition and elaboration of RGB images' regions are illustrated in Figure 2.

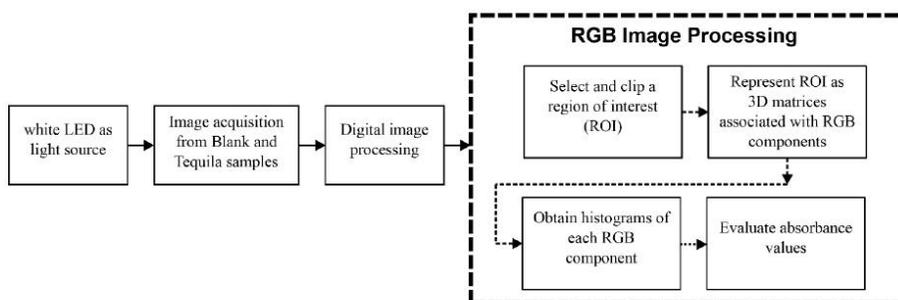


Figure 2. A generalized block diagram of acquisition and identification of image processing performed by the Electronic Eye.

The corresponding absorbances associated with the RGB components for the available image set were evaluated using the Lambert–Beer law. This law expresses the proportional relationship between the absorbance and the concentration of certain compounds present in the sample under analysis. The equation representing this law is a crucial element in evaluating the absorbance of a sample [45].

$$A_{\lambda} = -\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon b C \quad (1)$$

where A_{λ} is the absorbance defined via the incident intensity I_0 (incident light over the sample) and transmitted intensity I_1 (transmitted light that comes out of the sample), λ is

the wavelength of the source light, C is the concentration of the absorbent sample expressed in $\text{moles} \cdot \text{L}^{-1}$, b is the optical path (thickness of the cell), and ε is the molar absorptivity coefficient.

Similarly, it is possible to establish that (1) expresses the proportional relationship between the absorbance and the concentration of certain compounds present in the sample under analysis. Consequently, it was part of the implemented algorithms.

Experimentally, when light continues its path from the sample, passes through the camera lens, and reaches the image sensor, some light intensity is lost. This effect is because once a beam of light passes through the UV-cuvette made of transparent material containing the sample, its intensity varies due to the phenomena of absorbance, reflection, and transmission [46]. Therefore, it is possible to compare the light intensity transmitted by a standard (in our case, obtained by a blank solution) and the interest sample's light intensity. This procedure allows to obtain an experimental absorbance, as shown below in (2):

$$A_{\lambda\text{experimental}} = \log\left(\frac{I_{\text{solvent}}}{I_{\text{analyte solution}}}\right) \quad (2)$$

where the experimental absorbance $A_{\lambda\text{experimental}}$ is evaluated by I_{solvent} related to the blank solution (in this work it was used deionized water) considered a standard sample, and $I_{\text{analyte solution}}$ corresponding to each tequila sample to be analyzed.

2.5. Data Processing and Modelling

Data image processing and modeling were done using the specific routines written in MATLAB®2020a by the authors, based on already preprogrammed standard functions using Statistics and Machine Learning Toolbox (v11.7). Before carrying out any data processing and modeling task, it was decided to obtain information on the brightness and tonality characteristics of the acquired images to corroborate the equipment's optical adjustment. For this purpose, histograms of each RGB component were obtained for each available image. Subsequently, the experimental RGB absorbances were calculated (as described in Section 2.4). These calculated values were used as input for two different analysis methods: Principal Component Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA). Considering that LDA is a supervised classification method, classification accuracy was evaluated using a Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV) procedure. This iterative method starts using as a training set all the available observations except one, which is excluded for use as validation.

As is known, PCA is an analysis method that depends on an orthogonal linear transformation, which allows summarizing almost all variance contained in a dataset on a fewer number of directions (PCs) with newer coordinates (scores) [47]. In most cases, PCA analysis allows showing clustering data according to their similarities, so it is possible to build a preliminary recognition model that shows the different classes involved according to the measurements made. Nevertheless, to perform a proper classification task, it is necessary to use a supervised learning approach. In this regard, LDA is one of the most used classification procedures with proved successful in many applications [48]. The idea behind LDA is to find a linear transformation that best discriminates among classes. This method operates maximizing between-class variability relative to within-class variability. In this manner, the classification is performed in the transformed space based on some metrics such as Euclidean distance. However, one of the most typical methods to implement is computing a scattering matrix, which must be non-singular. Nonetheless, this criterion cannot be applied when the matrix is singular. A situation that frequently occurs in applications using image databases for pattern recognition, where the number of measurements of each sample exceeds the number of samples in each class. To tackle this problem, it is possible to implement a two-stage approach based on PCA plus LDA. Considering that both methods project the data into a smaller subspace, PCA focused on finding the PCs that maximize the variance in the data set (without considering the class

labels), while LDA finds the components that maximize between-class separation. Detailed information about this improved LDA method can be found in [49,50].

3. Results

3.1. RGB Image Processing

The experimental phase with the EE allowed capturing a total of 750 tequila images (10 photos for each sample of the 25 tequilas in triplicate). The selected ROI is automatically defined and fixed for all analyzed sample images from these data, as was described in Section 2.4. Figure 3 shows four representative samples and their corresponding captured images for one tequila sample per class plus the blank solution. The black dotted lines within the UV-cuvette image denote ROI selected image area. The histogram visualization shows the presence of reddish, greenish, and blueish pixels in association with the corresponding RGB components of the images. It is possible to show that both the distribution of these color components and their intensity is clearly different for each tequila type. Similarly, it can be assumed that the information captured in the images using fixed camera parameters (exposure time, aperture, and ISO) and under the same lighting conditions is representative to build a classifier model to identify different categories of tequila.

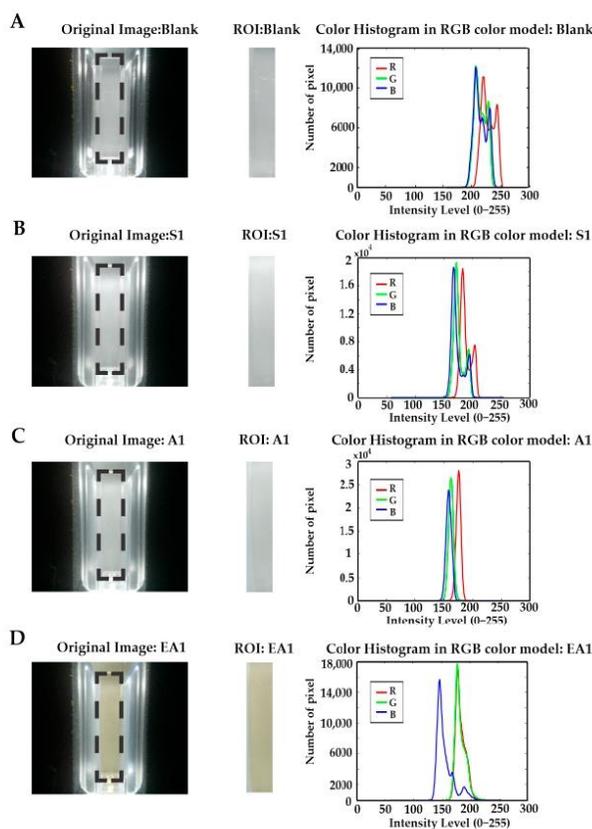


Figure 3. Representative images of (A) Blank solution, (B) Silver tequila, (C) Aged tequila, and (D) Extra-aged tequila samples. The image captured by the Electronic Eye (EE), region of interest (ROI) and Red, Green, and Blue (RGB) intensity histogram is noted from left to right.

As a reference, color has been one of the important factors in food quality measurement [39]. For this purpose, it is possible to use the RGB model because it is one of the best for detecting color variations of digital images. In this way, the acquired images were organized as a matrix of dimension 30×75 , where the rows correspond to the total number of repetitions (3 tests with 10 repetitions for each test), and the columns represent the 25 tequila samples analyzed by triplicate. The intensities of RGB components are summarized in Table 2. It also integrated each RGB component’s absorbance and samples’ total absorbance, obtained through Equation (2).

Table 2. Electronic Eye RGB component’s intensities and absorbances values for tequila samples. Furthermore, total absorbance values are reported.

Tag	Average Components of RGB Pixel			Absorbance by Component			Absorbance _λ
	R	G	B	R	G	B	
Blank	255	251 ± 4.0970	253 ± 3.4674	0	0.0026 ± 0.0040	0.0012 ± 0.0027	0.0016 ± 0.0038
S1	215 ± 0.6915	215 ± 1.1861	215 ± 1.0148	0.0729 ± 0.0014	0.0720 ± 0.0024	0.0729 ± 0.0021	0.0726 ± 0.0020
S2	216 ± 1.1059	216 ± 0.8137	216 ± 0.9248	0.0706 ± 0.0023	0.0696 ± 0.0017	0.0708 ± 0.0019	0.0703 ± 0.0019
S3	217 ± 1.7991	216 ± 1.7340	216 ± 1.6046	0.0685 ± 0.0036	0.0696 ± 0.0035	0.0711 ± 0.0033	0.0697 ± 0.0035
S4	225 ± 3.0820	227 ± 3.5519	227 ± 2.8720	0.0529 ± 0.0061	0.0487 ± 0.0070	0.0496 ± 0.0056	0.0504 ± 0.0062
S5	216 ± 1.1427	216 ± 1.1427	216 ± 1.1427	0.0705 ± 0.0023	0.0705 ± 0.0023	0.0705 ± 0.0023	0.0705 ± 0.0023
S6	215 ± 1.0417	215 ± 2.4542	215 ± 1.3113	0.0727 ± 0.0021	0.0717 ± 0.0050	0.0723 ± 0.0027	0.0722 ± 0.0033
S7	223 ± 1.4794	224 ± 2.2733	225 ± 2.8816	0.0556 ± 0.0029	0.0545 ± 0.0045	0.0530 ± 0.0056	0.0544 ± 0.0044
S8	223 ± 3.1220	224 ± 1.8144	224 ± 1.8144	0.0559 ± 0.0062	0.0543 ± 0.0035	0.0543 ± 0.0035	0.0549 ± 0.0044
A1	196 ± 1.3730	199 ± 1.2972	199 ± 1.3730	0.1118 ± 0.0031	0.1055 ± 0.0029	0.1053 ± 0.0030	0.1076 ± 0.0030
A2	211 ± 1.7682	213 ± 1.4794	208 ± 0.8193	0.0812 ± 0.0037	0.0755 ± 0.0031	0.0870 ± 0.0017	0.0813 ± 0.0028
A3	209 ± 0.6215	212 ± 0.7849	209 ± 3.6928	0.0855 ± 0.0013	0.0784 ± 0.0016	0.0850 ± 0.0076	0.0830 ± 0.0036
A4	219 ± 1.2243	222 ± 1.0417	211 ± 1.7207	0.0635 ± 0.0025	0.0576 ± 0.0021	0.0811 ± 0.0036	0.0674 ± 0.0027
A5	204 ± 0.7303	207 ± 0.4498	206 ± 0.6433	0.0955 ± 0.0016	0.0887 ± 0.0010	0.0910 ± 0.0014	0.0917 ± 0.0013
A6	207 ± 0.6915	210 ± 0.6288	206 ± 0.7849	0.0887 ± 0.0015	0.0817 ± 0.0013	0.0908 ± 0.0017	0.0871 ± 0.0015
A7	229 ± 0.6288	234 ± 0.5252	231 ± 0.6065	0.0459 ± 0.0012	0.0356 ± 0.0010	0.0406 ± 0.0012	0.0407 ± 0.0011
A8	212 ± 1.0807	217 ± 0.9965	204 ± 0.8023	0.0784 ± 0.0023	0.0680 ± 0.0020	0.0945 ± 0.0017	0.0803 ± 0.0020
A9	200 ± 1.8889	204 ± 1.2794	197 ± 2.4011	0.1048 ± 0.0042	0.0955 ± 0.0028	0.1113 ± 0.0054	0.1039 ± 0.0041
A10	223 ± 0.8996	224 ± 0.8996	211 ± 3.1397	0.0574 ± 0.0018	0.0537 ± 0.0018	0.0811 ± 0.0067	0.0641 ± 0.0033
A11	214 ± 1.3493	220 ± 0.8137	218 ± 1.3322	0.0748 ± 0.0028	0.0616 ± 0.0016	0.0654 ± 0.0027	0.0673 ± 0.0024
A12	217 ± 0.6288	222 ± 1.2576	213 ± 0.8841	0.0681 ± 0.0013	0.0590 ± 0.0025	0.0771 ± 0.0018	0.0681 ± 0.0019
EA1	207 ± 0.7611	207 ± 1.2015	180 ± 0.4983	0.0884 ± 0.0016	0.0887 ± 0.0026	0.1486 ± 0.0012	0.1086 ± 0.0018
EA2	206 ± 0.7240	210 ± 0.8193	191 ± 0.8683	0.0918 ± 0.0016	0.0836 ± 0.0017	0.1236 ± 0.0020	0.0997 ± 0.0018
EA3	221 ± 0.9248	224 ± 0.7303	208 ± 0.8469	0.0600 ± 0.0019	0.0537 ± 0.0014	0.0872 ± 0.0018	0.0670 ± 0.0086
EA4	215 ± 1.0283	220 ± 0.5509	209 ± 0.8137	0.0731 ± 0.0021	0.0628 ± 0.0011	0.0855 ± 0.0017	0.0738 ± 0.0016
EA5	211 ± 1.2576	206 ± 1.1059	169 ± 0.9685	0.0807 ± 0.0026	0.0912 ± 0.0024	0.1780 ± 0.0025	0.1166 ± 0.0025

It is possible to establish a relationship between the absorbance and the sample’s content of each image provided by the Electronic Eye. According to the RGB model, an image’s absorbance was calculated about each color component’s average. As shown in Table 2, the average and standard deviation of each color intensity component were obtained together with their related absorbance from different tequila samples’ images.

The Silver tequila sample’s absorbance is 0.0644 ± 0.0034 , while for Aged and Extra-aged tequila samples, the average absorbance is 0.0785 ± 0.0024 and 0.0931 ± 0.0019 , respectively. The variability presented in the samples can be attributed to the characteristics of each brand’s product, as well as to their particular aging process. Thus, the lowest absorbance values in Silver tequila are associated with its colorless and pure tone.

Depending on the tequila aging process, the tone can be yellowish for Aged tequilas or amber for Extra-aged tequilas. In this manner, while the intensity in the tequila tone increases, the absorbance values also increase.

Related to the RGB components’ intensity, Silver tequila samples showed a prevalence of the three components. However, the Aged tequila samples predominate the red and blue components, whereas the blue component is more present and has the greatest intensity in the Extra-aged tequila samples. These differences have been associated with shades

present in samples, despite being the same type of tequila, and these differences depend on the brand.

It is possible to observe that the similarity among obtained measurements for each tequila sample within the same class is minimal since the deviations are in the order of 0.0001–0.0005, demonstrating repeatability in the operativity of the designed EE.

To visualize the behavior of the RGB absorbances of the different tequila samples, radar plots were constructed. Figure 4 shows the RGB average absorbance of the complete set of tequilas grouped in each of the three categories under study. Here it is possible to observe some characteristic fingerprints for each type of tequila related to their optical properties. This evident pattern for each tequila class (i.e., Silver, Aged, and Extra-aged) will help interpret this information by the planned classifier models. The idea behind a pattern recognition process is to recognize the regularities present in data by a computational model that uses machine learning algorithms.

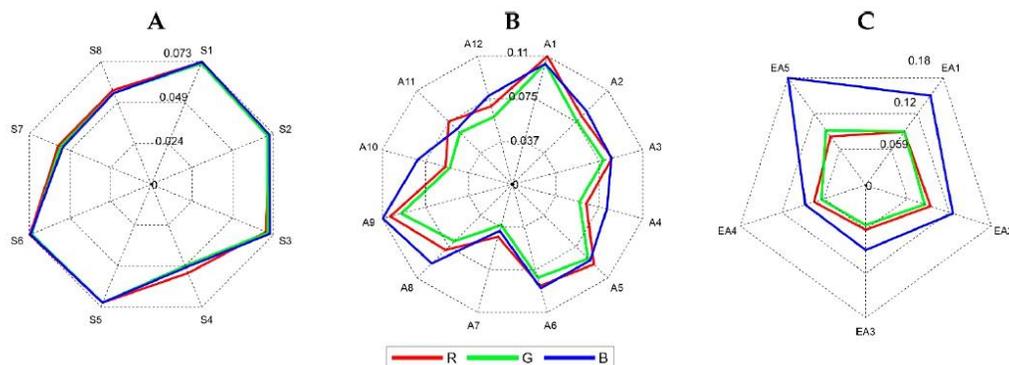


Figure 4. Radar plots for analyzed tequila samples with their respective absorbance values. (A) Silver, (B) Aged, and (C) Extra-aged.

3.2. EE Preliminary Recognition Model

Before modeling, RGB average absorbances were normalized to an interval of 0 to 1 to reduce illumination effects and for data treatment convenience. Afterward, a PCA analysis was done to build a preliminary recognition model, expecting to observe some sample clustering caused by the own absorbances and tequila class-related. The PCA plot with the three significant PCs is shown in Figure 5. Here the accumulated explained variance was ca. 99.96% with characteristic clusters that partially discriminate the different tequila kinds. That is, most of the Silver tequilas seem to be grouped in the upper right region of the plot, while the Aged tequilas are concentrated in the center, and the Extra-aged ones appear grouped in the left region. However, apart from the marked dispersion of these last two categories of tequilas, there is a clear overlap between some of their samples.

Although the aging mechanisms have been widely studied for different alcoholic beverages such as wine and spirits [51,52], there is still no scientific report that addresses it for tequila. Thus, considering that one of the physicochemical characteristics that are impacted during this process is the color, it is then possible to assume that the absorbances obtained with the electronic eye are also related to the aging of the analyzed tequila samples.

In this sense, the clustering regions observed in the PCA make sense when identifying that samples were grouped within the proper class. On the other hand, each cluster has a relationship with a different aging period. As a result, the dispersion present in the Aged and Extra-aged tequila cluster is clearly related to the aging times that each producer stipulates for their product. On the contrary, in the Silver tequilas cluster, the dispersion is minimal because these tequila samples do not have an aging process.

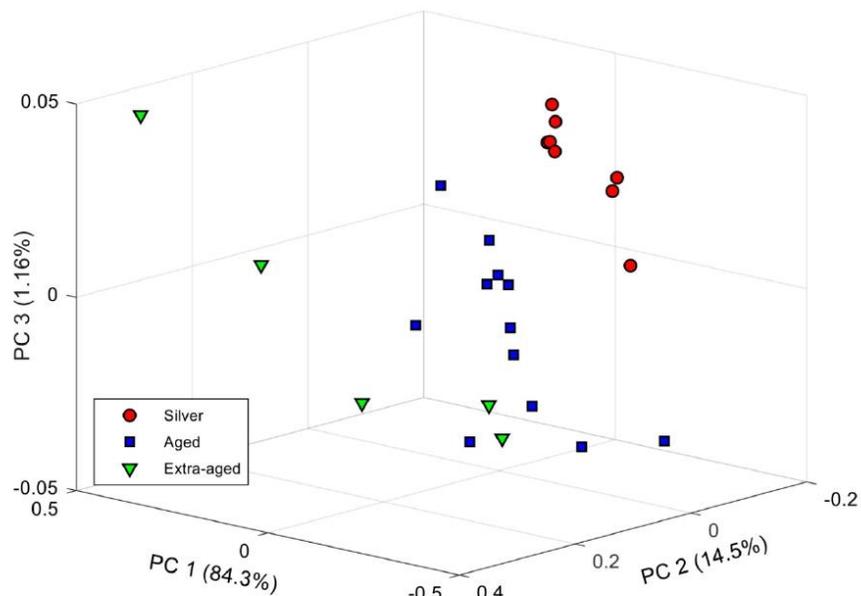


Figure 5. PCA score plot of the three first components obtained after analysis of tequila samples. As can be seen, some clustering is obtained according to different tequila classes.

Thus, it is highly probable that there are tequilas with different aging times within the set of tequila samples analyzed despite belonging to the same category. This may be because each tequila producer must comply with Mexican regulations to respect the minimum aging time. However, they can also establish longer aging periods without violating the standard's provisions to offer a product with better organoleptic characteristics than their competitors.

For this reason, to confirm these initial identifications seen by PCA, the next step was the use of LDA as a supervised pattern recognition method.

3.3. Tequila Categories Discrimination

Transformed data obtained by PCA were used as input information to perform LDA. Since this is a supervised method, classification success was evaluated using LOOCV. In this scheme, each sample is classified by means of the analysis function derived from the remaining samples (all cases except the case itself). This process was repeated as many times as the number of samples in the data set (i.e., 25 times), leaving out one different sample each time, considering it as a validation sample. With this approach, all samples are used once for validation. As can be observed in Figure 6, clear discrimination between the three categories of tequila was achieved. The clusters in the figure evidence that tequila samples are grouped according to their associated aged process. Although Silver tequilas are clearly grouped on the left region of the plot, the Aged and Extra-aged tequilas have class centroids located in the middle and right regions.

for its calculation involves analyzing the differences between the reference data and the incoming data determined by the main diagonal of the confusion matrix, see definition (3).

$$\kappa = \frac{N \sum_{i=1}^n m_{i,i} - \sum_{i=1}^n (G_i C_i)}{N^2 - \sum_{i=1}^n (G_i C_i)} \quad (3)$$

where i is the class number, N is the total number of classified values compared to truth values, $m_{i,i}$ is the number of values belonging to the truth class i that have also been classified as class i (i.e., values found along the main diagonal of the confusion matrix), C_i is the total number of predicted values belonging to class i , and G_i is the total number of truth values belonging to class i .

Thus, kappa is an indicator that acquires values between 0 and 1, the first representing the absolute lack of agreement and the second, total agreement. According to their scheme, a value <0 indicates no agreement, 0–0.20 as slight, 0.21–0.40 as fair, 0.41–0.60 as moderate, 0.61–0.80 as substantial, and 0.81–1 as almost perfect agreement.

In this regard, kappa values were calculated for each of the 25 LDA models built considering the LOOCV process, obtaining an overall mean kappa coefficient of 0.87, which is defined as “perfect agreement”. This finding indicates that this high agreement is related to reliable data. In other words, the RGB absorbances used to identify the tequila samples are representative enough to be modeled. Likewise, although the tequila classes are imbalanced, the LDA models do not privilege the Aged tequila class with the greatest number of samples over the Extra-aged tequila class with the least number of samples.

Additionally, from the obtained results, it is possible to confirm that even using a LOOCV does not produce an over-optimistic approach in the LDA classifiers performance.

4. Discussion

The results presented in Section 3 have provided some insight into the developed electronic eye’s capabilities to authenticate the three categories of tequila: Silver (S), Aged (A), and Extra-aged (EA). First, from the preliminary recognition model using PCA, it is important to highlight the close relationship between tequilas’ aging time and their clustering from the RGB absorbance analysis. This same aging effect in tequilas has been observed using more complex analytical methods such as HPLC [8]. This method is responsible for identifying and quantifying low molecular weight phenolic compounds acquired by tequila during the oak barrels’ maturing process. Once characterized, they are related to the mentioned age classifications using analysis of variance (ANOVA) combined with discriminant analysis.

Other works instead deal the authentication of tequila recurring to methods of analysis as GC-MS [34], and UV-Vis [35] coupling some chemometric methods commonly based on LDA, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), Multilayer Perceptron Artificial Neuronal Networks (MLP-ANN), and Support Vector Machines (SVM) to name a few. However, although these contributions differ from our study in factors such as the nature of analytical data obtained and the number of tequila samples analyzed, they represent the most recent state-of-the-art in identifying certified tequilas’ three main categories of interest. Added to this, they report performance parameters like sensitivity and specificity of the classifier models they used, which allows direct comparisons with our results. In this way, Table 4 summarizes these parameters’ comparison, including the analytical methods, classification models, and kinds of tequila reported by each research group.

Table 4. Comparison of the current study with representative publications dealing with tequila identification (S = Silver, A = Aged and EA = Extra-aged tequilas).

Reference	Analytical Method	Classification Model	Tequila Category	Sensitivity	Specificity
Ceballos-Magaña et al. [34]	GC-MS	LDA	S	0.66	0.75
			A	0.33	0.92
			EA	0.66	0.73
		MLP-ANN	S	1.00	1.00
			A	0.83	1.00
			EA	1.00	0.93
Pérez-Caballero et al. [35]	UV-Vis	PLS-DA	S	0.81	0.89
			A	0.71	0.88
			EA	1.00	0.93
		SVM	S	1.00	1.00
			A	1.00	0.99
			EA	0.96	1.00
This work	Electronic Eye	PCA-LDA	S	1.00	1.00
			A	0.92	0.92
			EA	0.78	0.95

In this way, it is clear that the model adopted in our study using PCA-LDA achieved superior performance in the individualized identification of classes (sensitivity for S = 1.00, A = 0.92, EA = 0.78 and specificity for S = 1.00, A = 0.92, EA = 0.95) than the LDA model (sensitivity for S = 0.66, A = 0.33, EA = 0.66 and specificity for S = 0.75, A = 0.92, EA = 0.73) reported by Ceballos-Magaña et al. [34], and the PLS-DA (sensitivity for S = 0.81, A = 0.71, EA = 1.00 and specificity for S = 0.89, A = 0.88, EA = 0.93) described by Pérez-Caballero et al. [35]. These results are remarkable because, in our study, a linear model was enough to identify tequilas from their RGB absorbances. In contrast, the authors mentioned above needed the use of models with non-linear strategies (e.g., MLP-ANN and SVM) that demand a high computational cost when performing their optimization process to tackle the classification problem properly.

On the other hand, if we compare the results obtained from the non-linear modeling of the PCA-LDA model described in the present work, the overall performance is competitive for the Silver and Aged tequila classes and limited for the Extra-aged class. Finally, the differentiation between non-aged tequilas and those with different maturity levels is closely related to the task of identifying mixed, fake, and adulterated tequilas. Taking into account that adulterations in tequila are also associated with practices such as dilution, the addition of alcohol or some prohibited substances, forbidden aging methods, or blending with lower quality tequila batches, these adulterations are closely related to changes in the UV-vis absorbance and, therefore, in samples' color [36,39]. Further work will attempt to include these kinds of samples applying the reported image processing procedure in order to find color variations (from RGB absorbances) to identify counterfeit tequilas.

5. Conclusions

An electronic eye based on lab-made instrumentation coupled with an image processing stage was developed to build a biologically inspired system capable of distinguishing between different tequila kinds, namely Silver, Aged, and Extra-aged. The system's repeatability was demonstrated by statistical analysis of the captured images using RGB information. Preliminary analysis employing PCA was relevant to observe data behavior and tequila class clustering mainly related to the aging process. LDA classifiers were built to recognize tequilas through the evaluated RGB absorbances using a LOOCV scheme to identify samples correctly.

Successful discrimination between tequilas was achieved by LDA, obtaining an overall classification rate of 90.02% for the three involved tequila classes mainly associated with

their aging process. In the same way, the obtained sensitivity averaged was 0.90, whereas specificity was 0.96. Considering that the analyzed tequila samples are grouped in imbalanced classes, the kappa coefficient was calculated to corroborate that the performance measures were not over-optimistic. In this way, the kappa coefficient mean value was 0.87, which implies that models interpret reliable data without privileging any tequila class after adjustment.

These results show that the developed image analysis strategy based on obtained RGB information of compressed *jpeg* images, together with the PCA-LDA modeling stage, did not hamper the identification of tequilas by retaining enough color information of analyzed samples. Another notable point is that the method presented here agrees with the results reported by some previous studies that employ conventional analytical techniques such as UV-Vis and GC-MS combined with non-linear classification methods. In this sense, the developed electronic eye constitutes a reliable and easy-to-use tool that allows a quick and non-destructive analysis of tequilas to authenticate them according to the three main categories. Lastly, further research may be conducted to identifying fake or mixed tequilas applying the currently reported methodology based on color analysis.

Author Contributions: Conceptualization: J.M.G.; methodology and formal analysis: A.G.; validation: A.G. and D.B.; investigation: all authors; writing—original draft preparation, A.G.; writing—review and editing: D.B. and J.M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Authors would like to express their gratitude to the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT) for the financial support and fellowship for Anais Gómez.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. Available online: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5282165&fecha=13/12/2012 (accessed on 21 February 2021).
2. Electronic Code of Federal Regulations Title 27, 5.22(g). Available online: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?node=pt27.1.5&rgn=div5> (accessed on 21 February 2021).
3. Council of the European Union. Agreement between the European Community and the United Mexican States on the Mutual Recognition and Protection of Designations for Spirit Drinks. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A21997A0611%2801%29> (accessed on 21 February 2021).
4. Consejo Regulador del Tequila. Available online: <https://www.crt.org.mx/index.php/en/pages-2/proteccion-del-tequila-a-nivel-internacional> (accessed on 21 February 2021).
5. Barbosa-García, O.; Ramos-Ortiz, G.; Maldonado, J.L.; Pichardo-Molina, J.L.; Meneses-Nava, M.A.; Landgrave, J.E.A.; Cervantes-Martínez, J. UV-vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2007**, *66*, 129–134. [CrossRef]
6. Frausto-Reyes, C.; Medina-Gutiérrez, C.; Sato-Berrú, R.; Sahagún, L.R. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61*, 2657–2662. [CrossRef]
7. De León-Rodríguez, A.; Escalante-Minakata, P.; Jiménez-García, M.I.; Ordoñez-Acevedo, L.G.; Flores, J.L.F.; Barba De La Rosa, A.P. Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, *46*, 448–455.
8. Muñoz-Muñoz, A.C.; Grenier, A.C.; Gutiérrez-Pulido, H.; Cervantes-Martínez, J. Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1213*, 218–223. [CrossRef] [PubMed]
9. Martínez-López, G.; Luna-Moreno, D.; Monzón-Hernández, D.; Valdivia-Hernández, R. Optical method to differentiate tequilas based on angular modulation surface plasmon resonance. *Opt. Lasers Eng.* **2011**, *49*, 675–679. [CrossRef]

10. Oliveira, P.R.; Lamy-Mendes, A.C.; Rezende, E.I.P.; Mangrich, A.S.; Marcolino Junior, L.H.; Bergamini, M.F. Electrochemical determination of copper ions in spirit drinks using carbon paste electrode modified with biochar. *Food Chem.* **2015**, *171*, 426–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kiani, S.; Minaei, S.; Ghasemi-Varnamkhasti, M. Fusion of artificial senses as a robust approach to food quality assessment. *J. Food Eng.* **2016**, *171*, 230–239. [[CrossRef](#)]
12. Tan, J.; Xu, J. Applications of electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue) in food quality-related properties determination: A review. *Artif. Intell. Agric.* **2020**, *4*, 104–115. [[CrossRef](#)]
13. Orlandi, G.; Calvini, R.; Pigani, L.; Foca, G.; Vasile Simone, G.; Antonelli, A.; Ulrici, A. Electronic eye for the prediction of parameters related to grape ripening. *Talanta* **2018**, *186*, 381–388. [[CrossRef](#)]
14. Xu, C. Electronic eye for food sensory evaluation. In *Evaluation Technologies for Food Quality*; Zhong, J., Wang, X., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2019; pp. 37–59.
15. Wu, D.; Sun, D.W. Food colour measurement using computer vision. In *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality*; Kilcast, D., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2013; pp. 165–195.
16. Wu, D.; Sun, D.-W. Colour measurements by computer vision for food quality control—A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *29*, 5–20. [[CrossRef](#)]
17. Gomes, J.F.S.; Leta, F.R. Applications of computer vision techniques in the agriculture and food industry: A review. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 989–1000. [[CrossRef](#)]
18. Ware, C. Color. In *Information Visualization*, 4th ed.; Ware, C., Ed.; Morgan Kaufmann: Burlington, MA, USA, 2021; pp. 95–141.
19. Jerram, P.; Stefanov, K. CMOS and CCD image sensors for space applications. In *High Performance Silicon Imaging*, 2nd ed.; Durini, D., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2020; pp. 255–287.
20. Patel, K.K.; Kar, A.; Jha, S.N.; Khan, M.A. Machine vision system: A tool for quality inspection of food and agricultural products. *J. Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 123–141. [[CrossRef](#)]
21. Fernández-Vázquez, R.; Stinco, C.M.; Meléndez-Martínez, A.J.; Heredia, F.J.; Vicario, I.M. Visual and instrumental evaluation of orange juice color: A consumers' preference study. *J. Sens. Stud.* **2011**, *26*, 436–444. [[CrossRef](#)]
22. Buratti, S.; Benedetti, S.; Giovanelli, G. Application of electronic senses to characterize espresso coffees brewed with different thermal profiles. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 511–520. [[CrossRef](#)]
23. Apetrei, C.; Apetrei, I.M.; Villanueva, S.; de Saja, J.A.; Gutierrez-Rosales, F.; Rodriguez-Mendez, M.L. Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *663*, 91–97. [[CrossRef](#)]
24. Figueroa, A.; Caballero-Villalobos, J.; Angón, E.; Arias, R.; Garzón, A.; Perea, J.M. Using multivariate analysis to explore the relationships between color, composition, hygienic quality, and coagulation of milk from Manchega sheep. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 4951–4957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shafiee, S.; Minaei, S.; Moghaddam-Charkari, N.; Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Barzegar, M. Potential application of machine vision to honey characterization. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *30*, 174–177. [[CrossRef](#)]
26. Abildgaard, O.H.A.; Kamran, F.; Dahl, A.B.; Skytte, J.L.; Nielsen, F.D.; Thomsen, C.L.; Andersen, P.E.; Larsen, R.; Frisvad, J.R. Non-Invasive Assessment of Dairy Products Using Spatially Resolved Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2015**, *69*, 1096–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Martín, M.L.G.-M.; Ji, W.; Luo, R.; Hutchings, J.; Heredia, F.J. Measuring colour appearance of red wines. *Food Qual. Prefer.* **2007**, *18*, 862–871. [[CrossRef](#)]
28. Ouyang, Q.; Zhao, J.; Chen, Q. Instrumental intelligent test of food sensory quality as mimic of human panel test combining multiple cross-perception sensors and data fusion. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *841*, 68–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Benedetti, L.P.d.S.; dos Santos, V.B.; Silva, T.A.; Filho, E.B.; Martins, V.L.; Fatibello-Filho, O. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4138–4144. [[CrossRef](#)]
30. Villanueva-Rodríguez, S.J.; Rodríguez-Garay, B.; Prado-Ramírez, R.; Gschaedler, A. Tequila: Raw Material, Classification, Process, and Quality Parameters. In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2016; pp. 283–289.
31. Prado-Ramírez, R.; Gonzáles-Alvarez, V.; Pelayo-Ortiz, C.; Casillas, N.; Estarrón, M.; Gómez-Hernández, H.E. The role of distillation on the quality of tequila. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2005**, *40*, 701–708. [[CrossRef](#)]
32. Martín-del-Campo, S.T.; López-Ramírez, J.E.; Estarrón-Espinosa, M. Evolution of volatile compounds during the maturation process of silver tequila in new French oak barrels. *LWT* **2019**, *115*, 108386. [[CrossRef](#)]
33. López-Ramírez, J.E.; Martín-del-Campo, S.T.; Escalona-Buendía, H.; García-Fajardo, J.A.; Estarrón-Espinosa, M. Physicochemical quality of tequila during barrel maturation. A preliminary study. *Cyta-J. Food* **2013**, *11*, 223–233. [[CrossRef](#)]
34. Ceballos-Magaña, S.G.; de Pablos, F.; Jurado, J.M.; Martín, M.J.; Alcázar, Á.; Muñiz-Valencia, R.; Gonzalo-Lumbreras, R.; Izquierdo-Hornillos, R. Characterisation of tequila according to their major volatile composition using multilayer perceptron neural networks. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1309–1315. [[CrossRef](#)]
35. Pérez-Caballero, G.; Andrade, J.M.; Olmos, P.; Molina, Y.; Jiménez, I.; Durán, J.J.; Fernandez-Lozano, C.; Miguel-Cruz, F. Authentication of tequilas using pattern recognition and supervised classification. *Trac Trends Anal. Chem.* **2017**, *94*, 117–129. [[CrossRef](#)]

36. Contreras, U.; Barbosa-García, O.; Pichardo-Molina, J.L.; Ramos-Ortiz, G.; Maldonado, J.L.; Meneses-Nava, M.A.; Ornelas-Soto, N.E.; López-de-Alba, P.L. Screening method for identification of adulterate and fake tequilas by using UV-VIS spectroscopy and chemometrics. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2356–2362. [[CrossRef](#)]
37. Wyszecki, G.; Stiles, W. *Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000; p. 968.
38. Foca, G.; Masino, F.; Antonelli, A.; Ulrici, A. Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 238–245. [[CrossRef](#)]
39. Herrero-Latorre, C.; Barciela-García, J.; García-Martín, S.; Peña-Crecente, R.M. Detection and quantification of adulterations in aged wine using RGB digital images combined with multivariate chemometric techniques. *Food Chem. X* **2019**, *3*, 100046. [[CrossRef](#)]
40. Mutlu, A.Y.; Kılıç, V.; Özdemir, G.K.; Bayram, A.; Horzum, N.; Solmaz, M.E. Smartphone-based colorimetric detection via machine learning. *Analyst* **2017**, *142*, 2434–2441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pennebaker, W.B.; Mitchell, J.L. *JPEG: Still Image Data Compression Standard*; Kluwer Academic Publishers: Drive Norwell, MA, USA, 1993; p. 638.
42. Tkalcic, M.; Tasic, J.F. Colour spaces: Perceptual, historical and applicational background. In Proceedings of the IEEE Region 8 EUROCON 2003. Computer as a Tool, Ljubljana, Slovenia, 22–24 September 2003; pp. 304–308.
43. Burger, W.; Burge, M.J. Color Images. In *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction Using Java*; Gries, D., Schneider, F.B., Eds.; Springer London: London, UK, 2016; pp. 291–328.
44. Burger, W.; Burge, M.J. Histograms and Image Statistics. In *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction Using Java*; Gries, D., Schneider, F.B., Eds.; Springer London: London, UK, 2016; pp. 37–56.
45. Oldham, K.B.; Parnis, J.M. Shining light on Beer's law. *ChemTexts* **2017**, *3*, 5. [[CrossRef](#)]
46. Corke, P. Light and Color. In *Robotics, Vision and Control: Fundamental Algorithms In MATLAB*, 2nd ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 287–318.
47. Jolliffe, I.T.; Cadima, J. Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374*, 20150202. [[CrossRef](#)]
48. Mitteroecker, P.; Bookstein, F. Linear Discrimination, Ordination, and the Visualization of Selection Gradients in Modern Morphometrics. *Evol. Biol.* **2011**, *38*, 100–114. [[CrossRef](#)]
49. Swets, D.L.; Weng, J.J. Using discriminant eigenfeatures for image retrieval. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **1996**, *18*, 831–836. [[CrossRef](#)]
50. Belhumeur, P.N.; Hespanha, J.P.; Kriegman, D.J. Eigenfaces vs. Fisherfaces: Recognition using class specific linear projection. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **1997**, *19*, 711–720. [[CrossRef](#)]
51. Carpena, M.; Pereira, A.G.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Wine aging technology: Fundamental role of wood barrels. *Foods* **2020**, *9*, 1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Delgado-González, M.J.; García-Moreno, M.V.; Sánchez-Guillén, M.M.; García-Barroso, C.; Guillén-Sánchez, D.A. Colour evolution kinetics study of spirits in their ageing process in wood casks. *Food Control* **2021**, *119*. [[CrossRef](#)]
53. Shariffar, A.; Sarmadian, F.; Malone, B.P.; Minasny, B. Addressing the issue of digital mapping of soil classes with imbalanced class observations. *Geoderma* **2019**, *350*, 84–92. [[CrossRef](#)]
54. Congalton, R.G. A review of assessing the accuracy of classifications of remotely sensed data. *Remote Sens. Environ.* **1991**, *37*, 35–46. [[CrossRef](#)]

Capítulo de libro

Optical methods using smart-phone platforms for mycotoxin detection

3

Diana Bueno^a, Anaís Gómez^b, RB Dominguez^c, JM Gutiérrez^b, Jean Louis Marty^d

^aBioprocess Department, UPIBI-IPN, Mexico City, Mexico

^bBioelectronics Section, Department of Electrical Engineering, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

^cCONACyT- CIMAV S.C., Chihuahua, CHIH, Mexico

^dIMAGES group, Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, France

3.1 Introduction

Mycotoxins are toxic compounds produced naturally by some types of molds. Mycotoxin-producing molds grow on many foodstuffs, such as maize, sorghum, soybeans, groundnuts, cereals, and other food and feed crops under natural conditions. They are present on a wide range of substrates under a wide range of environmental conditions (especially in warm and humid environments). Its spread can take place before or after harvest, during storage, or in the food itself. Most mycotoxins are chemically stable and persist after food processing [1–3].

Plenty of mycotoxins have been identified, but the major concerns for human health and livestock focus on ochratoxin A, aflatoxins, fumonisins, patulin, zearalenone and nivalenol/deoxynivalenol. Most mycotoxins are presented in the food chain because of mold infection of crops, either before or after harvest. Exposure to mycotoxins can occur directly from eating infected food or indirectly from animals fed with contaminated food [4].

Mycotoxins can be the cause of various diseases and poisonings due to the different chemical structures that differentiate them from each other. Acute mycotoxin poisoning occurs when the ingested product presents a high dose of these substances, so this condition is frequent in less developed countries, where the resources for its control are limited. On the other hand, the effects or chronic diseases are worrisome for the population's health in the long term and are perhaps more important because they occur in much lower doses. Mycotoxins' most common effects are carcinogenic, genotoxic, or can affect the kidney, liver, or immune system.

Both national and international organizations are permanently evaluating the risk that mycotoxins pose to humans. For some mycotoxins, these studies have led to the establishment of maximum legal limits. Many countries today have maximum legal limits on aflatoxins that are the most toxic and frequent; although these limits are not uniform, the limits are mandatory in the regulation in food or feed. Thus, regardless

of the world's region, mycotoxin analysis is necessary during any production process that includes raw materials that could be contaminated.

Also, there must be an adequate material handling program that avoids contamination of both the inputs and the final product that will reach the consumer. Within this program, it is relevant to have reliable chemical analysis methods. Therefore, mycotoxins' analysis becomes very important since any action taken during food production will depend on the laboratory results. The determination of mycotoxins is not simple since they are heterogeneously distributed in the raw material. Briefly, the analysis consists of three stages: (1) sampling in the batch, (2) sample homogenization and pre-treatment, and (3) quantifying mycotoxins.

The principal analytical methods for the quantification of mycotoxins include chromatographic techniques like liquid chromatography (LC), thin-layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC). However, its use requires sophisticated instrumentation and highly qualified personnel for its operation, and time-consuming analyzes. In the last two decades, several immunochemical methods have been developed for mycotoxin detection taking advantage of the highly specific and sensitive reaction between an antigen and an antibody. The methods present advantages such as the speed of analysis, simplified operation, and considerable reduction in instrumentation requirements.

Unfortunately, although their benefits are many, they have a strong susceptibility to respond to interfering elements that cause false positives that require confirmations using a reference method [5]. Commercial immunochemical methods can be classified by those that use an immunoaffinity column and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. Although the immunoaffinity column method was initially developed for fluorometry quantification of compounds from biological samples, columns have been used to purify and concentrate mycotoxins for subsequent detection by high performance liquid chromatography (HPLC), GC, and TLC. In counterpart, ELISA methods are commonly for rapid monitoring.

However, the developing of accurate, simple, and cost-effective techniques for mycotoxin analysis is of major concern. Optical biosensors coupled with knowledge areas such as optics, electronics, fluidics, and biochemistry, have become a powerful screening and analysis tool for the rapid estimation of mycotoxin contamination in raw materials. Optical biosensors are based on the measurement of an optical phenomenon (e.g., light absorption, fluorescence, surface plasmon resonance (SPR), or other optical properties) upon the biorecognition event to detect and identify the target molecules.

Therefore, optical detection is desirable as it can be applied to multiplexed applications. Considering that optics instrumentation is easily miniaturized at a relatively low cost, it gets systems with low power consumption and high stability, as cheap and sophisticated light sources and detection devices have become available recently [6]. In this sense, the development of optical systems applied to analytical chemistry using smartphones has increased considerably in recent years [7]. Smartphones are powerful storage, data processing, and interconnectivity tools which can be used to build low-cost and real-time analytic systems.

Their infrastructure offers robust hardware and software platforms for chemical and biochemical measurements that often demand sophisticated laboratory instruments.

Several authors have investigated detection methods with smartphones using them directly and/or coupling small instruments designed to operate with various principles whose interaction with the device's camera allows analyte detection and quantification tasks [8].

In this trend, commonly smartphones, built-in cameras are used as spectrometers that employ the spectral information of collimated light that is scattering after interaction with samples. Alternatively, smartphones as colorimeters can be used to quantify the color concentration in solid samples such as paper-based and liquid samples such as colored solutions. The computational cost required for image analysis is directly associated with the quality of the captured image. Thus, the digital image processing proposal range from the use of specialized software (available in the cloud or a desktop) to analyze content and after communicating the result to the user via Wi-Fi or Bluetooth, or the complete integration of a programmed application through some algorithms associated within the hardware/software platform of the smartphone itself.

There is a growing need for low-cost technologies, portable and rapid devices with the potential to detect, monitor, or quantify analytes, compounds, solutions, or analytical development, focusing this chapter on the detection of mycotoxins in food, without the need for expensive equipment or trained personal.

A powerful tool for environmental and food sectors, medical diagnosis, bioassay or bioanalysis, or an alternative to spectrophotometric measurements is smartphones' use due to their several advantages and their greater use in everyday life. According to Statista, the current number of mobile phone users in 2020 is 4.78 billion, indicating that 61.67 percent of people worldwide are cell phone owners. Global smartphone users increased by 40 percent between 2016 and 2020. By 2025, 1.74 billion new users will come online.

Smartphones are considered an ideal platform for colorimetric or spectrophotometric measurements due to their low cost, portability, and image quality. The colorimetric methods have grown considerably in allowing direct observation of any variation.

3.2 Mycotoxins

Mycotoxins are naturally occurring toxins produced as secondary metabolites of diverse fungi, with *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., and *Penicillium* spp., as the most common. Mycotoxins grow on various foodstuffs under different conditions, producing diverse toxic effects against organisms. There are between 300 and 400 types of mycotoxins. Some factors like age, nutrition, and exposure length can affect the susceptibility of animals and humans. According to information of the Food and Agriculture Organization (FAO), around 25 percent of crops are contaminated by mycotoxins causing a high economic loss and human health damage [9]. The chemical structure of the most prevalent mycotoxins is represented in Fig. 3.1.

Aflatoxins (AF) are one of the most potent toxic substances produced as secondary metabolites of *Aspergillus* species and are liable for around 25 percent of animal

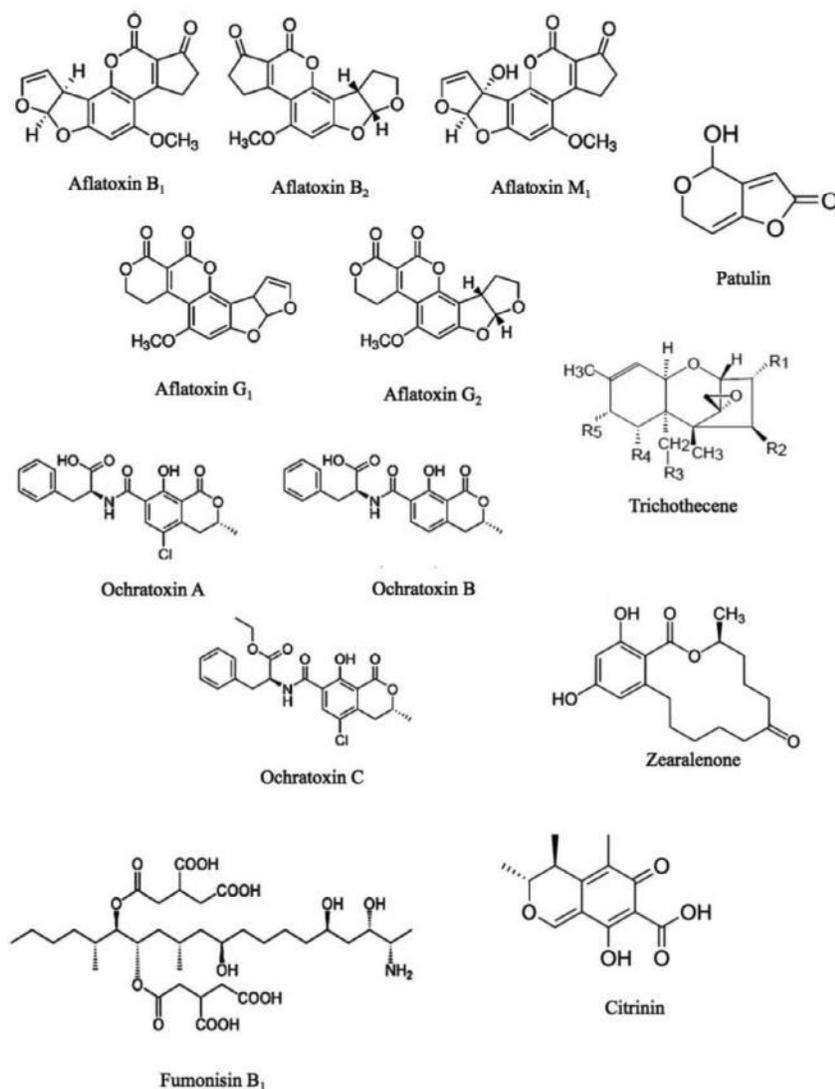


Fig. 3.1 Chemical structure for the main mycotoxins.

mortality. AF B₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂ are the most significant aflatoxins in foods and feeds. AFB₁ and AFB₂ are presented mainly in contaminated milk-based products.

Ochratoxins are the most dangerous mycotoxins found in food and beverages; Ochratoxin A (OTA) is the most common mycotoxin and can be found in cereals, dried fruits, coffee, cocoa, spices, wheat, barley, rice, oats, rye, beans, soy, peas, or

Table 3.1 The classification of mycotoxins and physiological effects.

Mycotoxins	Effects on mammals	Group (IARC)
Aflatoxins	carcinogenic, acute hepatitis, impaired immune system	1, 2B
Ochratoxins	carcinogenic, hepatotoxic, nephrotoxic, teratogenic	2B
Patulin	lung and brain hemorrhaging	3
Fumonisin	carcinogenic, hepatotoxic, causative agent in leukoencephalomalacia in horses	2B
Zearalenone	estrogenic activity	3
Trichothecenes	immunodepressants, gastrointestinal hemorrhaging	3
Citrinin	nephrotoxic	3

peanuts. Patulin (PAT) is a mycotoxin produced by fungi commonly found in vegetables and fruits, mainly in apples.

Fumonisin (FB) are water-soluble polar compounds. Found in grains, such as wheat, corn, barley, oat, rice, or sorghum, and in derived products (flour, grits, whole grain, extract, bran). Zearalenone (ZEN), Fumonisin B1 and Trichothecenes (deoxynivalenol (DON) and T-2 toxin [T-2]) are among the most toxic Fusarium mycotoxins. Zearalenone is a mycotoxin that produces estrogenic effects. Trichothecenes, unlike other mycotoxins, can act directly through the skin.

Citrinin (CIT) was one of the earliest antibiotics, but it was never used because of its mammalian toxicity. Citrinin can be co-occurring with ochratoxin A in grains and coconut products. CIT and PAT can infect apples with rotten spots. The most common ways of exposure to mycotoxins are consumption of contaminated foods, direct skin contact and inhalation [6].

Mycotoxins are potent toxins and cause serious damage to animals and humans. Table 3.1 shows the classification of the main mycotoxins, their physiological effects on mammals, and the classification of the International Agency for Research on Cancer (IARC).

3.3 Colorimetric detection

Colorimetric detection is the simplest approach to detection, quantification with a smartphone, based on digital images. This method is based on assessing the change in absorbance or reflectance of an analyte. The main tests are summarized in Table 3.2.

Chemical imaging exploits the spectroscopic techniques that provide information about the composition, structure, dynamics, and pixel concept, which is used as the measurement unit for the light emitted by an analyzed sample. The differences in the light suggest the presence of a given structure or substance, and these differences can be identified or quantified through the color models.

The model color Red-Green-Blue (RGB) is widely used for colorimetric quantification due to its simplicity. The color is decomposed and quantified in a specific range

Table 3.2 Description of the main tests [10].

Principle	Description
Brightfield test	The sample is illuminated, and the light is transmitted through the sample.
Colorimetric test	Measure concentrations of a compound in a solution with the aid of a color reagent.
Fluorescence test	It is the absorbance at a wavelength to be emitted at a different wavelength.
Electrochemical test	An electric current generates a chemical reaction.

of wavelengths related to the presence of reddish, greenish, and blueish regions of the visible light spectrum [11]. RGB model can be associated with color changes. Images described by RGB is considered a 3D arrays composed of three 2D planes, which belong to the red, green, and blue channel. Fig. 3.2 shows a 3D image as a blend of its three-color components, and it can be decomposed by the RGB model in three 2D planes separate. In the figure, the RGB color space is represented as a cube with axes R, G, and B; the black color is positioned in the cube's origin (0,0,0), meaning the absence of colors. However, the white color is placed in the opposite corner (1,1,1), corresponding to the maximum value of all three colors [12].

A sensor is a device that transforms information about a chemical or physical property of the system into a signal that can be registered by a device. The interactions of the sample with the medium and the sensor leading to a change in optical properties that can be registered. A biosensor is an analytical tool that measures biological reactions and generates signals proportional to the analyte concentration. Three main components conform to these:

1. a recognition element (receptor)
2. a signal transducer to get a measurable signal
3. a reader that register the output

Colorimetric sensors are based on measuring the intensity of color after a chemical reaction, and the concentration of an analyte could be determined using the absorption of the colored compound, that can be detected by the naked eye within visible (400–800nm) range or can be identified and quantified by instrumentation [13].

Fluorescence is the molecules' property to absorb light at a wavelength and emit light at a different wavelength; after the samples are excited, fluorescence can be distinguished as a signal. Some works described the fluorescence in mycotoxins as the absorbed radiation in the ultraviolet region, and emitted in the visible region and can be detected by a smartphone, employing the pixel information's quantification image processing. In the aflatoxins, letter B indicates blue fluorescence (blue), and the letter G indicates yellow-green fluorescence (green) to ultraviolet light. OTA under acidic conditions generates blue or green fluorescence (465 nm). The main mycotoxins present fluorescence.

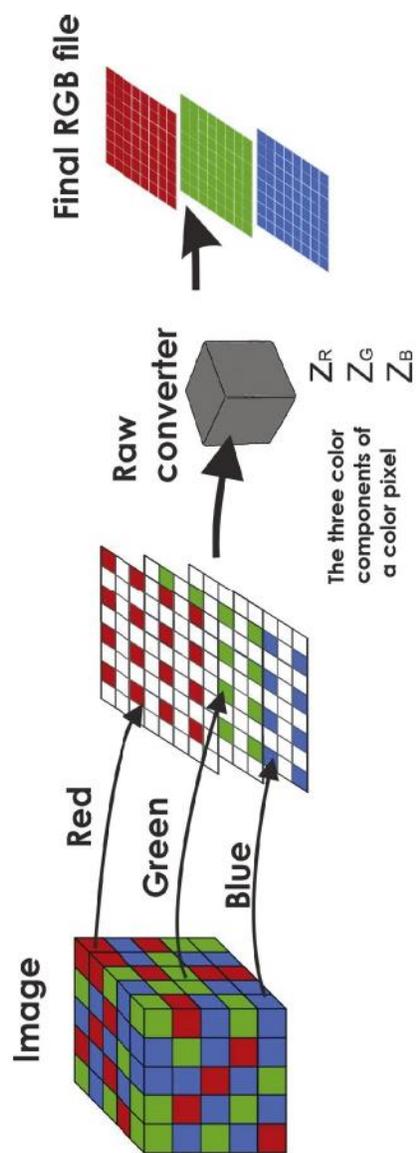


Fig. 3.2 Schematic of the implementation of the RGB color model.

3.4 Smartphone as a portable detection

The IBM Simon was the first smartphone in history, manufactured in 1992 and distributed in the US between August 1994 and February 1995. However, the technological leap in these devices occurred when Apple CEO Steve Jobs introduced the iPhone in June 2007. The first iPhone was a rectangular device, with a touch screen, without a physical keyboard or mouse, with an Internet connection and a camera. The key to its success, according to experts, was the combination of hardware and software in an effortless device to use.

Since then, both users and competitors have guessed the potential of the new smartphone. Today, most mobile phones integrate enough technology like a computer. They include not only a microprocessor with communication capabilities but also processing speed and storage. Besides, they have high-resolution digital cameras, autofocus and digital zoom, and an independent power source. Everything is managed by specialized software in which users can include applications to carry out many tasks with different purposes.

According to the World Advertising Research Center, 72.6 percent of all internet users will be accessing websites through a smartphone [14,15]. In Table 3.3, the countries are shown according to the highest number of cell phone users. Android or iOS is the operating system for smartphones.

Smartphone's level of electronic sophistication has allowed them to be viable alternatives for developing new instrumental systems. Based on the fact that a very high percentage of its integrated infrastructure can be used to reproduce most of the steps of an analytical measurement process, allowing real-time processing of data as well as transmission of the collected results (with clear advantages for *in-situ* studies due to its portability). Smartphones have been successful in applications that require diagnostic, detection, monitoring, and quantification tasks. In this way, it is possible to find scientific contributions reporting their use in environmental studies, chemical and biochemical analysis, food industry, medical and health sciences. Some of these contributions are represented in Table 3.4.

Table 3.3 Cell Phone Usage Worldwide, by Country.

Country	Smartphone users (Millions of persons)	Smartphone penetration (percent)
China	851	59.9
India	346	25.3
United States	260	79.1
Brazil	96.9	45.6
Russian Federation	95.4	66.3
Indonesia	83.9	31.1
Japan	72.6	57.2
Germany	65.9	79.9
Mexico	65.6	49.5
United Kingdom	55.5	82.9
France	50.7	77.5

Table 3.4 Smartphones as spectrometer or colorimeter for diverse applications.

Reference	Analyte	Smartphone as		LOD (limit of detection)	Detection medium
		Spectrometer or Colorimeter	Detector or Instrument		
[11]	Tuberculosis Nitrite concentration and pH pH Lead ions Phenazopyridine ELISA with microfluidic device Blood ketone Dye adsorption for field deploy- able environmental and wastewa- ter management	Colorimeter Colorimeter Colorimeter Colorimeter Colorimeter Colorimeter Colorimeter Spectrometer	Detector Instrument Detector Detector Detector Detector Instrument Instrument	– 0.04 units of pH; 0.52 mg L ⁻¹ nitrite – 20.0 ng mL ⁻¹ 1.0 µg L ⁻¹ 0.89 ng ml ⁻¹ 0 to 4 mmol/L 0.1 to 10 ppm	Microplate/imagen Image Image Image Image Image Test strip Cuvette
[17] [7]	Chlorophyll, hemoglobin Vitamin D Salivary glucose Blood hematocrit Thyroid stimulating hormone Cholesterol in blood Heavy metals	Spectrometer Colorimeter Colorimeter Spectrometer Spectrometer Spectrometer Colorimetric	Instrument Detector Detector Instrument Instrument Instrument Detector	– 15 nM 22.2 mg/dL 0.1 percent of hematocrit 0.31 mIU/L 140 mg dl ⁻¹ to 400 mg dl ⁻¹ Cu(II) =0.29 ppm Ni(II) =0.33 ppm Cd(II) =0.19 ppm Cr(VI) =0.35 ppm 10 ² CFU mL ⁻¹ ≤1ppm 3.5 ppb 10 bacterial cells per milliliter 50 mgL ⁻¹	Image Test strip Test strip Image Strip Strip Strip
	Salmonella Amines Mercury contamination in water Bacteria in field water Trinitrotoluene in soil	Spectrometer Colorimeter Colorimetric Colorimeter	Instrument Detector Instrument Instrument Detector		Strip Image Image Well Image

3.4.1 Recommend hardware requirements

The evolution of smartphones' hardware is related to the miniaturization of the electronic components that make it up and improve the production/manufacturing process. Although the trend in the design of smartphones seems to focus on double, triple, and even quadruple the core of the central process unit (CPU) that integrates it, most user's applications available perform properly using two processing cores.

However, an important point to consider in the design of optical instrumentation based on these devices, far from the processing capacity, is the integration of an independent graphics processing unit (GPU) since it is responsible for efficiently displaying the graphics of the user interface, 2D and 3D effects, video playback in HD Ready (720p) or full HD (1080p) and the reproduction of advanced 2D and 3D graphics in animations.

In this way, while the GPU processes the graphics tasks, the CPU can dedicate to performing other types of calculations associated with data management/storage and the control/operation of the rest of the sensors included in the device (fingerprint reader, proximity sensor, capacitive sensors, accelerometer, gyroscope, GPS).

Another relevant element is related to the high-resolution camera. Thus, it is pertinent to consider the quality of the captured images, focal lens length, the performance under different lighting intensities (aperture), photoreceptor sensor size and type, ISO sensitivity, image stabilizer, and finally but significant the location of the phone camera.

Features such as digital zoom or increased resolution (in megapixels) are not indicative of camera quality. The number of pixels that current phone cameras use to produce an image is sufficient for most applications. Nevertheless, not all devices have powerful enough processors to perform image processing.

In this sense, it is mandatory to remember that the camera has been designed to capture images, and the inclusion of one or more of the mentioned characteristics can help quantify the intensity of the color more real.

The most relevant characteristics are the quantification of color intensity, the capacity of real-time processing of data, and the transmission of the results for storage. Due to the Beer-Lambert law, smartphone cameras can differentiate small differences in color, which can relate the concentration of analyte in solution to the intensity of its color by absorbance or transmittance [12].

The previous features enable smartphone to be used as an extremely useful analytical tool for diagnosis. The digital colorimetric determination can be performed computing the RGB components of the digital image. Fig. 3.3 shows a smartphone-based optical device for spectroscopic techniques, with a light source (external or integrated into the smartphone), a wavelength device, and the signal or image obtained directly or employing Wi-Fi (Wireless Fidelity) or Bluetooth.

3.4.2 Smartphone applications in food analysis

World Health Organization (WHO) have related food and waterborne diseases to the ingestion of harmful pathogens or toxic chemicals [5]. Some causative agents in

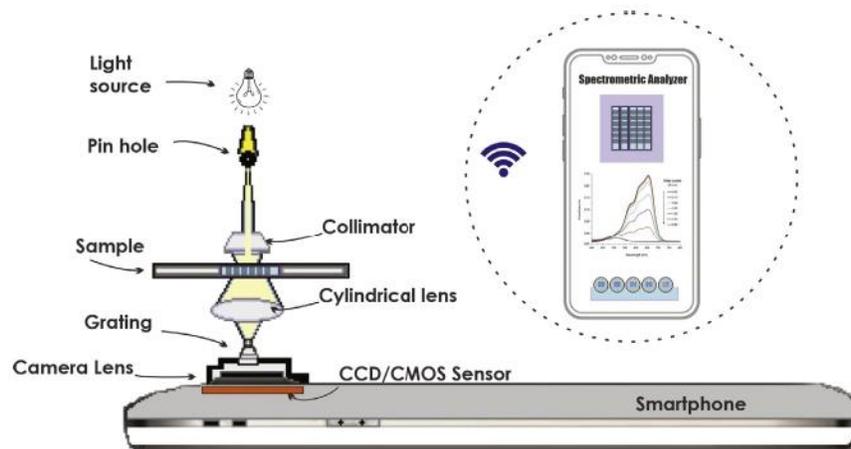


Fig. 3.3 Smartphones to be an optical device tool for analysis and diagnosis in chemistry applications.

food poisoning include proteinaceous infectious particles (prions), organic pollutants, heavy metals, bacterial agents, or natural toxins as mycotoxins.

Smartphones as detectors or instruments based on spectrometer and colorimeter have had high acceptance in point-of-care analyzes, chemical and biological sensing, electrochemical sensing, immunoassays, also in sectors such as medicine, food, environmental and agriculture, due to their relatively low cost, portability, easy to use interface and the compatibility with systems for acquisition and processing of data. Another advantage of smartphones is the versatility of samples that can be analyzed and sensors that can be employed. Also, smartphones provide a tool for imaging analysis or processing [18].

Several advances have been reported that use the smartphone to identify contaminants that cause food poisoning have been reported. Most of these methods use the smartphone camera for colorimetric detection, including quantification of the target analyte by transmittance, absorbance, or reflectance. Some examples of the smartphone-based monitoring of food safety are presented in Table 3.5 [19].

Some applications of the use of a smartphone to detect mycotoxins in food are mentioned here below.

Machado et al., proposed a lab-on-a-chip systems based on capillarity for fluidic manipulation, and employing a smartphone camera to analyze OTA, AFB1, and DON simultaneously. The portable and simple multiplexed assay achieved good sensitivities; less than 40 ng/mL for OTA, less than 0.1–0.2 ng/mL for AFB1 and 10 ng/mL for DON [21].

Smartphone as a detector in lateral flow immunoassays (LFIA) for multiplex mycotoxins was presented by Liu et al. For that purpose, to detect AFB1, ZEN, DON, T-2 toxin, and fumonisin B1 was used gold nanoparticles (GNPs) and time-resolved fluorescence microspheres with LFIA, achieving quantify low limits of detection.

Table 3.5 Use of smartphone for monitoring food safety.

Device	Principle	Sample	Target	LOD or linear range	
Smartphone	ELISA	Cookies	Allergen	~1 ppm	
		Milk	Salmonella enteritidis	94.2–101.2 CFU/mL	
		Cheese			
	Biochemical principle using enzymes	Water	(L)-glutamate		0.028 mmol/L
		Spice mixtures and bouillon			
	Chromatography	Milk	Tetracycline		0.5 mg/mL
		Milk	Alkaline phosphatase		0.1 U/L
			Tetracycline Quinolones		0.2 – 2.3 ng/mL 0.15e3.6 ng/mL
	Chemical reaction	Water	Cr (VI)		2.5 ppm
			Total chlorine		1.5 ppm
			Caffeine		100 ppm
		River water	E. coli K12		10 CFU/mL
Mercury ion				80 nM	
Fruits		Calcium carbide		–	
		Isobutylamine		~1 ppm	
		Isopentylamine			
Minced meat		Triethylamine			
		Bisphenol		4.4 µM	
Water	Formaldehyde		0.2–2.5 ppm		
	Fluoride		0– mg/L		
	pH		1–12		
Fat-free milk		E. coli O157:H7	10 CFU/mL		

Absorbance	Vitamin C	Ascorbic acid	5 mg/mL
	Mineral water	Oxygen, pH	7.8–8.8 mg/L O ₂ ; 7.1–7.5 pH
	Rainwater		3.7–4.7 mg/L O ₂ ; 5.8–6.2 pH
	Pure water		6.6–7.6 mg/L O ₂ ; 6.6–7.0 pH
	Lake water		3.1–4.1 mg/L O ₂ ; 7.2–7.6 pH
	Tap water	Mercury ions	5 ppb
Lateral Flow aptamer assay		Ochratoxin A	3 ng/mL
	–	Salmonella ATCC 50,761	85 CFU/mL
PIBA assay aggregation		E. coli O157:H7	YES/NO
		Salmonella enterica	YES/NO
Mie scattering	Ground beef	E. coli K12	10 CFU/mL
Simultaneous reaction and electrokinetic stacking	Water	Copper ion	30 mM

The recoveries of both LFIA ranged from 84 to 110 percent, and the results were validated by LC-tandem mass spectrometry. [22].

A multiplex LFIA-GNPs was developed based on the identification of a single test line color. Antibodies were linked to red and blue GNPs to be evaluated for two different analytes, in which the mixture of two antigens formed the test line. Therefore, the test line assumed different colors depending on the analyte or quantity of analyte presented in the sample. The contaminant was identified based on the label's color; the strip images were acquired by a smartphone camera for obtaining RGB intensities, allowing a semi-quantitative estimation of AFB1 and FMs in wheat and derivate products [23].

A device based on a smartphone integrated with an immunochromatography platform was developed to detect and quantify ZEN in cereals and feed. The system quantified ZEN with LOD of 0.08 and 0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in cereals and feed, respectively [24]. Various applications in the chemistry of digital colorimetric determination using a smartphone have widespread the use of smartphones to the smartphone camera and the software with the design and incorporation of apps.

Li et al. developed an integrated, smartphone-app-chip (SPAC) system for on-site quantitation of aflatoxins in spiked and moldy corn samples. The detection was based on an indirect competitive immunoassay and directly processed using a custom-developed Android app. The results obtained were comparable with conventional enzyme-linked immunosorbent assay kits. [25].

Table 3.6 summarized the last five years where the smartphone was employed to detect mycotoxins in food, the table details the sample detected, as well as the type of smartphone used and its application in detection.

3.5 Conclusions

We can conclude that the use of smartphones had extended beyond a spectrophotometer or colorimeter, as mentioned in the detailed publications in this paper, or the design of an app. Some publications already detail the use of smartphones to develop a complete device or as rapid kits analysis such as sperm testing system, quick sandwich ELISA for human C-reactive protein, to measure the amount of free hemoglobin in plasma analyze the color of dipsticks used for urinalysis.

Barragan et al. obtained a promising device by coupling a small potentiostat to an electronic micropipette [36], Hutchison et al. have developed a bright field smartphone microscope in conjunction with a microfluidic incubation device to detect *Bacillus anthracis* [37] or Ji and co-workers reported a smartphone-based cyclic voltammetry system for the electrochemical detection has great potential in public health, water, and food quality monitoring [38].

Smartphones are an excellent platform for running several applications due to the facility and low cost to integrate elements into a sensing system. It provides numerous applications in health, food, microfluidic systems, electrochemical, spectrophotometric, fluorescence systems or to develop an app or built portable device.

Table 3.6 Smartphone as a detector on mycotoxins in food.

Role of smart-phone	Analyte	Detection	LOD	Working range	Sample	Smartphone	Ref.
<i>Fully integrated analytical system</i>	AFB1	LFIA	5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5–1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	maize	Samsung Galaxy S2	[26]
	AFB1	Colorimetric PDMS- μFC	3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.5–250	corn	Huawei Honor 3C	[25]
	ZEN	Colorimetric ELISA kit	2.12 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.13–50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	corn	Huawei Honor 6	[27]
	AFB1	Fluorescence	1 ng	1–200 ng	corn	NA	[28]
	OTA						
	ZEN						
	ZEN						
	OTA, AFB1	Fluorescence	0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 0.18 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	0–3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Cereals feed corn, flour	Huawei Maimag 6 NA NA	[24] [29]
	OTA	LFIA Fluorescence	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	NA	NA	NA	[30]
	AFB1	MIP Fluorescence	20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	20–100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	maize	Meizu U 10	[31]
	AFB1	LFIA	0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0–0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	maize	Maintag 6 Huawei	[22]
	ZEN		0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0–5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	wheat		
	DON		0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0–20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	bran		
T-2		0.32 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0–1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$				
FB1		0.59 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0–10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$				

(continued)

Table 3.6 (Cont'd)

Role of smartphone	Analyte	Detection	LOD	Working range	Sample	Smartphone	Ref.
<i>Image Reader</i>	OTA	Fluorescence	$2 \mu\text{g L}^{-1}$	$2\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$	wine, beer	Iphone 4S	[32]
	OTA	Colorimetric P- μFC	40 ng mL^{-1}	$10\text{--}100 \text{ ng mL}^{-1}$	Corn	Samsung Galaxy grand prime	[21]
	AFB1		$0.1\text{--}0.2 \text{ ng mL}^{-1}$	$0.1\text{--}1 \text{ ng mL}^{-1}$			
	DON		10 ng mL^{-1}	$10\text{--}100 \text{ ng mL}^{-1}$			
	AFB1	ECL	0.01 ng mL^{-1}	$5\text{--}150 \text{ ng mL}^{-1}$	Milk	NA	[33]
	AFM1	LFIA Colorimetric	0.016 ng mL^{-1}	$0\text{--}1 \text{ ng mL}^{-1}$	Milk	NA	[34]
	AFB1	LFIA colorimetric	0.5 ng mL^{-1}	$0\text{--}10 \text{ ng mL}^{-1}$	wheat, pasta,	Huawei P9 Lite	[23]
	Type B fumonisin		20 ng mL^{-1}	$0\text{--}500 \text{ ng mL}^{-1}$	pastry		
	AFB1	LFIA	0.3 ng g^{-1}	$2\text{--}16 \text{ ng mL}^{-1}$	peanut bread	NA	[35]
					corn		
				rice			

LFA: Lateral flow assay
MIP: Molecularly Imprinted Polymers
ECL: Electrochemiluminescence
 μFC : Microfluidic chip
P- μFC : parallel microfluidic chip.

Significant advances have been made incorporating smartphones for detecting mycotoxins in food, mainly with colorimetric detection. Also, the smartphone's use allows timely detection of the mycotoxin in food or feed, reduction in the number of samples required, and it is not necessarily trained personal. Also, smartphone use allows the detection limits indicated by the regulatory organisms for each mycotoxin or food to be obtained in a compact system with a daily use device.

References

- [1] Kharayat, B.S. and Y. Singh, Chapter 13 - Mycotoxins in foods: mycotoxicoses, detection, and management, in *Microbial Contamination and Food Degradation*, in: A.M. Holban and A.M. Grumezescu (Eds.), Academic Press, 2018 p. 395-421.
- [2] M. Weidenbömer, *Mycotoxins in Foodstuffs*, Springer-Verlag, New York, XIV, 2008, p. 504.
- [3] (FAO/WHO), *Codex International Food Standards*, WHO, 2018.
- [4] International Programme on Chemical, S. and O. World Health, *Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot* /Published Under the Joint Sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization, World Health Organization, Geneva, 1990.
- [5] J. Singh, A. Mehta, Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: a review, *Food Sci. Nutr.* 8 (5) (2020) 2183–2204.
- [6] D. Bueno, et al., Determination of Mycotoxins in Food: a Review of Bioanalytical to Analytical Methods, *Appl. Spectrosc. Rev.* 50 (9) (2015) 728–774.
- [7] D. Bueno, J.L. Marty, R. Muñoz, Smartphone as a portable detector, analytical device or instrument interface. *Smartphones from an Applied Research Perspective*, 2017.
- [8] A. García, et al., Mobile phone platform as portable chemical analyzer, *Sens. Actuators B* 156 (1) (2011) 350–359.
- [9] D. Liu, et al., Recent progress on electrochemical biosensing of aflatoxins: a review, *TrAC, Trends Anal. Chem.* (2020) 115966.
- [10] J. Liu, et al., Point-of-care testing based on smartphone: the current state-of-the-art (2017–2018), *Biosens. Bioelectron.* 132 (2019) 17–37.
- [11] M. Rezazadeh, et al., The modern role of smartphones in analytical chemistry, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 118 (2019) 548–555.
- [12] D. Bueno, et al., Colorimetric analysis of ochratoxin a in beverage samples, *Sensors* 16 (11) (2016) 1888.
- [13] I.I. Ebralidze, et al., Chapter 1 - Colorimetric sensors and sensor arrays, in: O.V. Zenkina (Ed.), *Nanomaterials Design for Sensing Applications*, Elsevier, 2019, pp. 1–39.
- [14] Special reports. Digital 2019, *Global Internet Use Accelerates*, 2020. [cited 2020 27/07/2020]; Available from <https://wearesocial.com/blog/2019/01/digital-2019-global-internet-use-accelerates>.
- [15] A. Turner, *BankMyCell*, 2020. [cited 2020 27/07/2020]; Available from <https://www.bankmycell.com/blog/how-many-phones-are-in-the-world>.
- [16] G.K. Özdemir, et al., Smartphone-based detection of dyes in water for environmental sustainability, *Anal. Methods* 9 (4) (2017) 579–585.

- [17] J. Chen, et al., Experimental demonstration of remote and compact imaging spectrometer based on mobile devices, *Sensors (Switzerland)* 18 (7) (2018).
- [18] Volkan, K., H. Nesrin, and S. Mehmet Ertugrul, From Sophisticated Analysis to Colorimetric Determination: Smartphone Spectrometers and Colorimetry, in *Sophisticated Analysis to Colorimetric Determination: Smartphone Spectrometers and Colorimetry, Color Detection*, in: L.-W. Zeng and S.-L. Cao, (Eds.), 2020, IntechOpen.
- [19] D.D. Uyeh, et al., Chapter 11 - Food safety applications, in: J.-Y. Yoon (Ed.), *Smartphone Based Medical Diagnostics*, Academic Press, 2020, pp. 209–232.
- [20] J.M.D. Machado, et al., Multiplexed capillary microfluidic immunoassay with smartphone data acquisition for parallel mycotoxin detection, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 40–46.
- [21] Z. Liu, et al., A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals, *Biosens. Bioelectron.* (2020) 158.
- [22] F. Di Nardo, et al., Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single Test line, *Talanta* 192 (2019) 288–294.
- [23] X. Li, et al., A smartphone-based quantitative detection device integrated with latex microsphere immunochromatography for on-site detection of zearalenone in cereals and feed, *Sens. Actuators B* 290 (2019) 170–179.
- [24] X. Li, et al., Integrated smartphone-app-chip system for on-site parts-per-billion-level colorimetric quantitation of aflatoxins, *Anal. Chem.* 89 (17) (2017) 8908–8916.
- [25] S. Lee, G. Kim, J. Moon, Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin b1 by using a smartphone-based reading system, *Sensors (Switzerland)* 13 (4) (2013) 5109–5116.
- [26] Y. Chen, et al., A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (28) (2017) 6567–6574.
- [27] M. Yang, et al., A smartphone-based quantitative detection platform of mycotoxins based on multiple-color upconversion nanoparticles, *Nanoscale* 10 (33) (2018) 15865–15874.
- [28] W. Ji, et al., Shape coding microhydrogel for a real-time mycotoxin detection system based on smartphones, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (8) (2019) 8584–8590.
- [29] Y. Gong, et al., A portable and universal upconversion nanoparticle-based lateral flow assay platform for point-of-care testing, *Talanta* 201 (2019) 126–133.
- [30] T. Sergeyeva, et al., Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes, *Talanta* 201 (2019) 204–210.
- [31] D. Bueno, R. Muñoz, J.L. Marty, Fluorescence analyzer based on smartphone camera and wireless for detection of Ochratoxin A, *Sens. Actuators B* 232 (2016) 462–468.
- [32] S.M. Khoshfetrat, H. Bagheri, M.A. Mehrgardi, Visual electrochemiluminescence biosensing of aflatoxin M1 based on luminol-functionalized, silver nanoparticle-decorated graphene oxide, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018) 382–388.
- [33] M. Han, et al., An octuplex lateral flow immunoassay for rapid detection of antibiotic residues, aflatoxin M1 and melamine in milk, *Sens. Actuators B* 292 (2019) 94–104.
- [34] T. Sojinrin, et al., Developing gold nanoparticles-conjugated aflatoxin B1 antifungal strips, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (24) (2019).

- [17] J. Chen, et al., Experimental demonstration of remote and compact imaging spectrometer based on mobile devices, *Sensors (Switzerland)* 18 (7) (2018).
- [18] Volkan, K., H. Nesrin, and S. Mehmet Ertugrul, From Sophisticated Analysis to Colorimetric Determination: Smartphone Spectrometers and Colorimetry, in *Sophisticated Analysis to Colorimetric Determination: Smartphone Spectrometers and Colorimetry, Color Detection*, in: L.-W. Zeng and S.-L. Cao, (Eds.), 2020, IntechOpen.
- [19] D.D. Uyeh, et al., Chapter 11 - Food safety applications, in: J.-Y. Yoon (Ed.), *Smartphone Based Medical Diagnostics*, Academic Press, 2020, pp. 209–232.
- [20] J.M.D. Machado, et al., Multiplexed capillary microfluidic immunoassay with smartphone data acquisition for parallel mycotoxin detection, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 40–46.
- [21] Z. Liu, et al., A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals, *Biosens. Bioelectron.* (2020) 158.
- [22] F. Di Nardo, et al., Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single Test line, *Talanta* 192 (2019) 288–294.
- [23] X. Li, et al., A smartphone-based quantitative detection device integrated with latex microsphere immunochromatography for on-site detection of zearalenone in cereals and feed, *Sens. Actuators B* 290 (2019) 170–179.
- [24] X. Li, et al., Integrated smartphone-app-chip system for on-site parts-per-billion-level colorimetric quantitation of aflatoxins, *Anal. Chem.* 89 (17) (2017) 8908–8916.
- [25] S. Lee, G. Kim, J. Moon, Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin b1 by using a smartphone-based reading system, *Sensors (Switzerland)* 13 (4) (2013) 5109–5116.
- [26] Y. Chen, et al., A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (28) (2017) 6567–6574.
- [27] M. Yang, et al., A smartphone-based quantitative detection platform of mycotoxins based on multiple-color upconversion nanoparticles, *Nanoscale* 10 (33) (2018) 15865–15874.
- [28] W. Ji, et al., Shape coding microhydrogel for a real-time mycotoxin detection system based on smartphones, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (8) (2019) 8584–8590.
- [29] Y. Gong, et al., A portable and universal upconversion nanoparticle-based lateral flow assay platform for point-of-care testing, *Talanta* 201 (2019) 126–133.
- [30] T. Sergeeva, et al., Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes, *Talanta* 201 (2019) 204–210.
- [31] D. Bueno, R. Muñoz, J.L. Marty, Fluorescence analyzer based on smartphone camera and wireless for detection of Ochratoxin A, *Sens. Actuators B* 232 (2016) 462–468.
- [32] S.M. Khoshfetrat, H. Bagheri, M.A. Mehrgardi, Visual electrochemiluminescence biosensing of aflatoxin M1 based on luminol-functionalized, silver nanoparticle-decorated graphene oxide, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018) 382–388.
- [33] M. Han, et al., An octuplex lateral flow immunoassay for rapid detection of antibiotic residues, aflatoxin M1 and melamine in milk, *Sens. Actuators B* 292 (2019) 94–104.
- [34] T. Sojinrin, et al., Developing gold nanoparticles-conjugated aflatoxin B1 antifungal strips, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (24) (2019).

-
- [35] J.T.C. Barragan, L.T. Kubota, Minipotentiostat controlled by smartphone on a micropipette: a versatile, portable, agile and accurate tool for electroanalysis, *Electrochim. Acta* (2020) 341.
 - [36] J.R. Hutchison, et al., Reagent-free and portable detection of *Bacillus anthracis* spores using a microfluidic incubator and smartphone microscope, *Analyst* 140 (18) (2015) 6269–6276.
 - [37] D. Ji, et al., Smartphone-based cyclic voltammetry system with graphene modified screen printed electrodes for glucose detection, *Biosens. Bioelectron.* 98 (2017) 449–456.

Artículos en memorias de congreso a nivel nacional

CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA DE UN OJO ELECTRÓNICO (OE)

Anais Ivonne Gómez Rocha, Juan Manuel Gutiérrez Salgado

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
arochag@cinvestav.mx, mgutierrez@cinvestav.mx**RESUMEN**

El creciente interés de los productores de alimentos por evaluar la autenticidad, la calidad y la seguridad de los productos ha motivado el desarrollo de sistemas analíticos eficientes capaces de monitorear estas características en los productos finales. El uso de equipos analíticos ha alcanzado un nivel de sofisticación tal que permite la investigación de las propiedades de los alimentos. La separación cromatográfica, la espectrometría de masas (GC-MS) y espectrometría UV-VIS son técnicas comúnmente utilizadas, sin embargo, a pesar de la precisión y certeza que brindan, poseen desventajas relacionadas con los costosos detectores que emplean, el prolongado tiempo de análisis y la necesidad de instalaciones adecuadas; convirtiendo su uso a valoraciones exclusivas confinadas a un laboratorio especializado con nulas posibilidades de adaptación en aquellas aplicaciones donde se requiere un control de calidad en línea. Una nueva perspectiva de instrumentación analítica se sustenta en el uso de sistemas bioinspirados: Narices Electrónicas (NE), Lenguas Electrónicas (LE) y Ojos Electrónicos (OE) que basan su operación en la emulación de los sentidos humanos para determinar características de los alimentos. Un OE está diseñado para imitar la visión humana y analizar los atributos relacionados con el color y el aspecto de una muestra. Para su operación suele ser común, el empleo de técnicas de visión por computadora, técnicas colorimétricas y la espectrofotometría. Este trabajo describe el diseño de un sistema de espectrometría capaz de caracterizar muestras colorimétricas mediante la medición de absorbancia en la región visible de pequeños volúmenes de muestras líquidas. Para ello se toma en cuenta la técnica cromática integrada de diferentes módulos. El primer módulo consiste en una fuente de luz blanca, que en este caso corresponde a un flash diodo emisor de luz (LED). La luz producida por el LED pasa a través de una rejilla de difracción de 1800 líneas/mm y se descompone en sus diferentes longitudes de onda. La luz blanca del flash LED incide directamente para excitar a la muestra. Después está el módulo de captura de la imagen que opera mediante una cámara Raspberry Pi (RPI) V2. La imagen capturada es posteriormente acondicionada y es enviada al sistema de registro en la tarjeta RPI 3 modelo B+. El control del sistema del OE, la medición de las señales de absorbancia y análisis de las señales incidentes de la muestra, están gestionados por la Raspberry Pi. Se implementó el uso de calibradores de color elaborados con silicón con la intención de garantizar la trazabilidad de las mediciones realizadas. Considerando la necesidad de revisar de forma periódica la exactitud fotométrica del sistema, los calibradores construidos tienen las ventajas de no presentar variaciones asociadas a la variación de la temperatura y degradación del material a lo largo del tiempo. La instrumentación propuesta basada en la adquisición de las imágenes y los espectros obtenidos de ellas resultó útil para corroborar la funcionalidad de los calibradores. Esto representa la primera fase de caracterización del OE en muestras sólidas para después pasar a muestra líquidas, con resultados alentadores que permiten calibrarlo mediante patrones colorimétricos.

INTRODUCCIÓN

La protección de los derechos de los consumidores y la prevención de prácticas fraudulentas o engañosas, así como la adulteración de los alimentos son un desafío importante al que hace frente la industria alimentaria. Hoy en día, todo producto alimentario que sale al mercado debe ser sometido a un riguroso control de calidad que garantice su seguridad para poder ser comercializado. Para este fin, se vuelve indispensable cumplir no solo con estrictas normas de producción sino también con las legislaciones gubernamentales vigentes que los regulan.

El control de calidad en la industria de los alimentos permite limitar la cantidad de fallos que pueden cometerse durante el proceso de fabricación, la selección de materias primas, así como el almacenamiento y la transportación de productos finales. Esta cadena de calidad permite tomar medidas oportunas para disminuir o eliminar estas fallas en los productos que llegan al consumidor.

Uno de los primeros medios para evaluar la calidad de los productos alimentarios ha sido el empleo de los sentidos humanos. Aunque los sentidos de la vista, el oído, el gusto, el olfato y el tacto se usan a diario en todos los aspectos de nuestras vidas, sus aplicaciones analíticas [1] para evaluar las propiedades de los alimentos deben ser llevadas a cabo por un grupo entrenado de panelistas. Esta metodología es muy sencilla y permite obtener resultados rápidamente, sin embargo, se debe tener mucho cuidado con la entrega de muestras para evitar sesgos. Una nueva perspectiva de análisis se sustenta en el uso de instrumentación analítica basada en las llamadas tecnologías bioinspiradas. Los sistemas bioinspirados basan su operación en la emulación de los sentidos humanos para determinar de manera sensorial características de los alimentos. Los sistemas más comunes de estas tecnologías son las Narices Electrónicas (NE), las Lenguas Electrónicas (LE) y los Ojos Electrónicos (OE), que mediante diferentes formas de transducción (energía eléctrica, magnética, química, térmica o de radiación) transforman la información analítica presente en una muestra a una señal eléctrica que posteriormente es interpretada por una herramienta de procesamiento de datos [2-3], dejando de lado las opiniones subjetivas.

TEORÍA

Ojo Electrónico

Un Ojo electrónico (OE) está diseñado para imitar la visión humana y analizar los atributos relacionados con el color y el aspecto de una muestra. Suele ser común, el empleo de técnicas de visión por computadora, técnicas colorimétricas y recientemente la espectrofotometría [4]. De forma general, un ojo electrónico se compone de tres bloques principales: el primero se relaciona con la adquisición de la información analítica, el segundo con el procesamiento de la información adquirida y finalmente el tercer bloque está asociado con el análisis de imágenes obtenidas [5], como se puede ver en el diagrama a bloques de la Figura 1. La etapa de adquisición de imágenes consiste en capturar una imagen real y transformarla en una imagen digital utilizando dispositivos como cámaras, escáneres, videos, etc.

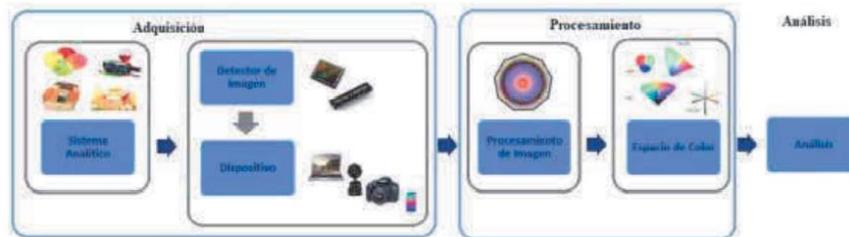


Figura 1. Estructura esquemática de un sistema de análisis de imagen.

Una imagen digital es una representación numérica capaz de procesarse computacionalmente [6]. Esta etapa de procesamiento tiene como objetivo mejorar la imagen adquirida y resaltar las características o regiones de interés, eliminando así las distorsiones y el ruido sin agregar más información a su contenido. En este contexto, existen una gran variedad de técnicas a partir de las cuales es posible analizar la imagen, dentro de las más empleadas se encuentra el uso de la escala de grises y la transformación de color, el umbral y el filtrado empleando espacios de color como lo son: "RGB" (siglas en inglés de *Red, Green, Blue*, en español rojo, verde y azul), "CIE LAB" (siglas en inglés International Commission on Illumination, donde L* es la luminosidad de un objeto que va desde un valor 0 a 100, A* representa la variación de verde a rojo, y B* representa la variación de azul a amarillo), "CIE XYZ" (Y es iluminancia, Z tendencia al azul y X es una mezcla de curvas ortogonales a la luminancia y no negativas) y "HSV" (siglas en inglés Hue, Saturation, Value, en español tonalidad, saturación y brillo). Después de esta etapa, la imagen está lista para la extracción de características donde se hace un análisis de la imagen para clasificarla en 4 categorías: morfológicas, cromáticas, texturales y estructurales [7-8].

Una clara ventaja del OE es su capacidad de analizar imágenes resaltando características no evidentes durante el análisis de muestras, pues es capaz de analizar el color, la forma, el tamaño y la textura de los alimentos de manera efectiva sin requerir fases de pretratamiento. Más importante aún, es una técnica confiable eficiente, no destructiva y de relativa simple operación [9]. Como método de detección es objetivo y rápido, demostrando ser una excelente herramienta en la evaluación de la calidad en las bebidas alcohólicas adulteradas, en el análisis de maduración de frutas, vegetales, granos, productos cárnicos, pescados y mariscos, vinos rojos, café, té, entre otros más [5].

Un sistema de OE basado en la técnica de espectrofotometría servirá para determinar agentes extraños que se puede encontrar en medios cromáticos. Donde la propiedad cromática del análisis de la imagen es parte esencial del desarrollo de este trabajo, debido a que describe el color o la composición espectral de la radiación emitida o reflejada por los objetos. Así mismo, la intensidad de los píxeles coadyuvará en el análisis de las diferentes bandas espectrales.

La calibración de los equipos es indispensable para realizar un adecuado control de calidad y se opta por usar calibradores de soporte, para obtener mediciones precisas. Si la calibración es correcta se puede conseguir una calibración exacta. Para asegurar la trazabilidad de las mediciones realizadas con un espectrómetro se calibra el instrumento mediante una serie de pruebas y cada prueba usa un patrón distinto. Estos patrones pueden ser de: óxido de holmio en ácido perclórico, sulfato de cobre en ácido sulfúrico, dicromato potásico en ácido sulfúrico y nitrito de sodio. Por lo cual se opta por usar patrones colorimétricos para obtener patrones de medida que servirán para poder identificar el color de la muestra y relacionarla con una muestra líquida alimentaria.

En general, los sistemas de medición como los espectrómetros y colorímetros se utilizan para evaluar una amplia gama de productos alimenticios, pero una de las características principales es que funcionan mejor para pinturas, tintas, bebidas homogéneas o extractos alimenticios que para productos alimenticios sólidos, debido que el problema clave que impide mediciones de color precisas y reproducibles es que la mayoría de los alimentos tienen superficies no uniformes y composición heterogénea, con profundos efectos en el reflexión, percepción de la luz y el color por lo cual es una de las ventajas que tiene el análisis de líquidos es evaluar el color manteniendo un ángulo de medición constante, para que la lectura del color sea uniforme.

PARTE EXPERIMENTAL

Diseño y construcción del Ojo Electrónico

El ojo electrónico diseñado en este trabajo opera bajo un sistema espectrofotométrico de UV-Vis tomando como base el espectro reportado en la literatura [10]. El diseño general del equipo se divide en diferentes etapas y el diagrama de bloques principal del dispositivo se muestra en la Figura 2.

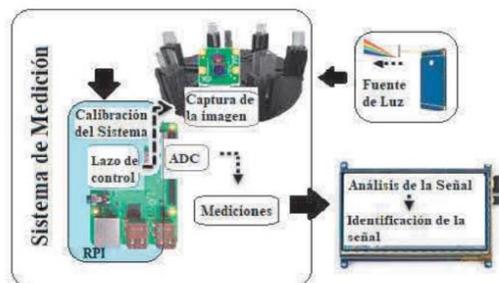


Figura 2. Distribución de los canales del sistema óptico (Flecha negra control electrónico y flecha punteada control interno).

Para la caracterización del ojo electrónico se toma en cuenta la técnica cromática que consta de diferentes módulos. El primero módulo consiste en una fuente de luz blanca, que en este caso corresponde a un diodo emisor de luz (LED) modelo 19239-1. La luz producida por el LED pasa a

través de una rejilla de difracción de 1800 líneas/mm y se descompone en sus diferentes longitudes de onda. La luz blanca del flash LED incide directamente para excitar a la muestra. Después está el módulo de captura de la imagen que basa su operación en una cámara Raspberry Pi V2 para posteriormente acondicionar la señal que es enviada al sistema de registro en la tarjeta Raspberry Pi (RPI) 3 modelo B+. El control del sistema del OE y análisis de las señales incidentes de las muestras, están gestionados por la Raspberry Pi y la medición de las señales de absorbancia se obtiene después de extraer las características cromáticas de cada una de las imágenes de las muestras.

Los materiales utilizados para la fabricación del instrumento tienen una alta resistencia química y aíslan apropiadamente de la luz externa del proceso de medida, con la finalidad de reducir interferencias ópticas que afecten al sistema óptico diseñado. El chasis del prototipo se diseñó para ser impreso en 3D utilizando filamento de impresión ABS (3Dpinlastic) color negro mate con un diámetro exterior de 1.75 mm. Para manipular las muestras por analizar, se utilizaron cubetas de plástico desechables de la marca BRAND, especiales para los análisis espectrofotométricos en la región UV-VIS con un volumen de llenado de entre 1.5 ml a 3.0 ml y con dimensiones externas de 4.5 mm x 23 mm. Estos recipientes deben estar libres de polvo y suciedad para obtener resultados fiables de cualquier etapa experimental.

Recepción de Luz

El módulo de detección de luz está basado en una cámara V2 HD compatible con Raspberry 3B+. Este módulo integra un sensor Sony IMX219 de 8 megapíxeles. Se conecta mediante un cable plano de 60 cm al puerto CSI (del inglés: Camera Serial Interface, o Interfaz de Cámara Serie) de la Raspberry Pi. La resolución útil es de 3238 x 2464 píxeles y una lente óptica de ¼ de pulgada. Las dimensiones de la cámara son: 25 mm x 23 mm x 9 mm.

Sistema mecánico

El prototipo desarrollado dispone de 6 canales; 5 de ellos se utilizan para colocar las celdas de caracterización de medios crómicos, realizando una comparativa de la medición de la muestra de referencia (blanco) y aquella en la que se determinarán los atributos colorimétricos.

El sistema mecánico consta de los siguientes componentes: un sistema giratorio de celdas basado en un engranaje planetario tomado de un motor para aplicaciones automotrices (A), un motor reductor de engranaje DC (12 Volt/1 A) para hacer el funcionamiento de giro (B), un control de velocidad que emplea el sensor L298P (C) junto con un codificador magnético de efecto hall SS466a (D) para el control de la posición; y finalmente la rejilla de difracción en reflexión seleccionada que cuenta con 1800 líneas por milímetro con dimensiones de 25 mm x 25 mm (E). La Figura 3 muestra los componentes descritos.



Figura 3. A. Sistema Planetario; B. Motor reductor; C. Sensor de Velocidad; D. Codificador Magnético; E. Rejilla de Difracción.

Preparación de las muestras colorimétricas

Se elaboraron un conjunto de muestras calibradoras para probar el dispositivo diseñado. Se utilizó una mezcla de dos compuestos de caucho de silicón RTV615A y RTV615B (Momentive Performance Materials). Este material permite hacer un encapsulado con la gama de colores del espectro visible al combinarse con tintas colorimétricas genéricas de la marca HP H8940 de colores rojo, azul y amarillo. En la tabla 1 se muestra una relación de los calibradores elaborados para el experimento.

No.	Calibrador	Etiqueta
1	Blanco	CB
2	Rojo	C1
3	Naranja claro	C2
4	Naranja	C3
5	Amarillo	C4
6	Verde claro	C5
7	Verde oscuro	C6
8	Verde	C7
9	Azul	C8
10	Morado	C9
11	Morado claro	C10

Tabla 1. Relación de calibradores colorimétricos.

Un total de 10 muestras patrón fueron analizadas, junto con una muestra de referencia (silicón sin tinta) actuando como blanco. En la Figura 4, se muestran las soluciones elaboradas contenidas dentro cubetas para análisis espectrofotométrico.

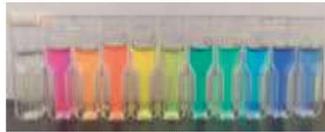


Figura 4. Conjunto de calibradores colorimétricos.

RESULTADOS

Procesamiento de imagen en la rejilla de difracción

Para la montura y sujeción de la rejilla de difracción y la cámara Raspberry Rev2 se realizaron diseños de ensamble en una impresora 3D, para posicionar adecuadamente el plano del patrón de difracción. La cámara es un sensor CMOS y está equipada con un dispositivo CCD (siglas en inglés Charge Coupled Device, en español dispositivo de carga acoplada), el cual no es más que un conjunto de píxeles ordenados en una matriz bidimensional. Cada uno de estos píxeles miden la intensidad de la luz que sobre ellos incide, la cual es una parte pequeña de la escena que enfoca la cámara. De esta forma la imagen continua se discretiza en una matriz de valores de intensidad. Cada píxel este cubierto con uno de tres tipos de filtros, rojo (R), verde (G) o azul (B), en un patrón conocido como mosaico de Bayer para producir imágenes a color. Por lo tanto, a cada píxel le corresponde tres valores de intensidad RGB.

El experimento se realizó de forma que la cámara Raspberry Pi V2 recoja la señal reflejada por la rejilla de difracción, al hacer incidir el haz de luz blanca que previamente fue centrada con respecto a la montura construida. La Figura 5 muestra la captura de la imagen de la rejilla.

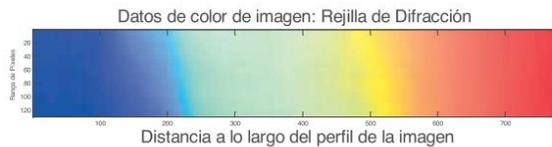


Figura 5. Captura de la imagen de la Rejilla de difracción.

Sensitividad espectral de la cámara Raspberry Pi V2

Empleando un algoritmo programado en la plataforma Matlab® 2014, es posible detectar el perfil de intensidad a lo largo de un segmento de línea de la imagen capturada por la cámara. Se extrajo una fila de píxeles de la región de mayor calidad de la imagen del sensor con el fin de graficar la intensidad plasmada en cada píxel en una escala de 0 a 255 (correspondiente a una imagen de 8 bits). En la Figura 6 se encuentran tres graficas separadas por las intensidades roja, verde y azul



Figura 6. Perfil de Intensidad de la Rejilla de difracción.

En la tabla 2 se aprecian las componentes del modelo RGB de cada uno de los patrones de silicón preparados con variaciones de color, los valores obtenidos del modelo corresponden a la sensibilidad para cada canal de color.

Muestra	R	G	B
CB	248	239	248
C1	220	168	242
C2	234	213	199
C3	234	179	168
C4	238	224	190
C5	236	231	214
C6	114	216	170
C7	197	221	199
C8	208	232	228
C9	186	191	219
C10	218	219	228

Tabla 2. Componentes RGB para cada calibrador.

En la Figura 7 se puede observar que para el calibrador CB, el cual proporciona una imagen blanca, los canales de color se encuentran muy próximos entre sí, principalmente el canal rojo y azul. Para el calibrador C1 el canal que predomina es el rojo lo cual también se observa en la imagen con esta misma tonalidad. Para la muestra de tonalidad verde los canales que predominan son el verde y el azul.

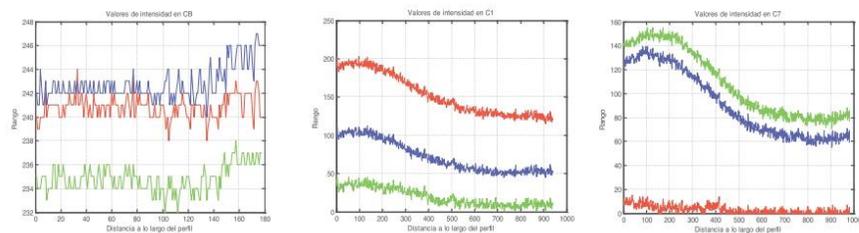


Figura 7. Perfil RGB de las muestras calibradoras: CB, C1, C7.

Perfil de Absorbancias de los calibradores colorimétricos en un espectrómetro comercial

Para esta parte del trabajo, se realizó un barrido espectral desde los 190 nm a los 1100 nm con un espectrómetro comercial UV-Visible Agilent Mod. 8453. Los valores de absorbancia medidos se muestran en la tabla 3. La figura 8 muestra el espectro de absorción de los calibradores colorimétricos construidos. Si se realiza un acercamiento a la imagen en el intervalo de 700 a 840 nm, es posible observar una separabilidad de los patrones diseñados, aquí se puede establecer que a una longitud de onda de $\lambda=740$ nm, se encuentra el máximo de absorbancias que permite identificar y caracterizar cada uno de los calibradores. La muestra de referencia CB se calibró a 0 nm

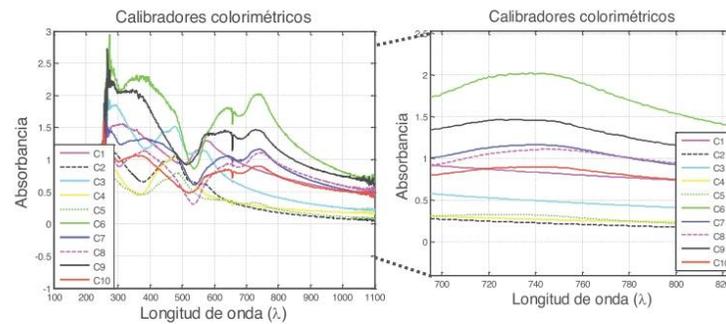


Figura 8. Mediciones de Absorbancias

Tonalidad	Etiqueta	Absorbancia _{Max}
Rojo	C1	0.8373
Naranja claro	C2	0.2296
Naranja	C3	0.4977
Amarillo	C4	0.2734
Verde claro	C5	0.3241
Verde Oscuro	C6	2.025
Verde -azul	C7	1.162
Azul	C8	1.102
Morado	C9	1.458
Morado claro	C10	0.8965

Tabla 3. Absorbancias máximas.

Perfil de Absorbancias de los calibradores colorimétricos en el sistema óptico

Partiendo del análisis de las muestras con el sistema desarrollado, se examinó la cantidad de radiación electromagnética absorbida por cada patrón colorimétrico. La potencia del haz transmitido por la solución del analito es comparada comúnmente con la potencia del haz transmitido por una celda idéntica que contiene solamente solvente. En este caso el solvente es la muestra patrón CB. Para determinar la absorbancia experimental [11], se emplea la definición:

$$A_{experimental} = -\log \frac{I_{solución\ analito}}{I_{muestra\ patrón}}$$

En esta definición, interviene la intensidad de la solución referencia (blanco) y la solución muestra de interés. En este sentido, el sistema permitió adquirir imágenes a color de cada una de las muestras calibratoras, con las que es posible obtener los histogramas de intensidad RGB para cada una de ellas, además del blanco. Las imágenes a color consisten regularmente de una composición de tres imágenes separadas en escala de grises, cada una representa los tres colores primarios; rojo, verde y azul. Una vez adquiridos, se realizaron 10 repeticiones de lectura por cada muestra con

el fin de observar la repetibilidad en el registro. Dado que las variaciones observadas fueron mínimas, se decidió realizar un promedio para cada una de las pruebas en cada rango de la muestra colorimétrica.

De esta forma se tiene un total de 10 muestras colorimétricas considerando las 3 componentes del espacio de color de las imágenes de color (RGB). La dimensión máxima de datos disponible está formada por 50 repeticiones por medida de cada imagen de color x 3 rangos de espacio de color x 10 calibradores colorimétricos.

En la tabla 4 se muestran las absorbancias conseguidas de cada calibrador. Así mismo, se puede observar que existe una distinción de absorbancias máximas por la tonalidad de la muestra de color si se compara con las componentes RGB. De esta forma, solo 5 de las 10 muestras analizadas cumplen con esta condición de absorbancias, en comparación de las muestras en tonalidad azul, puesto que la mayoría de estas arrojan una absorbancia en la componente roja.

Tabla 4. Pruebas de Absorbancias máximas en el OE

CAL.	TONALIDAD	PRUEBA 1			PRUEBA 2			PRUEBA 3			PRUEBA 4			PRUEBA 5			PROMEDIO			GENERAL
		R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B	
c1	Rojo	3.075	2.534	2.784	3.008	2.521	2.742	3.037	2.521	2.74	2.643	2.258	2.427	2.624	2.248	2.407	2.877	2.416	2.62	2.6378
c2	Naranja claro	2.63	2.458	2.923	2.508	2.429	2.739	2.506	2.426	2.753	2.56	2.438	2.704	2.566	2.443	2.842	2.554	2.439	2.812	2.6017
c3	Naranja	2.733	2.617	2.522	2.743	2.618	2.532	2.762	2.624	2.597	2.645	2.588	2.901	2.756	2.991	2.792	2.628	2.688	2.689	2.7346
c4	Amarillo	2.936	3.026	2.474	2.908	3.012	2.34	2.765	2.96	2.089	2.744	2.957	2.061	2.811	2.953	2.133	2.833	2.933	2.282	2.678
c5	Verde claro	2.49	2.706	2.474	2.533	2.729	2.545	2.523	2.729	2.545	2.468	2.69	2.455	2.471	2.695	2.502	2.497	2.51	2.504	2.5703
c6	Verde Oscuro	2.801	3.14	3.302	2.81	3.13	3.287	2.876	3.175	3.339	2.82.8	3.13	3.283	2.748	3.108	3.265	2.807	3.137	3.295	3.0796
c7	Verde - azul	2.535	2.389	2.107	2.061	2.383	2.464	2.368	2.362	1.988	2.444	2.381	2.087	2.726	2.435	2.361	2.427	2.39	2.202	2.3394
c8	Azul	3.151	2.956	3.156	2.35	2.332	2.224	2.323	2.52	2.333	2.202	2.276	2.205	2.296	2.272	2.202	2.504	2.431	2.464	2.4664
c9	Morado	2.419	2.219	2.467	2.445	2.235	2.485	2.518	2.231	2.473	2.35	2.203	2.23	2.63	2.258	2.456	2.471	2.229	2.442	2.3807
c10	Morado claro	2.405	2.28	2.322	2.225	2.113	2.295	2.205	2.212	2.193	2.426	2.287	2.336	2.225	2.213	2.295	2.297	2.141	2.248	2.2621

En este sentido el CMC (Comité de Medición del Color de la Sociedad de Tintes y Colorantes de Gran Bretaña) provee un mejor acuerdo entre la evaluación visual y las diferencias de color instrumentalmente [12]. Las consideraciones propuestas por esta organización, permite establecer un mejor sistema para evaluar la percepción del color del ojo humano avalado por Teunis X-Rite, Grandville, Michigan. Es necesario recalcar que la percepción del color del ojo humano es más tolerante en la región verde, pero menos tolerante en la región azul oscuro. Relacionando lo anterior y tomando en consideración los resultados arrojados de la absorbancia experimental por componente RGB del sistema OE, es posible evidenciar que para las muestras colorimétricas en tonalidades azules/moradas tienen una absorbancia representativa en la componente roja (no tolerable/no aceptable) y para las muestras colorimétricas en tonalidades verdes/amarilla arroja el color en la componente verde (tolerable/aceptable), por lo que el sistema desarrollado muestra tolerancias acordes con las relacionadas a la tonalidad del color rojo y verde.

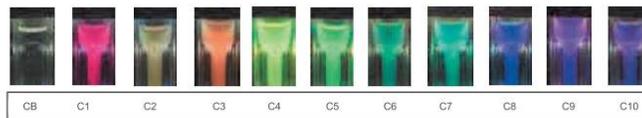


Figura 10. Fotografías capturadas por la cámara Raspberry Pi. Dimension:1458 x1944 píxeles; Representación del color sRGB; Distancia focal 3 mm; Punto focal $f/2$; Tiempo de exposición: 1/15 s; Velocidad ISO-320; Apertura máxima: 2

Con los datos integrados en la tabla 5 y representados en la figura 10, es posible mostrar una comparativa de la desviación estándar de los calibradores, donde es posible notar que la dispersión de los datos para al menos 7 calibradores es mínima. El calibrador 6 con tonalidad verde oscuro en lo particular, presenta una mejor respuesta en comparación con el resto de las muestras gelificadas.

CALIBRADOR	TONALIDAD	Desviación Estándar General			Desviación Estándar
		R	G	B	
c1	Rojo	0.200537228	0.133634	0.166493452	0.027314574
c2	Naranja claro	0.04539815	0.0111749	0.066297885	0.022721941
c3	Naranja	0.100575277	0.0830672	0.214730954	0.058379415
c4	Amarillo	0.07649127	0.0310235	0.160537684	0.053650144
c5	Verde claro	0.026663953	0.016516	0.036385217	0.008112205
c6	Verde oscuro	0.040974597	0.0217	0.024988189	0.008418809
c7	Verde -azul	0.218564028	0.0244445	0.180071515	0.083920464
c8	Azul	0.326491559	0.2634179	0.368065007	0.043021515
c9	Morado	0.093281454	0.0183749	0.056809274	0.030583962
c10	Morado claro	0.097256375	0.0348307	0.066107591	0.025485188

Tabla 5. Comparativa en desviación estándar por RGB y general

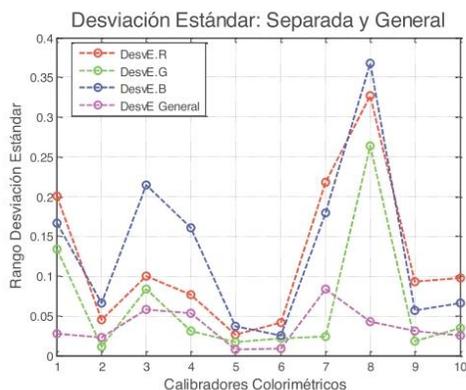


Figura 9. Comparación de desviación estándar: separada y general

CONCLUSIONES

En este trabajo se implementó el uso de calibradores de color, basados en muestras colorimétricas elaboradas con silicón que permiten garantizar la trazabilidad de las mediciones realizadas. Considerando la necesidad de revisar de forma periódica la exactitud fotométrica y longitud de onda del sistema, los calibradores construidos tienen las ventajas de no presentar variaciones asociadas al cambio de temperatura y degradación a lo largo del tiempo. Así mismo, la instrumentación propuesta basada en la adquisición de las imágenes y los espectros de una muestra resultó útil para corroborar que los calibradores de absorción tienen separabilidad entre ellas, permitiendo diferenciar entre muestras colorimétricas a partir de espectro y absorbancia. El procesamiento de imagen que permite obtener la respuesta espectral del sensor CCD, favorece la identificación de los canales de color del modelo RGB para cada píxel de la cámara Raspberry Pi V2 empleada. El procedimiento en su conjunto representa la primera fase de caracterización del OE para muestras de color en estado sol-gel, en donde los resultados obtenidos son alentadores porque permiten calibrar el OE a partir de patrones colorimétricos, brindando la pauta para establecer absorbancias experimentales a partir de las imágenes de color de cada una de las muestras colorimétricas.

BIBLIOGRAFÍA

1. H. Zumbado. "Análisis químico de los alimentos. Métodos Clásicos" *Principales campos de aplicación de la química analítica en el área de los alimentos*. (Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad la Habana, 2004). Capítulo 1, pp.17-19.
2. S. Buratti et al, "E-nose, e-tongue and e-eye for edible olive oil characterization and shelf life assessment: A powerful data fusion approach", *Talanta*, Vol. 182, 2018, pp. 131-141.
3. G. Orlandi et al, "Data fusion of electronic eye and electronic tongue signals to monitor grape ripening", *Talanta*, Vol. 195, 2019, pp. 181-189.
4. Di Wu, Da-Wen Sun, "Colour measurements by computer vision for food quality control – A review", *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 29, 2013, pp. 5-20.
5. Changhua Xu, "Evaluation Technologies for Food Quality". *Electronic eye for food sensory evaluation* (Ed. Jian Zhong, Xichang Wang. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), Chapter 4. 2019, pp. 37-59.
6. Juliana Freitas Santos Gomes, Fabiana Rodrigues Leta. "Applications of computer vision techniques in the agriculture and food industry: a review", *European Food Research and Technology*. Vol. 235, 2012, pp 989–1000.
7. Karsten Rodenacker and Ewert Bengtsson. "A feature set for cytometry on digitized microscopic images". *Analytical Cellular Pathology*. Vol. 25, 2002, pp 1–36.

8. Tomás Kratochvíl and Jan Melo. "Utilization of matlab for tv colorimetry and color spaces análisis", Institute of Radio Electronics, Brno University of Technology.2006
9. Giorgia Orlandi et al. "Electronic eye for the prediction of parameters related to grape ripening", *Talanta*, Vol. 186, 2018, pp. 381-388.
10. Gómez Rocha Anais Ivonne, Gutiérrez Salgado Juan Manuel. Tesis "Desarrollo de un pHmetro óptico para medidas in-situ". Departamento de Ingeniería Eléctrica, Sección de Bioelectrónica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, 2016.
11. Brunatti Carlos, Martín Ana María. Introducción a la Espectroscopia de Absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. Recuperado de <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>. 19/06/2020
12. Socaciu Carmen, Diehl A. Horst. "11. Instruments to Analyze Food Colors". *Handbook of Food Analysis Instruments*. 2008. Doi. 10.1201/9781420045673.ch8

SISTEMA DE ESPECTROMETRÍA PARA CARACTERIZACIÓN DE LÍQUIDOS

MC. Anais Ivonne Gómez Rocha¹, Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado²

Resumen— Este trabajo describe el diseño de un sistema de espectrometría capaz de caracterizar líquidos mediante la medición de absorbancia en la región visible de pequeños volúmenes de muestras. La instrumentación óptica integra una fuente de luz generada por un diodo emisor de luz (LED) y un módulo de detección basado en una cámara HD compatible con Raspberry Pi 3B+. El haz de luz blanca se divide con una rejilla de difracción de 1800 líneas/mm. El prototipo es capaz de analizar muestras consecutivas haciendo uso de un sistema planetario que mediante el giro posiciona las muestras para su posterior caracterización óptica. Para el giro se emplea un motor reductor de engranaje DC y para el control de la posición se usa el sensor L298P junto con un codificador magnético de efecto hall SS466a. La construcción de las piezas que integran el prototipo se realizó en una impresora 3D para su fácil reproducibilidad.

Palabras clave—Óptica, Espectrometría, LED, 3D, Cámara Raspberry

Introducción

El creciente interés de los productores por evaluar la autenticidad, la calidad y la seguridad de los productos alimenticios con el fin de satisfacer a sus consumidores, ha motivado el desarrollo de sistemas analíticos cada vez más eficientes capaces de monitorear estas características en los productos finales. Para garantizar la autenticidad de sus productos se deben cumplir con estrictas normas de producción como con las legislaciones gubernamentales vigentes. La protección de los derechos de los consumidores y la prevención de prácticas fraudulentas o engañosas, así como la adulteración de los alimentos son un desafío importante al que debe hacer frente la industria alimentaria

En los últimos años, el uso de equipos analíticos ha alcanzado un nivel de sofisticación tal que permite la investigación de las propiedades de los alimentos. Por ejemplo, los avances recientes en la separación cromatográfica, la espectrometría de masas (GC-MS) y espectrometría UV-VIS son comúnmente utilizadas para obtener datos cualitativos y cuantitativos que permiten evaluar la composición de los alimentos. Sin embargo, a pesar de la precisión y certeza que brindan estas técnicas, poseen claras desventajas relacionadas con los costosos detectores que utilizan, la alta demanda de insumos para el pretratamiento de muestras, el tiempo de análisis y la necesidad de instalaciones adecuadas para los equipos; situación que convierte su uso a valoraciones exclusivas confinadas a un laboratorio con una baja utilidad en la aplicación del control de calidad de un proceso en línea.

Una nueva perspectiva de instrumentación analítica se sustenta en el uso de las llamadas tecnologías bioinspiradas. Los sistemas bioinspirados basan su operación en la emulación de los sentidos humanos para determinar de manera sensorial características de los alimentos. Los sistemas más comunes de estas tecnologías son las Narices Electrónicas (NE), las Lenguas Electrónicas (LE) y los Ojos Electrónicos (OE), que mediante diferentes formas de transducción (energía eléctrica, magnética, química, térmica o de radiación) transforman la información analítica presente en una muestra a una señal eléctrica que posteriormente es interpretada por una herramienta de procesamiento de datos (Susana Burrati et al. 2018 y Giorgia Orlandi et al. 2019).

En lo particular, un OE está diseñado para imitar la visión humana y analizar los atributos relacionados con el color y el aspecto de una muestra. Suele ser común, el empleo de técnicas de visión por computadora, técnicas colorimétricas y recientemente la espectrofotometría (Di Wu et al. 2013).

De forma general, un ojo electrónico se compone de tres bloques principales: el primero se relaciona con la adquisición de la información analítica, el segundo con el procesamiento de la información adquirida y finalmente el tercer bloque está asociado con el análisis de imágenes obtenidas, como se puede ver en el diagrama a bloques de la Figura 1. La etapa de adquisición de imágenes consiste en capturar una imagen real y transformarla en una imagen digital utilizando dispositivos como cámaras, escáneres, videos, etc. Una imagen digital es una representación numérica capaz de procesarse computacionalmente (Juliana Santos y Fabiana Rodrigues 2012). Esta etapa de

¹ La MC. Anais Ivonne Gómez Rocha es Estudiante de Doctorado en Ciencias en la especialidad de Ingeniería Eléctrica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México
arochag@cinvestav.mx

² El Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado es Profesor Titular en la sección de Bioelectrónica del Departamento de Ingeniería Eléctrica en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México
mgutierrez@cinvestav.mx

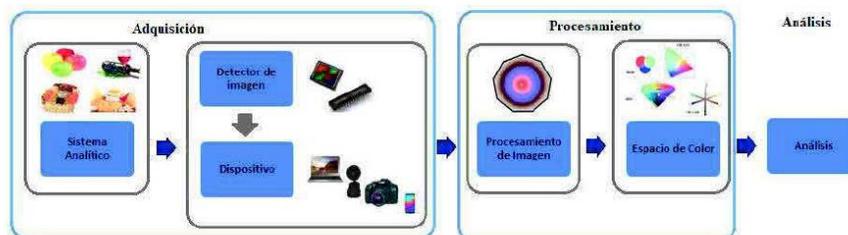


Figura 1. Estructura esquemática de un sistema de análisis de imagen (Changhua Xu 2019).

procesamiento tiene como objetivo mejorar la imagen adquirida y resaltar las características o regiones de interés, eliminando así las distorsiones y el ruido sin agregar más información a su contenido. En este contexto, existen una gran variedad de técnicas a partir de las cuales es posible resaltar la escala de grises y la transformación de color, así como el umbral y el filtrado haciendo uso de los espacios de color como lo son: "RGB" (siglas en inglés de Red, Green, Blue, en español rojo, verde y azul), "CIE LAB" (siglas en inglés International Commission on Illumination, donde L^* es la luminosidad de un objeto que va desde un valor 0 a 100, A^* representa la variación de verde a rojo, y B^* representa la variación de azul a amarillo), "CIE XYZ" (Y es iluminancia, Z tendencia al azul y X es una mezcla de curvas ortogonales a la luminancia y no negativas), "HSV" (siglas en inglés Hue, Saturation, Value, en español tonalidad, saturación y brillo). Después de esta etapa, la imagen está lista para la extracción de características donde se hace un análisis de la imagen para clasificarla en 4 categorías: morfológicas, cromáticas, texturales y estructurales (Rodenacker y Begtsson, 2003).

En este sentido, el OE posee una clara ventaja en el análisis de muestras, pues es capaz de tratar el color, la forma, el tamaño y la textura de los alimentos de manera efectiva sin requerir fases de pretratamiento. Más importante aún, es una técnica confiable eficiente, no destructiva y de fácil operación (Giorgia Orlandi et al. 2018). Como método de detección es objetivo y rápido, demostrando ser una excelente herramienta en la evaluación de la calidad en las bebidas alcohólicas adulteradas, en el análisis de maduración de frutas, vegetales, granos, productos cárnicos, pescados y mariscos, vinos rojos, café, té, entre otro más (Changhua Xu, 2019).

De esta forma, un sistema de OE basado en la técnica de espectrofotometría servirá para determinar agentes extraños que se puede encontrar en medios cromáticos. Donde la propiedad cromática del análisis de la imagen es parte esencial del desarrollo de este trabajo, debido a que describe el color o la composición espectral de la radiación emitida o reflejada por los objetos. Así mismo, la intensidad de los píxeles coadyubará en el análisis de las diferentes bandas espectrales.

Descripción del Método

Diseño y construcción del Ojo Electrónico (OE)

El ojo electrónico diseñado en este trabajo opera bajo un sistema espectrofotométrico de UV-Vis tomando como base el espectro reportado por Gómez y Gutiérrez (2016). El diseño general del equipo se divide en diferentes etapas y el diagrama de bloques principal del dispositivo se muestra en la Figura 2.

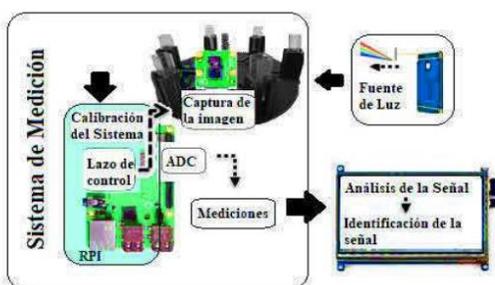


Figura 2. Distribución de los canales del sistema óptico (Flecha negra control electrónico y flecha punteada control intemo).

Para la caracterización del ojo electrónico se toma en cuenta la técnica cromática que consta de diferentes módulos. El primero módulo consiste en una fuente de luz blanca, que en este caso corresponde a un flash diodo emisor de luz (LED). La luz producida por el LED pasa a través de una rejilla de difracción de 1800 líneas/mm y se descompone en sus diferentes longitudes de onda. La luz blanca del Flash LED incide directamente para excitar a la muestra. Después está el módulo de captura de la imagen que basa su operación en una cámara Raspberry Pi V2 para posteriormente acondicionar la señal que es enviada al sistema de registro en la tarjeta Raspberry Pi (RPI) 3 modelo B+. El control del sistema del OE, la medición de las señales de absorbancia y análisis de las señales incidentes de la muestra, están gestionados por la Raspberry Pi.

Los materiales utilizados para la fabricación del instrumento tienen una alta resistencia química y aíslan apropiadamente de la luz externa el proceso de medida con la finalidad de reducir interferencias ópticas que afecten al sistema óptico diseñado. El chasis del prototipo se diseñó para ser impreso en 3D utilizando filamento de impresión ABS (3Dpinplastic) color negro mate con un diámetro exterior de 1.75 mm.

Para manipular las muestras por analizar, se utilizaron cubetas de plástico desechables de la marca BRAND, especiales para los análisis espectrofotométricos en la región UV-VIS con un volumen de llenado de entre 1.5 mL a 3.0 mL y con dimensiones externas de 4.5 mm x 23 mm.. Estos recipientes deben estar libres de polvo y suciedad para obtener una señal fiable antes de efectuar cualquier etapa experimental.

Recepción de la luz

El módulo de detección de luz está basado en una cámara V2 HD compatible con Raspberry 3B+. El módulo de cámara integra un sensor Sony IMX219 de 8 megapíxeles. Se conecta mediante un cable plano de 60 cm al puerto CSI (del inglés: Camera Serial Interface, o Interfaz de Cámara Serie) de la Raspberry Pi. La resolución útil es de 3238 x 2464 píxeles y una lente óptica de ¼ de pulgada. Las dimensiones son: 25 mm x 23 mm x 9 mm.

Sistema mecánico del OE

El prototipo desarrollado dispone de 6 canales; 5 de ellos se utilizan para colocar las celdas de caracterización de medios cromáticos, realizando una comparativa de la medición de la muestra de referencia (blanco) y aquella en la que se determinarán los atributos colorimétricos.

El sistema mecánico consta de los siguientes componentes: un sistema giratorio de celdas basado en engranaje planetario tomado de un motor para aplicaciones automotrices(A), un motor reductor de engranaje DC (12 Volt/1 A) para hacer el funcionamiento de giro(B), un control de velocidad utiliza el sensor L298P(C) junto con un codificador magnético de efecto hall SS466a (D) para el control de la posición; y finalmente la rejilla de difracción en reflexión seleccionada cuenta con 1800 líneas por milímetro con dimensiones de 25 mm x 25 mm (E). La Figura 3 muestra los componentes descritos.



Figura 3. A. Sistema Planetario; B. Motor reductor; C. Sensor de Velocidad; D. Codificador Magnético; E. Rejilla de Difracción.

Calibración del OE

Cuando un haz de luz pasa a través de una cubeta de material transparente que contiene la solución con la muestra, parte de la intensidad de esa luz será absorbida, una parte será reflejada y otra parte transmitida. Considerando lo anterior, se hace una comparación de la intensidad transmitida del solvente, que es el estándar de referencia que contiene solo agua bidestilada (en blanco) y el de intensidad de la muestra preparada, permitiendo la calibración del sistema y la obtención de absorbancia experimental, en concordancia con la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia}_{\text{Experimental}} = -\text{Log} (\text{Intensidad del Solvente}/\text{Intensidad solución Analito}) \quad (1)$$

Preparación de muestras para la caracterización del OE

Se elaboraron un conjunto de muestras calibradoras para probar el dispositivo diseñado. Se utilizó una mezcla de dos compuestos de caucho de silicón RTV615A y RTV615B (Momentive Performance Materials). Este material

permite hacer un encapsulado con la gama de colores del espectro visible al combinarse con tintas colorimétricas genéricas de colores rojo, azul y amarillo. En el cuadro 1 se muestra una relación de los calibradores elaborados para el experimento. Un total de 10 muestras patrón fueron analizadas, junto con una muestra de referencia (silicón sin tinta) actuando como blanco. En la Figura 4, se muestran las soluciones elaboradas contenidas dentro cubetas para análisis espectrofotométrico.

No.	Calibrador	Etiqueta	No.	Calibrador	Etiqueta	No.	Calibrador	Etiqueta
1	Blanco	CB	5	Verde	C4	8	Azul Marino	C8
2	Rojo	C1	6	Verde Militar	C5	9	Morado	C9
3	Naranja	C2	7	Amarillo	C6	10	Verde Limón	C10

Cuadro 1. Componentes RGB para cada calibrador.



Figura 4. Calibradores Colorimétricos.

Comentarios Finales

Procesamiento de imagen en la rejilla de difracción

Para la montura y sujeción de la rejilla de difracción y la cámara Raspberry Rev2 se realizaron diseños de ensamble en una impresora 3D, para posicionar adecuadamente el plano del patrón de difracción.

La cámara es un sensor CMOS y está equipada con un dispositivo CCD (siglas en inglés Charge Coupled Device, en español dispositivo de carga acoplada), el cual no es más que un conjunto de píxeles ordenados en una matriz bidimensional. Cada uno de estos píxeles miden la intensidad de la luz que sobre ellos incide, la cual es una parte pequeña de la escena que enfoca la cámara. De esta forma la imagen continua se discretiza en una matriz de valores de intensidad. Cada píxel este cubierto con uno de tres tipos de filtros, rojo (R), verde (G) o azul(B), en un patrón conocido como mosaico de Bayer para producir imágenes a color. Por lo tanto, a cada píxel le corresponde tres valores de intensidad RGB.

El experimento se realizó de forma que la cámara Raspberry Pi V2 recoja la señal reflejada por la rejilla de difracción, al hacer incidir el haz de luz blanca que previamente fue centrada con respecto a la montura construida. La Figura 5 muestra la captura de la imagen de la rejilla.

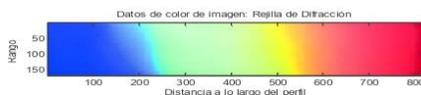


Figura 5. Captura de la imagen de la Rejilla de difracción.

Sensitividad espectral de la cámara Raspberry Pi V2

Empleando un algoritmo programado en la plataforma Matlab® 2014, se detecta el perfil de intensidad a lo largo de un segmento de línea de la imagen capturada por la cámara donde se extrajo una fila de píxeles de la región de mayor calidad de la imagen del sensor para graficar la intensidad plasmada en cada píxel en una escala de 0 a 255 (correspondiente a una imagen de 8 bits). En la Figura 6 se encuentran tres graficas separadas por las intensidades roja, verde y azul.

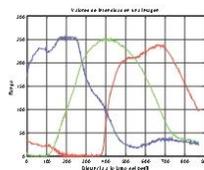


Figura 6. Perfil de intensidad de la Rejilla de difracción.

En el cuadro 2 se hace referencia a las componentes del modelo RGB de cada uno de los patrones de silicón preparados con variaciones de color, los valores obtenidos del modelo corresponden a la sensibilidad para cada canal de color.

Muestra	R	G	B	Muestra	R	G	B	Muestra	R	G	B
CB	248	239	248	C4	197	221	199	C8	186	191	219
C1	220	168	242	C5	114	216	170	C9	218	219	228
C2	234	179	168	C6	238	224	190	C10	236	231	214
C3	208	232	228	C7	234	213	199				

Cuadro 2. Componentes RGB para cada calibrador.

En la Figura 7 se puede observar que para el calibrador CB, el cual proporciona una imagen blanca, los canales de color se encuentran muy próximos entre sí, principalmente el canal rojo y azul. Para el calibrador C5 el canal que predomina es el verde lo cual también se observa en la imagen con esta misma tonalidad. Para la muestra de tonalidad amarilla los canales que predominan son el rojo y el verde.

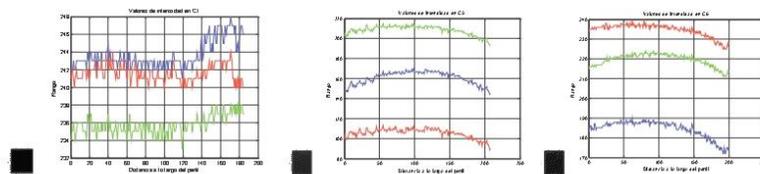


Figura 7. Perfil RGB de las muestras calibradoras.

Perfil de Absorbancias de los calibradores colorimétricos en un espectrómetro comercial

Para esta parte del trabajo, se realizó un barrido espectral desde los 190 nm a los 1100 nm con un espectrómetro comercial UV-Visible Agilent Mod. 8453. Los valores de absorbancia medidos se muestran en el cuadro 3 y en la Figura 8 es posible apreciar el espectro de absorción de los calibradores colorimétricos. Al igual como sucedía con el sistema diseñado por Gómez y Gutiérrez (2016), es posible observar en el zoom de la figura 8, existe una separabilidad de los patrones diseñados en donde se puede identificar que a una longitud de onda de $\lambda=740$ nm, se encuentra el máximo de absorbancias que permite identificar y caracterizar cada uno de los calibradores. La muestra de referencia CB se calibró a 0 nm.

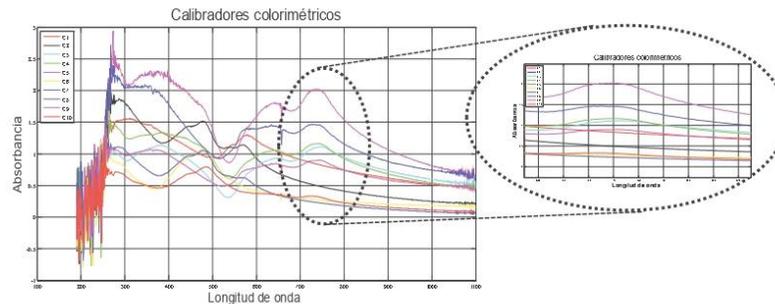


Figura 8. Mediciones de Absorbancias.

Etiqueta	Absorbancia _{max}	Etiqueta	Absorbancia _{max}	Etiqueta	Absorbancia _{max}
C1	0.8373	C5	2.025	C9	0.8965
C2	0.4977	C6	0.2734	C10	0.3241
C3	1.102	C7	0.2296		
C4	1.162	C8	1.458		

Cuadro 3. Absorbancias máximas.

Conclusiones

En este trabajo se implementó el uso de calibradores de color, basados en muestras colorimétricas elaboradas con silicón que permiten garantizar la trazabilidad de las mediciones realizadas. Considerando la necesidad de revisar de forma periódica la exactitud fotométrica y longitud de onda del sistema, los calibradores construidos tienen las ventajas de no presentar variaciones asociadas al cambio de temperatura y degeneración a lo largo del tiempo. Así mismo, la instrumentación propuesta basada en la adquisición de las imágenes y los espectros de una muestra resultó útil para corroborar que los calibradores de absorción tienen separabilidad entre ellas, permitiendo diferenciar entre muestras colorimétricas a partir de espectro y absorbancia. El procesamiento de imagen que permite obtener la respuesta espectral del sensor CCD, favorece la identificación de los canales de color del modelo RGB para cada píxel de la cámara Raspberry Pi V2 empleada. El procedimiento en su conjunto representa la primera fase de caracterización del OE, en donde los resultados obtenidos son alentadores porque permiten calibrar el OE a partir de patrones colorimétricos, brindando la pauta para establecer absorbancias experimentales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento y la beca de posgrado otorgada a Anais Ivonne Gómez Rocha.

Referencias

- Changhua Xu, "4 - Electronic eye for food sensory evaluation" Ed. Jian Zhong, Xichang Wang "Evaluation Technologies for Food Quality" *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, pp. 37-59, 2019.
- Di Wu, Da-Wen Sun, "Colour measurements by computer vision for food quality control – A review", *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 29, pp. 5-20, 2013.
- Gómez Rocha Anais Ivonne, Gutiérrez Salgado Juan Manuel. Tesis "Desarrollo de un pH-metro óptico para medidas in-situ". *Departamento de Ingeniería Eléctrica, Sección de Bioelectrónica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*, Ciudad de México, 2016.
- Giorgia Orlandi, Rosalba Calvini, Giorgia Foca, Laura Pigani, Giuseppe Vasile Simone, Alessandro Ulrici, "Electronic eye for the prediction of parameters related to grape ripening", *Talanta*, Vol. 186, pp. 381-388, 2018.
- Giorgia Orlandi, Rosalba Calvini, Giorgia Foca, Laura Pigani, Giuseppe Vasile Simone, Alessandro Ulrici, "Data fusion of electronic eye and electronic tongue signals to monitor grape ripening", *Talanta*, Vol. 195, pp. 181-189, 2019.
- Juliana Freitas Santos Gomes, Fabiana Rodrigues Leta. "Applications of computer vision techniques in the agriculture and food industry: a review", *European Food Research and Technology*. Vol. 235, pp 989-1000, 2012.
- Karsten Rodenacker and Ewert Bengtsson. "A feature set for cytometry on digitized microscopic images". *Analytical Cellular Pathology*. Vol. 25, pp 1-36, 2002.
- Krishna Kumar Patel, A. Kar, S.N. Jha, M.A. Khan "Machine vision system: A tool for quality inspection of food and agricultural products" *Journal Food Science and Technology*. Mysore, Vol. 49 (2), pp. 123-141, 2012.
- Sareesh Sudhakaran. "What is the difference between CIE LAB, CIE RGB, CIE xyY and CIE XYZ?", *Revista Wolfcrow* (En línea) January 3, 2013, consultada por internet el 3 de octubre del 2019. Dirección de internet: <https://wolfcrow.com/what-is-the-difference-between-cie-lab-cie-rgb-cie-xyy-and-cie-xyz/>
- Susanna Buratti, Cristina Malegori, Simona Benedetti, Paolo Oliveri, Gabriella Giovannelli, "E-nose, e-tongue and e-eye for edible olive oil characterization and shelf life assessment: A powerful data fusion approach", *Talanta*, Vol. 182, pp. 131-141, 2018.

Artículos de congreso a nivel internacional

Electronic Eye for Identification of Tequila Samples †

Anais Gómez ¹, Diana Bueno ² and Juan Manuel Gutiérrez ^{1,*}

¹ Bioelectronics Section, Department of Electrical Engineering, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, 07360 Mexico City, Mexico; arochag@cinvestav.mx

² Bioprocess Department, Biotechnology Interdisciplinary Professional Unit, National Polytechnic Institute, Av. Acueducto S/N, 07340 Mexico City, Mexico; dbuenoh@ipn.mx

* Correspondence: mgutierrez@cinvestav.mx; Tel.: +52-55-5747-3800; Fax: +52-55-5747-3981

† Presented at the 1st International Electronic Conference on Biosensors, 2–17 November 2020; Available online: <https://iecb2020.sciforum.net/>.

Published: 2 November 2020

Abstract: The present work reports the potential of a bio-inspired system based on spectrometry, also known as Electronic Eye (EE), capable of detecting different Tequila samples. The reported system analyzes small volumes of Tequila Reposado and Blanco by calculating samples' absorbances, using a low cost and portable instrumentation employing a CCD camera. The absorbance imaging method consisted of exciting samples with light passes through an 8MP camera connected to a Raspberry Pi Card. The camera's image data are analyzed using MATLAB 2018b to be represented in Red, Green and Blue (RGB) components for each pixel, in order to get an approximation of the absorbance and the Surface Color Index (I_{sc}) associated with sample concentration. Using the developed EE, it was possible to identify seven different kinds and brands of Tequila. From the obtained results, it was observed that the average absorbance of the Tequila Reposado was greater than the absorbance of the Tequila Blanco. Otherwise, with the I_{sc} , the Tequila Blanco color index is lower concerning the Tequila Reposado's. Finally, the EE allowed the identification of Tequila samples with reproducibility and repeatability.

Keywords: electronic eye; optical methods; RGB analysis; tequila

1. Introduction

The growing interest of spirits producers to evaluate their authenticity, quality, and safety has motivated the development of efficient, portable, and low-cost analytical systems capable of monitoring these products' characteristics. The use of analytical equipment has reached a level of sophistication that allows the investigation of foods' properties. Regarding spirits and liquors, a consumer commonly wants and expects a product that is pleasant to taste and smell. In this regard, Tequila quality control is oriented toward understanding, characterizing, and controlling its aging, alcoholic content, and volatile composition, which define its characteristic color, flavor, and aroma.

Tequila is the traditional Mexican liquor whose worldwide consumption ranks fourth after whiskey, vodka, and rum. It has a significant presence in more than 120 countries and has sales of more than 200 million liters per year [1]. To control its production and quality specifications to export, it established the Protected Designation of Origin (POD) [2], recognized by the United States [3] and the European Union [4]. The Tequila is a distilled spirit from the cooked and fermented juice of the Agave Tequilana Weber blue variety, whose cultivation is authorized in the Mexican states of Jalisco, Nayarit, Tamaulipas, Michoacan, and Guanajuato.

Usually, Tequila's quality assessment is performed using conventional analytical methods, mainly based on UV-Vis spectrophotometry, high-performance liquid chromatography, spectroscopy, chemical analysis [5], and sensory analysis performed by a human panel [6]. Despite these advantages, the conventional analytical methods are long protocols that require a period from

hours to days to carry out the tests, expensive equipment and require an abundance of technically qualified personnel, considering its use as complete evaluations confined to a specialized laboratory with no possibilities of adaptation in applications with online quality control. Therefore, there is an urgent need for fast, cheaper, portable, and field effective alternatives that achieve reliable and non-destructive measurements.

This new perspective on analytical instrumentation has been focused on using bio-inspired systems that base their operation on the emulation of human senses to determine food characteristics, such as color, shape or size. In particular, the Electronic Eye (EE) has been designed to mimic human vision and analyze the color and some other attributes related to the sample's appearance [7,8], and it is usually based on computer vision, colorimetric or spectrophotometry methods [9–11].

Electronic Eyes have proven advantageous in various foodstuff areas, such as process monitoring, quality control, freshness assessment, shelf life investigation, and authenticity assessment. Over the last few years, it has been possible to find applications related to the evaluation of the quality in alcoholic beverages [12,13], fruit ripening analysis [14–16], vegetables [17,18], cereals [19,20], meat products [21,22], fish and seafood [23–25], coffee [26,27], tea [28,29], olive oil [30,31], and others [32,33].

The main basis of electronic eyes is the acquisition of analytical information (Figure 1), typically using a Charge-Coupled Device (CCD) image sensor coupled with a camera [34–36]. After digital imaging, image processing is applied to enhance the acquired images for further analysis.

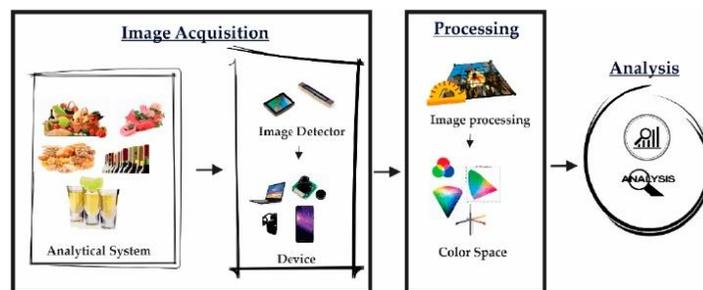


Figure 1. Schematic structure of an image analysis system.

The objective of this work is to present an ongoing research related to the development of a portable Electronic Eye based on a typical computer vision system with the fundamental components: Lighting device, a frame-grabber, a CCD array camera, a personal computer, and a high-resolution color monitor, for identification of small volumes of Tequila samples by absorbance detection.

2. Materials and Methods

2.1. Samples of Tequila

This work focused on studying Blanco and Reposado Tequila from the Jalisco state region due to these types being the most popular and consumed. A total of seven commercial Tequila bottles were purchased from a local supermarket considering different well-known brands and certified by the Consejo Regulador del Tequila (CRT). Different samples share one or more characteristics (a complete description of the set is shown in Table 1).

Table 1. Sample subdivision according to properties of interest.

Type	Brand	Brand Tag	Alcoholic Strength (vol %)
Blanco	Hornitos	B1	38
Blanco	Orendain	B2	38
Reposado	Hornitos	R1	38
Reposado	Jimador	R2	35
Reposado	100 años Agave Azul	R3	35
Reposado	Don Ramón	R4	35
Reposado	Jarana	R5	35

2.2. Electronic Eye Design General Features

The EE designed prototype is integrated as a portable system, smoothly operated as a PC peripheral. The light source with which the system operates is based on a Light-Emitting Diode (LED), positioned in a centered zenith plane to improve accuracy and image acquisition (this position is widely used for samples with flat surfaces) [7]. There is a channel to place the sample to be analyzed and a CCD sensor to acquire digital images. The data’s control and processing are carried out through routines programmed in a small single-board computer that interacts with the user by a digital display. A general diagram of the device is shown in Figure 2.

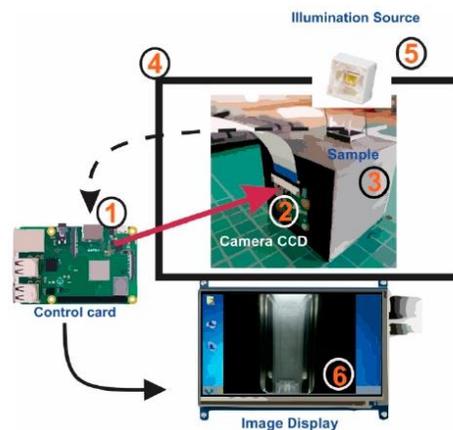


Figure 2. Schematic representation of EE system for digital image measurements of Tequila samples. 1: Control card (Raspberry 3B+); 2: Digital camera CCD v2 Raspberry; 3: Fixed holder and cuvette; 4: Closed box for light control; 5: LED; 6: Image Display 7”.

2.3. Experimental

Some steps are necessary to operate the EE system. First, seven UV cuvettes are filled with 1 mL of each Tequila sample and one cuvette with the same volume of blank solution (distilled water). Figure 3 shows the result of the described process. The first sample to be measured corresponds to the blank solution in order to establish a reference signal. Afterward, the cuvettes containing different Tequila samples are measured one by one. Image capture readings are recorded using the designed Python-based manual control platform.

During each measurement, the lighting is always on, while the active Raspberry V2 camera sent the acquired image to the Raspberry Model 3B + development board. The entire procedure to capture a single sample takes around 10 s. Five subsequent tests with ten repetitions were carried out separately for each sample to observe the repeatability and reproducibility measures.



Figure 3. (a) Commercial Tequila bottles; (b) set of samples prepared for analysis.

From the captured information, the RGB intensity histograms for each sample were obtained, in addition to the blank solution. Finally, the experimental absorbance value is obtained in terms of RGB intensity. Since the variation is minimal in the calculated absorbance values for each repetition of the experimental phase, it was decided to report only the average value. All calculations were made considering the 8-bit pixel value format.

2.4. Apparatus and Software

Digital images were obtained with the designed EE system under controlled light using a white 2xLED (model LYA-L29; Huawei Smartphones®) and a digital camera (Raspberry Pi Camera Module v2) with a Sony IMX219 8-megapixel sensor. They were controlled using a Raspberry Pi B Model 3+ with Python 2.7 software. Samples were placed in disposable plastic cuvettes (BRAND, UV-cuvettes) free of dust and dirt to obtain trustworthy images. The cuvettes' filling volume has a range of 1.5 to 3.0 mL, with external dimensions of 4.5 mm × 23 mm that fits in a holder box that was located at a fixed distance (3 cm) from the camera focal plane. All digital images were processed offline to obtain RGB-data using MATLAB® 2018b (MathWorks, Natick, MA, USA).

2.5. Image Acquisition

Three hundred fifty Tequila images were captured (50 photos for each tequila sample). Each image was captured by the camera CCD Raspberry V2 and saved as an 8-bit JPG format on the Raspberry model 3B+ memory, the average size per image is 2.7 MB (8 Megapixels resolution, focus of $f/2$, 2592 × 1944 pixels). It was monitored during all experimental stages that the chassis remained closed during image capture, avoiding external light to get good quality images.

The white LED light source is placed at a zenith angle of the sample, where it is covered with white absorbent paper to avoid discrepancies with the lighting. The Raspberry 3B+ card controls the camera v2. When the camera is turned on, the image is acquired and stored while displayed on the system screen. Subsequently, a preprocessing task is carried out, which consist on select and crop the region of interest (ROI). All images cropped were saved as a separate file with a constant pixel size (1244 × 231 pixels).

Considering that the obtained images are true-color images, it is possible to represent them as 3D matrixes associated with red, green, and blue components [37,38]. The key steps followed for the EE acquisition and elaboration of the regions RGB images are illustrated in the right side of Figure 4.

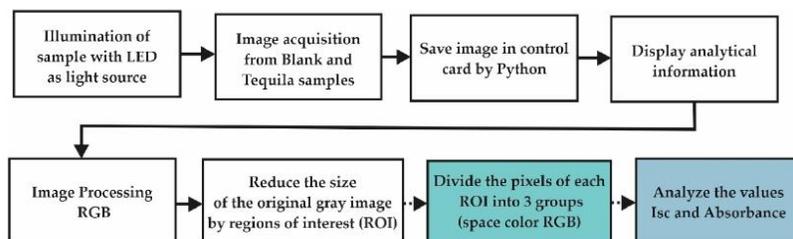


Figure 4. A generalized block diagram of acquisition and identification of image processing EE.

2.6. Digital Image Analysis

When light passes through the sample, some of the light is absorbed [39,40]. Considering this phenomena, the response of the EE system can be modeled as shown in (1) where A_λ is the absorbance governed by the Lambert-Bee law [41], where I_0 is the intensity incident on the solution, I_1 is the intensity that comes out of the sample, λ is the wavelength of the applied light, C is the concentration of the absorbent sample ($moles \cdot l^{-1}$), b is the optical path (thickness of the cell) and ϵ is the molar absorptivity coefficient.

$$A_\lambda = -\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon b C \tag{1}$$

This law expresses the proportional relationship between the absorbance and the concentration of certain compounds present in the sample under analysis. This equation represents a crucial element in evaluating the sample’s absorbance; therefore, it was part of the implemented algorithms for image processing in the MATLAB®.

Experimentally, once a beam of light passes through the cuvette of transparent material containing the sample, the intensity of that light will be absorbed, some will be reflected, and some will be transmitted. This way, it is possible to compare the transmitted intensity of a standard or blank solution and the interested sample’s transmitted intensity. This procedure allows not only the system calibration but also the obtaining of an experimental absorbance, as shown below in (2):

$$A_{\lambda experimental} = -\log\left(\frac{I_{solvent}}{I_{analyte solution}}\right) \tag{2}$$

In order to complete the Tequila samples’ characterization, it was considered to use the average surface color index (I_{sc}) for RGB space to describe the changes in color intensity and turbidity on the surface of a sample [42]. Due to a digital image is a two-dimensional collection of data, three values associated with vectors R, G, and B for each pixel, mean values can be calculated for the same phase and, in consequence, a total vector can be calculated to describe the entire surface. For a surface equal to one pixel, (I_{sc}) is given by:

$$I_{sc} = \frac{f_m}{\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}} \tag{3}$$

where f_m is a magnification factor used to increase the numerical value of I_{sc} (here, use to $f_m = 1 \times 10^5$ in order to obtain values in the 0 - 100 scale) R, G and B are the magnitudes of vectors \vec{R} , \vec{G} and \vec{B} , respectively.

3. Results

The selected ROI is automatically defined and fixed for all analyzed sample images. The ROI was chosen considering the UV-Vis viewing window of the cuvette. In this way, the region of interest and its relative position regarding the sample support is always constant. Figure 5 shows three original images captured from some representative samples; the black dotted lines within the cuvette image denote the selected ROI, as well as the RGB intensity histogram associated with it.

Furthermore, it can be seen in the histogram graphs that the color components are very close to each other, especially the green and blue ones. The three components reach a maximum intensity value of 255 (along the x-axis in graph).

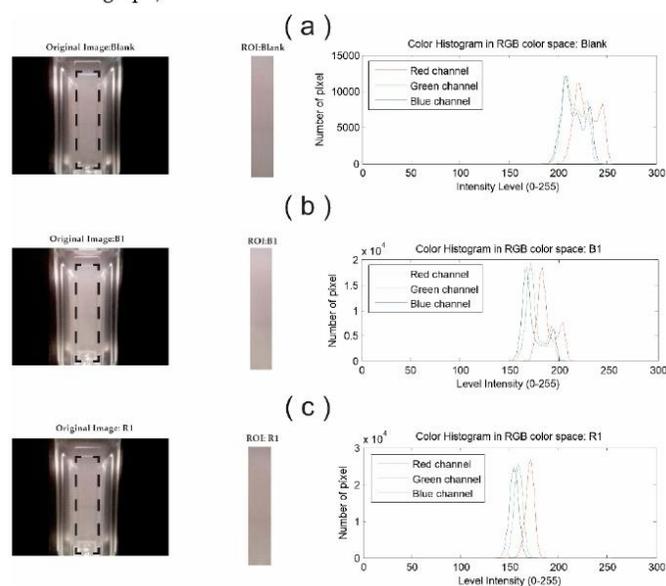


Figure 5. Representative images of (a) Blank solution, (b) Blanco Tequila and (c) Reposado Tequila samples. From left to right you can see image captured by EE, ROI region and RGB intensity histogram.

Since the RGB model is the most common method used to detect color variations, this work was employed to detect color variations in Tequila samples. For this purpose, the images acquired were organized as a matrix 50×21 , where the rows correspond to the total number of repetitions (5 tests with 10 repetitions for each test), and the columns represent the seven Tequila samples analyzed by triplicate. The RGB histogram was obtained from each element of the matrix and the average of the R, G and B components was associated with the experimental absorbance through of Equation (2). The evaluated absorbance values from each analyzed sample are shown in Table 2. Likewise, it can be observed that there is a distinction of maximum absorbance by the hue of the color sample when compared with the RGB components.

Table 2. Absorbance values.

Brand Tag	Average Components of RGB Vector			Average Intensity (RGB)	Absorbance _{λ}
	R	G	B		
Blank	255	251 ± 4.0970	253 ± 3.4674	253	0.0016 ± 0.0038
B1	214 ± 0.91	204 ± 0.8581	206 ± 1.2337	208 ± 1.006	0.0867 ± 0.0021
B2	214 ± 1.9303	205 ± 1.8688	196 ± 2.077	205 ± 1.9589	0.0928 ± 0.042
R1	196 ± 5.9285	187 ± 5.1556	181 ± 5.6821	188 ± 5.5887	0.1304 ± 0.129
R2	192 ± 1.3674	180 ± 1.5104	178 ± 1.3740	183 ± 1.4172	0.1415 ± 0.0034
R3	210 ± 4.144	194 ± 3.8391	185 ± 3.2486	196 ± 3.7440	0.1125 ± 0.0083
R4	190 ± 6.0422	172 ± 4.7693	154 ± 4.3530	172 ± 5.0548	0.1688 ± 0.0128
R5	209 ± 2.4598	199 ± 2.5813	188 ± 3.0035	199 ± 2.6815	0.1066 ± 0.0059

Figure 6 shows the absorbance with the dispersion, where the Blanco tequilas labeled as B1 and B2 have an absorbance value below 0.1. On the other hand, Reposado tequilas show an absorbance greater than 0.1; in particular, the sample labeled as R4 has the highest absorbance for the seven tequilas analyzed.

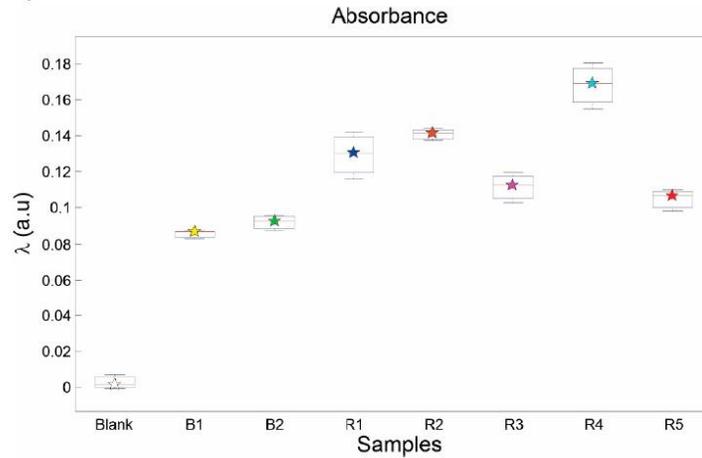


Figure 6. Absorbance of analyzed samples.

To ensure that the internal lighting conditions do not affect the homogeneity of color (due to shadows or flashing reflections) in the sample, a validation of the homogeneous color distribution was carried out employing the Surface Color Index [41].

The changes in the RGB components indicate variations of color, which are associated with the composition of the sample. The vectors R, G, and B are the combination of values required to define the resultant vector's magnitude in RGB space. In the case of digital images, the values of R, G and B are integers and range from 0 to 255, which allows generating 16,777,216 colors, where the color white is formed with the three primary colors at their maximum value (255, 255, 255). It is possible to identify the two analyzed Tequilas (Blanco and Reposado) by associating it with the I_{sc} .

Table 3 indicates the color index data for each sample of Tequila, and Figure 7 represents graphically the I_{sc} distribution for the seven Tequila samples analyzed. It is possible to find similarities in the Figures 6 and 7, due to the absorbance and Surface Color Index have a similar relation in the Tequila samples. Less value in Blanco Tequilas and high values for Reposado Tequilas.

Table 3. Surface color index intensity.

Brand Tag	Average Components of RGB Vector			I_{sc}
	R	G	B	
Blank	255	251 ± 4.0970	253 ± 3.4674	0.0016 ± 0.0038
B1	214 ± 0.91	204 ± 0.8581	206 ± 1.2337	27.8 ± 1.3335
B2	214 ± 1.9303	205 ± 1.8688	196 ± 2.077	28.1 ± 2.6833
R1	196 ± 5.9285	187 ± 5.1556	181 ± 5.6821	30.7 ± 9.1298
R2	192 ± 1.3674	180 ± 1.5104	178 ± 1.3740	31.5 ± 2.4289
R3	210 ± 4.144	194 ± 3.8391	185 ± 3.2486	29.4 ± 5.6141
R4	190 ± 6.0422	172 ± 4.7693	154 ± 4.3530	33.4 ± 9.8801
R5	209 ± 2.4598	199 ± 2.5813	188 ± 3.0035	29.0 ± 3.8982

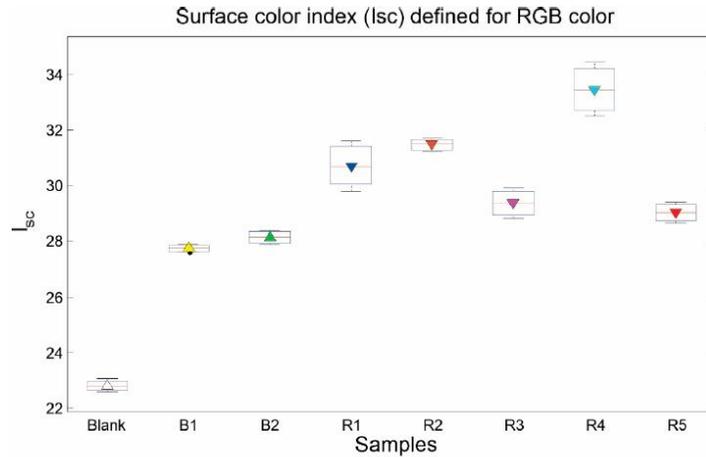


Figure 7. Surface color index (I_{sc}) of analyzed samples.

4. Discussion

Seven different kinds of Tequila and one sample of distilled water as blank were tested with the EE device. Once all sample images were acquired as Section 2.5 described, the ROI of the different samples was decomposed in its RGB components and the number of pixels were associated with the RGB level intensities.

The horizontal axis is divided into three imaginary zones, where the RGB histogram is plotted at the core; if the histogram is shifted to the left side in the horizontal axis provides information about the shadows in the image. The central zone represents the areas of medium luminosity, and the histogram shifted to the right side indicates the light areas at 100%. Figure 5 shows the blank sample's histogram, where the three components have an approximate value of 255; these data allow to identify full luminosity in the EE system.

From the matrix 50×21 , the values of the RGB components obtained were proceeded to calculate the I_{sc} . The I_{sc} value obtained allows validating the proposed methodology's capacity by showing the possibility of discriminating different samples based on their magnitude. In this way, it was to distinguish between Blanco and Reposado Tequila samples by their color variation. Mathematically, I_{sc} value is represented as the ratio of the quotient between a factor and the root of the sum of the image's RGB components.

Although the discrimination of the main groups of tequilas can be carried out based on the values of absorbance or the Surface Color Index, the results encourage carrying out individual discrimination of samples using some artificial intelligence tools such as artificial neural networks (ANN) or support vector machines (SVM). Both models could be fed with the color parameters obtained in order to build simple classifiers with two input parameters with linear/non-linear mapping to the output. Future experimental stages should be considered to increase the number of analyzed to strengthen the classification process and take advantage of these models' generalization capability.

5. Conclusions

The absorbance values and the Surface Color Index were employed as quantitative color characteristics based on the RGB model, used to describe the variations of color in the sample. The quantitative color characteristics based on image analysis show sensibility to detect coloration changes from apparently homogeneous samples. The results suggest that image analysis employing quantitative color characteristics can identify Blanco and Reposado Tequila samples. Finally, the

absorbance and the Surface Color Index show a linear trend; in the absence of color, the value of absorbance and I_{sc} is minimal and increases for colored samples. Using the developed EE, it was possible to differentiate between the two kinds of Tequila samples with a portable and low-cost system.

Author Contributions: All the authors contributed equally to this work.

Acknowledgments: Authors would like to express their gratitude to the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT) for the financial support and Ph.D. fellowship for Anais Gomez.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Consejo Regulador del Tequila. Available online: <https://www.crt.org.mx/index.php/en/pages-2/proteccion-del-tequila-a-nivel-internacional> (accessed on 12 October 2020).
2. Norma Oficial Mexicana. In *NOM-006-SCFI-2012*; 2012. Available online: https://www.google.com.hk/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjNitD-05rtAhXSIqYKHfFKD_IQFjAAegQIBBAC&url=http%3A%2F%2Fwww.dof.gob.mx%2Fnota_detalle.php%3Fcodigo%3D5282165&usg=AOvVaw3bdv7Gsvb4Wt2Fm0dxYk5x (accessed on 2 November 2020).
3. Electronic Code of Federal Regulations. In *Title 27, 5.22(g) Class 7; Agave Spirits*; 1973. Available online: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr;sid=79589a2ef2d093ed0b73152fc7935f1b;rgn=div5;view=text;node=27%3A1.0.1.1.2;idno=27;cc=ecfr> (accessed on 2 November 2020).
4. Council of the European Union. *Agreement between the European Community and the United Mexican States on the Mutual Recognition and Protection of Designations for Spirit Drinks*; Council of the European Union: Brussels, Belgium, 1997.
5. Villanueva-Rodríguez, S.J.; Rodríguez-Garay, B.; Prado-Ramírez, R.; Gschaedler, A. Tequila: Raw Material, Classification, Process, and Quality Parameters. In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2016; pp. 283–289, doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00688-7.
6. Prado-Jaramillo, N.; Estarrón-Espinosa, M.; Escalona-Buendía, H.; Cosío-Ramírez, R.; Martín-del-Campo, S.T. Volatile compounds generation during different stages of the Tequila production process. A preliminary study. *LWT* **2015**, *61*, 471–483, doi:10.1016/j.lwt.2014.11.042.
7. Wu, D.; Sun, D.-W. Colour measurements by computer vision for food quality control—A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *29*, 5–20, doi:10.1016/j.tifs.2012.08.004.
8. Gomes, J.F.S.; Leta, F.R. Applications of computer vision techniques in the agriculture and food industry: A review. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 989–1000, doi:10.1007/s00217-012-1844-2.
9. Orlandi, G.; Calvini, R.; Piganì, L.; Foca, G.; Vasile Simone, G.; Antonelli, A.; Ulrici, A. Electronic eye for the prediction of parameters related to grape ripening. *Talanta* **2018**, *186*, 381–388, doi:10.1016/j.talanta.2018.04.076.
10. Orlandi, G.; Calvini, R.; Foca, G.; Ulrici, A. Automated quantification of defective maize kernels by means of Multivariate Image Analysis. *Food Control* **2018**, *85*, 259–268, doi:10.1016/j.foodcont.2017.10.008.
11. Wu, D.; Sun, D.W. Food colour measurement using computer vision. In *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality*; Kilcast, D., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2013; pp. 165e–195e, doi:10.1533/9780857098856.2.165.
12. Jia, J.; Wu, M.; Wang, S.; Wang, X.; Hu, Y.; Chen, H.; Yu, Y.; Shen, C.; Fu, H.; She, Y. Colorimetric sensor array based on silver deposition of gold nanorods for discrimination of Chinese white spirits. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *320*, 128256, doi:10.1016/j.snb.2020.128256.
13. Pessoa, K.D.; Suarez, W.T.; dos Reis, M.F.; de Oliveira Krambeck Franco, M.; Moreira, R.P.L.; dos Santos, V.B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *185*, 310–316, doi:10.1016/j.saa.2017.05.072.
14. Fu, L.; Duan, J.; Zou, X.; Liu, G.; Song, S.; Ji, B.; Yang, Z. Banana detection based on color and texture features in the natural environment. *Comput. Electron. Agric.* **2019**, *167*, 105057, doi:10.1016/j.compag.2019.105057.

15. Fan, S.; Li, J.; Zhang, Y.; Tian, X.; Wang, Q.; He, X.; Zhang, C.; Huang, W. On line detection of defective apples using computer vision system combined with deep learning methods. *J. Food Eng.* **2020**, *286*, 110102, doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110102.
16. Bhargava, A.; Bansal, A. Fruits and vegetables quality evaluation using computer vision: A review. *J. King Saud Univ. Comp. Inf. Sci.* **2018**, doi:10.1016/j.jksuci.2018.06.002.
17. Zhao, Y.; Gong, L.; Zhou, B.; Huang, Y.; Liu, C. Detecting tomatoes in greenhouse scenes by combining AdaBoost classifier and colour analysis. *Biosyst. Eng.* **2016**, *148*, 127–137, doi:10.1016/j.biosystemseng.2016.05.001.
18. Wang, W.; Li, C. A multimodal machine vision system for quality inspection of onions. *J. Food Eng.* **2015**, *166*, 291–301, doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.06.027.
19. Chen, S.; Xiong, J.; Guo, W.; Bu, R.; Zheng, Z.; Chen, Y.; Yang, Z.; Lin, R. Colored rice quality inspection system using machine vision. *J. Cereal Sci.* **2019**, *88*, 87–95, doi:10.1016/j.jcs.2019.05.010.
20. Mebatsion, H.K.; Paliwal, J.; Jayas, D.S. Automatic classification of non-touching cereal grains in digital images using limited morphological and color features. *Comput. Electron. Agric.* **2013**, *90*, 99–105, doi:10.1016/j.compag.2012.09.007.
21. Tomasevic, I.; Tomovic, V.; Milovanovic, B.; Lorenzo, J.; Đorđević, V.; Karabasil, N.; Djekic, I. Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties. *Meat Sci.* **2019**, *148*, 5–12, doi:10.1016/j.meatsci.2018.09.015.
22. Trinderup, C.H.; Dahl, A.; Jensen, K.; Carstensen, J.M.; Conradsen, K. Comparison of a multispectral vision system and a colorimeter for the assessment of meat color. *Meat Sci.* **2015**, *102*, 1–7, doi:10.1016/j.meatsci.2014.11.012.
23. Dowlati, M.; Mohtasebi, S.S.; Omid, M.; Razavi, S.H.; Jamzad, M.; De La Guardia, M. Freshness assessment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by machine vision based on gill and eye color changes. *J. Food Eng.* **2013**, *119*, 277–287, doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.023.
24. Balaban, M.Ö.; Alçiçek, Z. Use of polarized light in image analysis: Application to the analysis of fish eye color during storage. *LWT* **2015**, *60*, 365–371, doi:10.1016/j.lwt.2014.09.046.
25. Balaban, M.O.; Misimi, E.; Ayyvaz, Z. Quality Evaluation of Seafoods. In *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 243–270, doi:10.1016/B978-0-12-802232-0.00010-4.
26. Leme, D.S.; da Silva, S.A.; Barbosa, B.H.G.; Borém, F.M.; Pereira, R.G.F.A. Recognition of coffee roasting degree using a computer vision system. *Comput. Electron. Agric.* **2019**, *156*, 312–317, doi:10.1016/j.compag.2018.11.029.
27. Rodríguez, J.P.; Corrales, D.C.; Aubertot, J.N.; Corrales, J.C. A computer vision system for automatic cherry beans detection on coffee trees. *Pattern Recognit. Lett.* **2020**, *136*, 142–153, doi:10.1016/j.patrec.2020.05.034.
28. Huang, F.; Qi, Y.; Wang, C.; Wan, X. Show me the color in your mind: A study of color-flavor associations in virtual reality. *Food Qual. Prefer.* **2020**, *85*, 103969, doi:10.1016/j.foodqual.2020.103969.
29. Jiang, H.; Xu, W.; Chen, Q. Determination of tea polyphenols in green tea by homemade color sensitive sensor combined with multivariate analysis. *Food Chem.* **2020**, *319*, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126584.
30. Buratti, S.; Malegori, C.; Benedetti, S.; Oliveri, P.; Giovanelli, G. E-nose, e-tongue and e-eye for edible olive oil characterization and shelf life assessment: A powerful data fusion approach. *Talanta* **2018**, *182*, 131–141, doi:10.1016/j.talanta.2018.01.096.
31. Apetrei, C.; Apetrei, I.M.; Villanueva, S.; de Saja, J.A.; Gutierrez-Rosales, F.; Rodriguez-Mendez, M.L. Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *663*, 91–97, doi:10.1016/j.aca.2010.01.034.
32. Spence, C. On the changing colour of food & drink. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2019**, *17*, doi:10.1016/j.ijgfs.2019.100161.
33. Mendoza, F.; Dejmek, P.; Aguilera, J.M. Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biol. Technol.* **2006**, *41*, 285–295, doi:10.1016/j.postharvbio.2006.04.004.
34. Xu, C. Electronic eye for food sensory evaluation. In *Evaluation Technologies for Food Quality*; Zhong, J., Wang, X., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2019; pp. 37–59, doi:10.1016/B978-0-12-814217-2.00004-4.
35. Martínez-Hipatl, C.; Muñoz-Aguirre, S.; Muñoz-Guerrero, R.; Castillo-Mixcóatl, J.; Beltrán-Pérez, G.; Gutiérrez-Salgado, J.M. Optical system based on a CCD camera for ethanol detection. *Meas. Sci. Technol.* **2013**, *24*, 105003, doi:10.1088/0957-0233/24/10/105003.

36. Capitán-Vallvey, L.F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M.M.; Palma, A.J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *899*, 23–56, doi:10.1016/j.aca.2015.10.009.
37. Ware, C. Chapter Four—Color. In *Information Visualization*, 4th ed.; Ware, C., Ed.; Morgan Kaufmann: Burlington, MA, USA, 2021; pp. 95–141, doi:10.1016/B978-0-12-812875-6.00004-9.
38. Bueno, D.; Valdez, L.F.; Gutiérrez Salgado, J.M.; Marty, J.L.; Muñoz, R. Colorimetric Analysis of Ochratoxin A in Beverage Samples. *Sensors* **2016**, *16*, 1888, doi:10.3390/s16111888.
39. Gomez, A.I.; Gutiérrez, J.M.; Muñoz, R. Design of an optical portable system for detection of pH. In Proceedings of the 2018 Global Medical Engineering Physics Exchanges/Pan American Health Care Exchanges (GMEPE/PAHCE), Porto, Portugal, 19–24 March 2018; pp. 1–6.
40. Anh Bui, D.; Hauser, P.C. Absorbance measurements with light-emitting diodes as sources: Silicon photodiodes or light-emitting diodes as detectors? *Talanta* **2013**, *116*, 1073–1078, doi:10.1016/j.talanta.2013.08.007.
41. O’Toole, M.; Diamond, D. Absorbance based light emitting diode optical sensors and sensing devices. *Sensors* **2008**, *8*, 2453–2479, doi:10.3390/s8042453.
42. Palencia, M.; Lerma, T.; Palencia, V. Description of fouling, surface changes and heterogeneity of membranes by color-based digital image analysis. *J. Membr. Sci.* **2016**, *510*, 229–237, doi:10.1016/j.memsci.2016.02.057.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Design of an Optical Portable System for Detection of pH

A.I. Gomez, J. M. Gutiérrez, R. Muñoz

CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

Bioelectronics Section, Department of Electrical Engineering, CINVESTAV, 07360 Mexico City, Mexico

Email: arochag@cinvestav.mx, mgutierrez@cinvestav.mx, rmuñoz@cinvestav.mx

Abstract — The objective of this work is to present an ongoing research related to the development of a portable optical system based on LED technology and the use of colorimetric indicators as a contrast medium for the optical detection of pH in liquid samples based on absorbance detection. The first developed prototype had 6 channels: one for each LED in duplicate, which allowed a comparison of a reference solution and another one in which the pH will be determined. The designed instrumentation uses an integrated circuit of high sensitivity to light as a detector, six LED light sources and an Arduino microcontroller. The absorbance signals obtained are processed off-line in a PC using an artificial neural network programmed in MATLAB® environment.

The pH values determined by the designed system were compared with a commercial pH meter obtaining quadratic mean errors lower than 0.056, which indicates the accuracy of the system. This device only needs 112.5 μL of sample to make a measure making it a good alternative when the amount of sample is limited or for liquid biological samples.

Keywords — Absorbance, LED, Optical, pH

I. INTRODUCTION

The determination of pH is one of the most important analytical procedures and is used in many science fields such as chemistry and biochemistry. The pH measures the degree of acidity or alkalinity of a solution generally in liquid state. Specifically, the pH is the measure of the concentration of hydrogen ions (H^+) [5].

Many of the biochemical processes have problems mainly related to small changes in the hydrogen ion concentrations. In this sense, it is necessary to stabilize their hydrogen concentration by adding a suitable buffer. A buffer solution or buffered solution are those substances that have the particularity that when added to water generate a system that before the addition of acids or alkalis, its pH value is modified very little. [6].

Different measure methods for pH determination have been proposed until now. Maybe, the most widespread method for measuring pH in an aqueous solution is the electrochemical. Nevertheless, there are alternative methods, such as test strips and colorimetry techniques[7]. However, these processes have disadvantages that must be considered during the measurement procedure.

Optical methodologies have arisen within these measurement alternatives, there are some designs proposed in recent years: Systems based in absorbance measurement some for the optical pH detection [4, 8-10] and others for pesticides studies[11, 12], colorimetric systems [2], systems based in that use of light-emitting diodes (LED) of low energy consumption and reduced dimensions[3, 4, 13, 14] and spectrophotometric measurement systems for seawater pH detection employing an indicator dye[1, 15, 16]. The basic architecture of the spectrophotometric system can be seen by analyzing all of them.

Each design begins with a light source that traverses a system of lenses, mirrors and openings that focuses the radiation beam on a monochromator that separates into narrow strips of different wavelengths and only one falls on a transparent cell containing the sample. The signal is detected by the sensor for its conditioning and acquisition by a “controller”. This “controller” obtains the absorbance signals and analyzes them to display a result. Each design has different ways to obtain the absorbance measures.

The most popular devices use highly specific sensors and sophisticated equipment, like the ones used by the analytical methods, although they have low detection limits they are expensive, take a long time to deliver the result, the equipment is difficult to transport, use a considerable amount of sample and are application specific.

The aim of this work is to present an ongoing research related to the development of a portable optical system based on LED and the use of colorimetric indicators as a contrast medium for the optical detection of pH in liquid samples of reduced volumes using absorbance detection.

II. METHODOLOGY

A. Design Characteristics

It was established that the pH detection system design must have the following characteristics: portable, able to be operated as a PC peripheral, being controlled by a development control card, operate with LEDs as light source instead of using a white light and a wavelength selector, six LED control channels and a photodetector for each of them. The main block diagram of the device is shown in Fig. 1

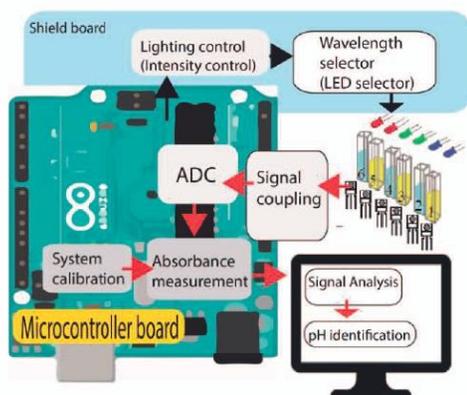


Fig. 1. Optical meter pH block-diagram (black-arrow desired light beam, blue-arrow electronic control)

B. Materials and methods

A box containing the instrumentation was constructed to isolate itself from external light, for this a black acrylic 5 mm plastic sheet (Avance y Tecnologia en plásticos, Plastiglas®) was used. Disposable plastic cuvettes (Brand, UV-cuvettes) were used for the samples containers and they must be free of dust and dirt to obtain a valid signal. The filling volume of the cuvettes has a range of 1.5 mL to 3.0 mL, with external dimensions of 4.5 mm x 23 mm.

Wavelength Selector-This module allows to select which wavelength will affect and excite the sample. Use three different light-emitting diodes: Blue LED with a wavelength (λ) of 472 nm; (Mod. LTL2R3TBV3KS-032), green of $\lambda=532$ nm, (Mod. LTL2R3TGY3KS-032A) and finally red $\lambda=638$ nm, (Mod. LTL-4268-H3/4268-H4), all of them purchased from Lite On Electronics Inc.

Signal coupling- The signal delivered by the detector is conditioned to be sent to the recording system. The detector module consists of a silicon photodiode and a CMOS transimpedance amplifier embedded in the same circuit that responds and converts light to a voltage (Mod.TSL254).

Lighting Control- To maintain the constant current of the LED, a current regulator 6-channel high voltage (National Semiconductor, Mod. LM3432) is available and can be adjusted by an external resistor. The equation to calculate the external resistance is shown below:

$$R_i = 1.097 / I_{out} \text{ (k}\Omega\text{)} \quad (1)$$

It consists of six channels with chain programming and is adjusted to 20 mA by $R_i=54.7$ k Ω .

Six relays (AXICOM, Mod. P2-V23079-D1001) were required for the output of the LM3432 channels and operate for the wavelength selector.

Microcontroller- During each measurement, the three pairs LED are activated alternately, and the signals obtained from each LED are sent to the ADC microcontroller, thus is responsible for acquiring the absorbance signals and compare them. A 16 MHz open-source Arduino® Mega 2560 microcontroller which 256 kB of flash memory, 8 kB RAM, and 4 kB EEPROM, is used for controlling and data processing.

Absorbance measurement method-As light passes through the sample, some of the light is absorbed[10]. Considering this definition, the response of the system can be modeled as shown in (2) where A_i is the absorbance governed by the Lambert-Bee law[10], where I_0 is the intensity incident on the solution, I_1 is the intensity that comes out of the solution, λ is the wavelength of the applied light, C is the concentration of the absorbent sample (moles. l⁻¹), b is the optical path (thickness of the cell) and ϵ is the molar absorptivity coefficient.

$$A_i = -\text{Log}(I_1 / I_0) = \epsilon b C \quad (2)$$

This law expresses the proportional relationship in between the absorbance and the concentration of certain compounds. This formula was implemented in the microcontroller so that the measured optical absorbance is subsequently displayed on a personal computer through an interface designed in the MATLAB® 2011a environment (MathWorks, Natick, MA).

System Calibration- When a beam of light passes through a cuvette of transparent material containing the solution with the analyte, the intensity of that light will be absorbed, where one part will be reflected, and another part will be transmitted. Considering the above, a comparison is made of the transmitted intensity of the solvent, which is the standard sample containing only bi-distilled water (blank) and the intensity of the sample prepared, resulting in the calibration of the system and the obtaining of the experimental absorbance and its shown as:

$$A_{\text{experimental}} = -\text{Log}(I_{\text{solvent}} / I_{\text{analyte solution}}) \quad (3)$$

Signal analysis-The communication between the computer and the Arduino system is done through serial communication with MATLAB® 2011a. Each database will be processed through some routines developed in this programming platform based on mathematical models such as Principal component analysis PCA and Artificial neural networks ANNs.

Samples Preparation for system training- A set of samples will be elaborated to train our device by mixing different pH buffer solutions ranging from 1 to 13 with 8 colorimetric indicators. Table I shows which indicators were used for the experiment. All the reagents are of analytical grade from Sigma Aldrich Co. A total of 312 standard samples are available, shown in Fig. 2, are available to be analyzed by LED light.

TABLE I
COLORIMETRIC INDICATOR SOLUTIONS

Indicator	Molecular formula	Label
1 Phenol red	$C_{19}H_{14}O_7S$	RF
2 Phenolphthalein	$C_{20}H_{14}O_4$	PT
3 Methyl orange	$C_{14}H_{14}N_3O_3Na$	MO
4 Indigo Carmine	$C_{16}H_8N_2Na_3O_7S_2$	IC
5 Bromocresol Green / Methyl Red	$CH_3 CH_2OH$	BGMR
6 Bromocresol green	$C_{21}H_{13}Br_4NaO_7S$	BG
7 Bromocresol purple	$C_{21}H_{13}Br_4NaO_7S$	BP
8 Bromothymol blue	$C_{27}H_{28}Br_2O_7S$	BB



Fig. 2. Samples of pH with Colorimetrics Indicators

The system can be powered by 5V DC from a standard USB port and the shield-arduino built card needs 8V DC to activate the LM3432 driver. Furthermore, this has a mini USB charging system (Microchip, Mod.MCP73831) for 4 Li-Po batteries of 3.7V at 2500 mA ideal for arduino and the driver voltages. The duration of the battery in the continuous operation of the instrument is approximately 13 hours.

Experimental System Validation- The measurements will be compared with a commercial pH meter (Metrohm, Mod. 826 pH mobile) and with the use of pH test strips (CRISA pH-Fix 0-14, Mod. 053450). All the experiments will be carried out at room temperature. The temperature of the optical system will be obtained using a mercury thermometer (Brannan, Mod.76mm).

C. Construction and characterization.

The developed system has 6 channels; one for each LED by duplicate, allowing a comparison of the reference sample (blank) and one in which the pH is determined (based on a pH buffer solution and a colorimetric indicator).

The assembled optical pH meter is shown in Fig.3, it shows: the closed chassis, the open chassis, the shield card mounted with MegaArduino that controls the sending of signals to a PC, the distribution and mounting of the six

channels for the UV cuvettes and wavelength operation and finally a shield MegaArduino card built, which includes the LM3432 driver, the light selector relays and its charging system. The dimensions of the final chassis are 32 cm x 10.5 cm x 22 cm.



Fig. 3. Assembled pH meter: a-Closed chassis, b-Open chassis,c-shield assembled with MegaArduino, d-Cell distribution and operation of the light sources, e-shieldArduino card.

The characterization of the photodiode TSL254 was made. Showing the output voltage is directly proportional to the intensity of the light (irradiance) and the irradiance is controlled by the work cycle of the control signal delivered to the LED current driver. Fig. 4 shows the sensor voltage as function of the LED current driver work cycle.

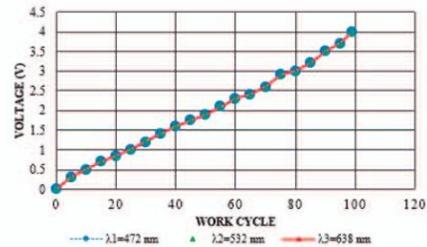


Fig. 4 TSL254r Characterization: Voltage (v) vs Work Cycle

The calibration curve of the driver LM3432 for each LED in the system is shown in Fig. 5

D. Operation protocol

To begin using the pH meter, some preparation steps are necessary. First, the samples need to be prepared with 25 mL of a colorimetric indicator and 625 μ L of the sample (acetate buffer solution for the training experiment).

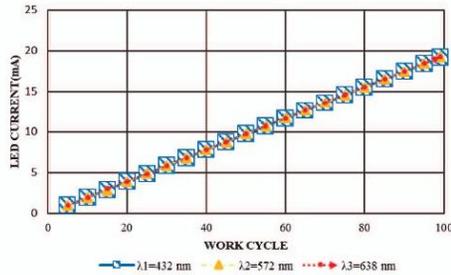


Fig. 5 LM3432 Characterization: Current I(mA)vs Control signal Work Cycle

Three UV cuvettes are filled with 1.5 ml of this mix and other three with 1.5 mL of a blank sample (bi-distilled water). Then, the cuvettes are placed in the corresponding channels to perform the calibration of the system. The chassis must be completely closed when the signals are acquired. The generated signals are recorded with a sampling frequency of 50 samples/s and the average value of 50 measures is obtained. The obtained value is used to calculate the absorbance with equations (2) and (3) for each wavelength and the data is sent to the ANN to get the pH value of the sample.

E. Experimental design

For the training experimental 10 repetitions of the previously described protocol were made using 8 different colorimetric indicators and samples ranging from 1 to 13 pH with 1 pH step. The obtained data base dimensions are organized on an 80x13x3 matrix.

III. RESULTS

Doing a preliminary PCA analysis and reviewing its response, we used only certain dyes, which are: phenol red, bromocresol green with methyl red, bromocresol purple, bromocresol blue, indigo carmine and phenolphthalein.

Twelve models were proposed where the different colorimetric indicators are combined with the full range of pH values (1-13). Table II shows the models built for each wavelength.

To obtain a model to relate the absorbance measurements in the samples with their pH value, an ANN model was constructed. To evaluate the predictive capacity of the constructed models, a cross-validation technique k-fold ($k = 4$) was used, choosing a test set randomly from the set of totals of the data (130 samples).

TABLE II
COMBINATORY MODELS

MOD	$\lambda_1=432$ nm	$\lambda_2=572$ nm	$\lambda_3=638$ nm
A	RF-BGMR-BP-BB		
B	BGMR-BP-BB		
C		RF-IC-PT	
D		RF	BGMR
E	BGMR	RF	
F	BGMR		RF-BB
G	BB	PT	IC-PT
H	BB-BP	RF	BGMR
I	RF	RF	BGMR
J	BP	BB	BGMR
K		RF	BP-BGMR
L	BGMR	RF	BP

The ANN model was trained using 66.9% of the data (87 samples) and the remaining 33.1% (43 samples) to evaluate the performance of the model.

The architecture of this model has a total of 15 neurons in the hidden layer. The transfer function used in the input layer and hidden was Tangent Sigmoidal (tansig), while the output layer used a linear function (purelin). The number of input layers depends on the number of indicators used for each model. They were compared with other functions: step, linear, ramp, exponential, gaussian but none of the combinations had a better performance. This make sense because the input data have a non-linear relation with the desired output (Absorbance-pH)

For the training phase Levenberg-Marquardt algorithm(LMA) was chosen, establishing a training error of 0.2 and a learning rate of 0.0001.

The LMA was used because the absorbance signals for each colorimetric indicator have a non-linear response for the full range of pH values, due to this, it was necessary to solve this pH prediction with a curve adjustment for non-linear data and this algorithm is mainly used to solve generic problems of curve fitting.

The graphs were constructed comparing the predicted versus expected pH content to verify the predictive capacity of the ANN. See Fig. 6. Is possible to compare the results obtained and observe they are close to the ideal values, with intersections close to 0 and slopes and correlation coefficients around 1, which means that there is stability in the response of the model are obtained from the k-fold process used, so that the constructed models are considered acceptable.

Table III shows the performance obtained from all the models proposed for the training and test phase, where the values of the slope m and the intersection b define the comparative line ($y = mx + b$) that best fits the data (in a 95% confidence interval). With this table we can deduce that the G model had better response compared to the others, both for the training and testing.

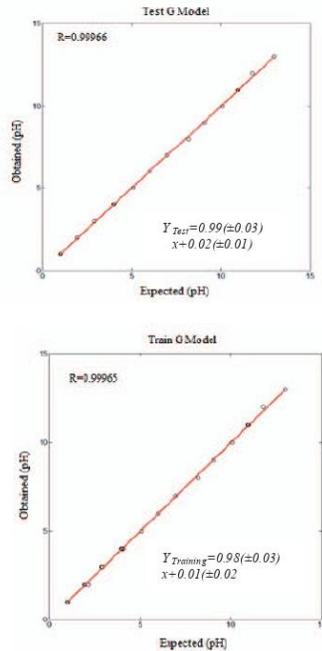


Fig. 6 Modelling ability of the optimized ANN (A) Training and (B) External Test, using Mod. G.

TABLE III
PARAMETERS OF THE LINEAR REGRESSION OF MODELS A-L

Mod.	TRAIN			TEST		
	R	m	B	R	m	B
A	0.9944	0.95±0.08	0.20±0.04	0.9973	0.95±0.07	0.20±0.04
B	0.9937	0.95±0.08	1.04±0.04	0.9952	0.98±0.08	0.14±0.40
C	0.9989	0.98±0.04	0.20±0.02	0.9989	0.95±0.04	0.19±0.02
D	0.9920	0.94±0.10	0.05±0.05	0.9931	0.94±0.12	0.12±0.06
E	0.9930	0.94±0.10	0.04±0.05	0.9937	0.94±0.10	0.18±0.05
F	0.9933	0.95±0.10	0.01±0.05	0.9920	0.96±0.10	0.03±0.05
G	0.9997	0.98±0.03	0.01±0.02	0.9997	0.99±0.03	0.02±0.01
H	0.9929	0.94±0.10	0.03±0.05	0.9923	0.95±0.03	0.05±0.05
I	0.9930	0.94±0.10	0.05±0.05	0.9952	0.96±0.09	0.02±0.05
J	0.9953	0.96±0.10	0.10±0.03	0.9952	0.96±0.06	0.08±0.03
K	0.9929	0.94±0.10	0.04±0.05	0.9948	0.96±0.08	0.07±0.04
L	0.9929	0.95±0.08	0.03±0.04	0.9933	0.95±0.09	0.03±0.04

Mean squared errors (MSE) were calculated from the measurements. In the case of measurements of commercial pH meters, the pH values were obtained by measuring each colorimetric sample separately.

Fig. 7, shows the pH commercial and optical errors and has the G model has the best response compared to the others, in other words, the smallest MSE for the optical system was 0.0554 using the G model and the largest was

0.2376 using the D model, also, for the electrochemical system a MSE of 0.0116 was obtained for the smallest and 0.4608 for the greatest. The G model is composed of 3 indicators: Bromocresol Blue, Phenolphthalein and Indigo Carmine and the 3 available LEDs.

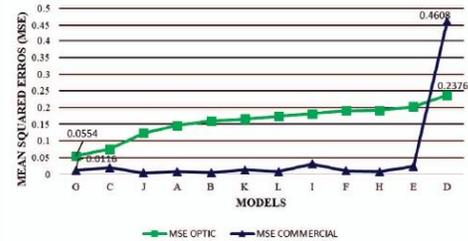


Fig. 7 Comparative MSE of the commercial system and system designed

IV. DISCUSSION

Based on the calibration, this device the 6-channel design with LED technology provided quality pH measurements over the range of $1 \leq \text{pH} \leq 13$, to determine 6 colorimetric indicators, using three wavelengths, 472 nm, 532 nm and 638 nm. These results demonstrate that LED photometers can be conveniently and routinely used to perform pH measurements on colorimetric indicators and that these measurements will be very similar to those obtained with commercial pH meters.

Table IV summarizes the characteristics of several types of pH sensors, including the new LED photometer. Comparing with other designed systems, the constructed pH-meter, uses two small optical sensors that allows the test to be carried out with a maximum absorption volume of 1.5 mL. The opening angle of the sensor is 0 to 80 degrees for a normalized output voltage from 0 to 1. To avoid an interference between the light and the angle, the blank sample and the standard one, each one had a separate sensor. On the contrary on Bo Yang's work, the system was adapted with a single optical sensor to obtain the measurements based on the incident angles, however not all the light was captured by the sensor using a sample volume of 10 mL.

The absorbance signals of the optical pH meter have a non-linear nature, consequently, a neural network with specific training properties was constructed to predict the pH value of the solutions. Photometer construction is straightforward. All components are readily available off the shelf and their assembly requires only a moderate level of do it yourself technical expertise.

The measurements made with the built system and those obtained with a commercial pH meter were compared. To sum up this device is recent considering previous works, to

TABLE IV
Specifications of instruments used for pH measurements.

Attribute ^s	Instrument				
	pH optic	Bo Yang et al.[1].	Hai-xu Chen et al.[2]	Tai-Sheng Yeh et al.[3]	Dylan Orpen et al.[4]
Detection System	Photometry	Spectrometry / Photometry	Colorimetric	Spectrometry	Colorimetric
Samples	Buffer solution (1-13)	Liquids (seawater)	Liquids (mineral water, pure, rain, white vinegar, acid effluent)	Commercial buffer solution	Buffer solution
Colorimetric Indicator Used	BB, PT, IC, RF, BP, BGMR	Purple meta-cresol	Carboxyfluorescein	BP, BG, RF, and Thymol Blue	BG
Sample Volume	1.5 mL	10 mL	pH sensitive film (TEOS)	2 mL	3 mL
Light Source	3 LED (472 nm, 532 nm, 638 nm)	2 LED (427 nm, 574 nm)	2 LED (660 nm, 465 nm)	7 LEDs (389 nm, 407 nm, 462 nm, 527 nm, 572 nm, 587 nm, 620 nm)	1 LED (20 nm)
Operation Range	1≤pH≤13	7.6≤pH≤8.2 30≤S≤36.2 15°C≤t≤30°C	1≤pH≤7 5°C≤t≤60°C	Only determines absorbance Does not deliver pH	2.0≤pH≤7.0
Sensor	2 Photodiode (light-to-voltage optical convert)	1 Photodiode (light-to-voltage optical converter)	1 Photodiode	CCD	LDR (Light-Dependent Resistor)

use different more of four colorimetric indicators with buffer solutions pH range.

V. CONCLUSION

The preliminary analysis was useful to select which colorimetric indicators worked better for each LED light, because an information overlap was observed between certain dyes; this helped to eliminate the need of training every combination on a ANN.

According to the results obtained, the current version of the optical system has an error of 0.0553 in pH scale with the G model, which can be considered as acceptable, considering that the error of the commercial pH meter (with electrochemical determination) is 0.0116 pH for the same set of samples. But if it compares the volume of sample needed to make the analysis it device only needs 112.5 μL of the sample and 1.5 mL of Bromocresol Blue, 1.5 mL of Phenolphthalein and 1.5 mL of Indigo Carmine indicators and 4.5 mL of bi-distilled water making it a better choice when the volume of sample is limited for example some biological samples or expensive reagents.

Finally, the objective of this work was to detect the pH in buffer solutions using different dyes and satisfactory results were obtained. However, there are some

recommendations for further work, such as further evaluation of the processing techniques, making pH tests on organic solutions with a certain degree of turbidity, system modifications where only white light is used and the design of a monochromator to select the desired wavelength and lastly add temperature sensors.

ACKNOWLEDGMENT

Anais Gomez would like to thanks to CONACYT for the doctoral fellowship.

REFERENCES

- [1] M. C. P. Bo Yang, Robert H. Byrne, Jian Ma, "Seawater pH measurements in the field: A DIY photometer with 0.01 unit pH accuracy," *Marine Chemistry*, vol. 160, pp. 75-81, March 2014.
- [2] X.-d. W. Hai-xu Chena, Xin-hong Songa, Ting-yao Zhoua, Ya-qi Jianga, Xi Chen "Colorimetric optical pH sensor production using a dual-color system," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 146, pp. 278-282, 2010.
- [3] T.-S. Y. a. a. S.-S. Tseng, "A Low Cost LED Based Spectrometer," *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 53, pp. 1067-1072, 2006.
- [4] S. B. Dylan Orpen, Comac Fay, King Tong Lau, Brian Corcoran, Dermot Diamond, "The optimisation of a paired emitter-detector diode optical pH sensing device," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 153, pp. 182-187, 2011.
- [5] H. C. H. L. GmbH, "What is pH and how is it measured?," 2018.
- [6] *Biological Buffers Available*:: AppliChem, 2008.
- [7] G. G. Sosa, "Indicadores de pH," F. d. Quimica, Ed., ed. UNAM, 2010.
- [8] S. E. Veras G, Silva Lyra W, Soares SF, Guerreiro TB, Santos SR., "A portable, inexpensive and microcontrolled spectrophotometer based on white LED as light source and CD media as diffraction grid," *Talanta*, vol. 3, pp. 1155-1159, 2009.
- [9] F. V. Mar Puyol, Carlos Dominguez, Víctor Cadarso, Andreu Llobera, Iñigo Salinas, Ignacio Garcés, Julián Alonso, "Absorbance-Based Integrated Optical Sensors," in *Springer Ser Chem Sens Biosens*, Springer-Verlag, Ed., ed Berlin Heidelberg: 3, 2005, pp. 1-44.
- [10] T. A. Dorota Wencel, and Colette McDonagh, "Optical Chemical pH Sensors," *American Chemical Society*, vol. 86, pp. 15-29, 2013.
- [11] A. G. B. Diana, R. Muñoz, J. L. Marty "Low-cost and portable absorbance measuring system to carbamate and organophosphate pesticides," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 203, pp. 81-88, 2014.
- [12] G. M. G. Leanne Marle, "Microfluidic devices for environmental monitoring," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 24, pp. 795-802, 2005.
- [13] H. S. B. Pumendu K. Dasgupta, Hanghui Liu, Jorge L., Lopez, Ellis L. Loree, Kavin Morris, Kaj Petersen, Kalam A. Mir, "Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors," *Talanta*, vol. 40, pp. Pages 53-74, 1993.
- [14] M. O. T. a. D. Diamond, "Absorbance Based Light Emitting Diode Optical Sensors and Sensing Devices," *Sensors*, vol. 8, pp. 2453-2479, 2008.
- [15] C. F. S. Afmann, and A. Körtzinger, "Spectrophotometric high-precision seawater pH determination for use in underway measuring systems," *Ocean Science*, vol. 7, pp. 597-607, 2011.
- [16] R. H. B. Hüning Zhang, "Spectrophotometric pH measurements of surface seawater at in-situ conditions: absorbance and protonation behavior of thymol blue," *Marine Chemistry*, vol. 52, pp. 17-25, 1996.

Difusión nacional



[\(https://conexion.cinvestav.mx/\)](https://conexion.cinvestav.mx/)

Publicaciones

Conexión Cinvestav (<https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/autor/conexion-cinvestav>)

/ martes, 13 de septiembre de 2022
/ Categorías: Boletín de prensa (<https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/category/boletin-de-prensa>), Zacateco (<https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/category/zacateco>), Ingeniería Eléctrica (<https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/category/ingenieria-electrica>)

Desarrollan ojo electrónico que podría servir para identificar tequila falso



(Portals/O/ EasyGalleryImages/L/5263/Juan-M-Gutiérrez-3Y.jpg)

El tequila es una bebida emblemática de México elaborada a partir del *Agave tequilana Weber* variedad azul, la cual no solo acompaña varias celebraciones, entre ellas la conmemoración de la Independencia, también es un producto que se comercializa en más de 120 países.

Actualmente solo cinco estados (Guanajuato, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas y Jalisco) cuentan con la Denominación de Origen, que protege legalmente a esta bebida alcohólica y garantiza tanto su calidad como la implementación de ciertos criterios de fabricación.

Aunque existen pruebas para evaluar la calidad de esta bebida, la mayoría requieren protocolos con un periodo de análisis prolongado, equipos costosos, personal calificado e instalaciones especiales. Ante este panorama, Juan Manuel Gutiérrez Salgado, adscrito al Departamento de Ingeniería

Eléctrica del Cinvestav, encabeza el desarrollo de un ojo electrónico capaz de categorizar diferentes muestras de tequila de acuerdo con su proceso de maduración en: blanco, reposado y añejo.

Este sistema bioinspirado se basa en una instrumentación portátil y de bajo costo que captura imágenes digitales de las muestras para identificar, a través de análisis matemáticos, sus componentes de color, que es uno de los aspectos importantes en la medición de la calidad de los alimentos y bebidas.

Los resultados, publicados en la revista *Biosensors*, señalan que el ojo electrónico logró una tasa de 90.02 por ciento al agrupar las imágenes de las muestras de tequila estudiadas en tres categorías: blanco, reposado y añejo.

En cuanto a los modelos computacionales utilizados para diferenciar y clasificar las muestras de tequila poseen una sensibilidad de 0.90 y una especificidad de 0.96, respecto de un puntaje ideal de 1.00.

"Estos datos indican que el sistema distingue de manera eficiente entre tipos de tequilas y los clasifica apropiadamente; también apuntan a que podría tener buen desempeño al analizar muestras más complejas, como tequilas mezclados o falsos", señaló Gutiérrez Salgado.

Las adulteraciones en esta bebida, por dilución, adición de alcohol, de sustancias prohibidas, mezclas con tequila de baja calidad, entre otras, están relacionadas a cambios en el color del producto, los cuales, aunque no sean perceptibles al ojo humano, pueden ser identificados a partir del análisis propuesto, agregó el investigador de la Sección de Bioelectrónica.

El ojo electrónico consiste en un sensor de imagen de 8 megapíxeles, una fuente de luz blanca y un soporte para el contenedor de la muestra, componentes ubicados dentro de una caja negra que evita la entrada de luz externa a fin de capturar imágenes de buena calidad. Además, el sistema cuenta con una computadora de placa reducida y una pantalla de cristal líquido.

Con las imágenes digitales de las muestras, los investigadores emplearon el modelo de color conocido como RGB para detectar las cantidades de píxeles rojos, verdes y azules presentes en ellas.

A partir del promedio de los componentes de color se evaluó la absorbancia experimental de la imagen, una medida de cómo se comporta la luz blanca cuando atraviesa la muestra estudiada, explicó el especialista del Cinvestav.

Así, utilizando un promedio de los valores de absorbancia para las muestras de cada categoría, fue posible identificar que cuando la intensidad en el tono del tequila es mayor, como en el caso del reposado (amarillento) y el añejo (ámbar), la absorbancia aumenta; contrario a lo sucedido con el tequila blanco que es incoloro.

Del mismo modo, se logró establecer una relación con los componentes RGB: las muestras de tequila blanco mostraron una prevalencia del rojo, verde y azul, en las de reposado predominan el rojo y el azul; en tanto en el añejo el azul está más presente.

En el estudio se evaluaron 25 muestras (8 de tipo blanco, 12 reposado y 5 añejo) de diferentes marcas de tequila con Denominación de Origen, elaborados con 100 por ciento agave, certificados por el Consejo Regulador del Tequila, para asegurar su autenticidad, y producidos en el estado de Jalisco.

El ojo electrónico capturó imágenes digitales de pequeños volúmenes de estas tequilas, mismas que fueron procesadas utilizando análisis de componentes principales y discriminante lineal para lograr la clasificación a partir de la información de color que brinda la imagen.

Por el momento, el sistema bioinspirado está en fase de refinamiento y los investigadores trabajan en un estudio para comparar los resultados obtenidos con un método analítico convencional, principalmente basado en la técnica de espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), empleado en la evaluación de la calidad del tequila.

Puedes consultar el artículo original en este enlace (<https://doi.org/10.3390/bios11030068>)

< Artículo anterior (<https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/ciencia-a-la-mexicana>)

Siguiente artículo >



437

Copyright 2022 Cinvestav | [Términos de uso](https://conexion.cinvestav.mx/terminos) | [Política de privacidad](https://conexion.cinvestav.mx/politica-de-privacidad) | [Inicio](https://conexion.cinvestav.mx/politica-de-privacidad) | [Inicio](https://conexion.cinvestav.mx/login?returnurl=%2FPublicaciones%2Fdesarrollan-ojo-electr243nico-gue-codr237a-servir-para-identificar-tequila-falso) | [Inicio](https://conexion.cinvestav.mx/login?returnurl=%2FPublicaciones%2Fdesarrollan-ojo-electr243nico-gue-codr237a-servir-para-identificar-tequila-falso)

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco,
Delegación Gustavo A. Madero, Ciudad de México, Código Postal 07360.
Apartado Postal: 14-740, 07000 Ciudad de México Tel: +52 (55) 5747 3800
Ver ubicación (<https://www.google.com.mx/maps/place/CINVESTAV+-+IPN/@19.5097643,-99.1324657,17z/data=!4m8!1m2!1m1!1scinvestav+zacatenco!3m4!1s0x85d1f77a076bd911:0x63af0ad86ca91f65!8m2!3d19.5099425!4d-99.129559>)



Enlaces

Participa (<https://participa.gob.mx>)
Publicaciones Oficiales (<https://www.gob.mx/publicaciones>)
Marco Jurídico (<http://www.ordenjuridico.gob.mx>)
Plataforma Nacional de Transparencia (<https://consultapublicamx.inai.org.mx/vut-web/>)
Alerta (<https://alertadores.funcionpublica.gob.mx/>)
Denuncia (<https://sided.funcionpublica.gob.mx/>)

¿Qué es gob.mx?

Es el portal único de trámites, información y participación ciudadana. Leer más (<https://www.gob.mx/que-es-gobmx>)
Portal de datos abiertos (<https://datos.gob.mx>)
Declaración de accesibilidad (<https://www.gob.mx/accesibilidad>)
Aviso de privacidad integral (<https://www.gob.mx/privacidadintegral>)
Aviso de privacidad simplificado (<https://www.gob.mx/privacidadsimplificado>)
Términos y Condiciones (<https://www.gob.mx/terminos>)
Política de seguridad (<https://www.gob.mx/terminos#medidas-seguridad-informacion>)
Mapa de sitio (<https://www.gob.mx/sitemap>)

Denuncia contra servidores públicos (<https://www.gob.mx/tramites/#ficha/presentacion-de-quejas-y-denuncias-en-la-sf-p/SFP54>)

Síguenos en

Viernes 04.11.2022 - 11:53



Academia

Nacional · Metrópoli · Mundo · Academia · Cultura · Opinión · Deportes ·

INGENIERÍA ELÉCTRICA

Desarrollan en el Cinvestav ojo electrónico para identificar tequila falso

- Las adulteraciones en esta bebida están relacionadas a cambios en el color del producto, los cuales pueden ser detectados con el sistema propuesto



El proyecto está encabezado por Juan Manuel Gutiérrez Salgado, adscrito al Departamento de Ingeniería Eléctrica del Cinvestav. Cinvestav



REDACCIÓN
13/09/2022 20:44 Actualizado a 13/09/2022 20:48

El tequila es una bebida emblemática de México elaborada a partir del Agave tequilana Weber variedad azul, la cual no solo acompaña varias celebraciones, entre ellas la conmemoración de la Independencia, también es un producto que se comercializa en más de 120 países.

Actualmente solo cinco estados (Guanajuato, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas y Jalisco) cuentan con la Denominación de Origen, que protege legalmente a esta bebida alcohólica y garantiza tanto su calidad como la implementación de ciertos criterios de fabricación.

Aunque existen pruebas para evaluar la calidad de

esta bebida, la mayoría requieren protocolos con un periodo de análisis prolongado, equipos costosos, personal calificado e instalaciones especiales. Ante este panorama, Juan Manuel Gutiérrez Salgado, adscrito al Departamento de Ingeniería Eléctrica del Cinvestav, encabeza el desarrollo de un ojo electrónico capaz de categorizar diferentes muestras de tequila de acuerdo con su proceso de maduración en: blanco, reposado y añejo.

Este sistema bioinspirado se basa en una instrumentación portátil y de bajo costo que captura imágenes digitales de las muestras para identificar, a través de análisis matemáticos, sus componentes de color, que es uno de los aspectos importantes en la medición de la calidad de los alimentos y bebidas.

Los resultados, publicados en la revista Biosensors, señalan que el ojo electrónico logró una tasa de 90.02 por ciento al agrupar las imágenes de las muestras de tequila estudiadas en tres categorías: blanco, reposado y añejo.

En cuanto a los modelos computacionales utilizados para diferenciar y clasificar las muestras de tequila poseen una sensibilidad de 0.90 y una especificidad de 0.96, respecto de un puntaje ideal de 1.00.

“Estos datos indican que el sistema distingue de manera eficiente entre tipos de tequilas y los clasifica apropiadamente; también apuntan a que podría tener buen desempeño al analizar muestras más complejas, como tequilas mezclados o falsos”, señaló Gutiérrez Salgado.

Lee también

“Psittacanthus auriculatus”, una historia con mezcal oaxaqueño

: JUAN FRANCISCO ORNELAS*

Las adulteraciones en esta bebida, por dilución, adición de alcohol, de sustancias prohibidas, mezclas con tequila de baja calidad, entre otras, están relacionadas a cambios en el color del producto, los cuales, aunque no sean perceptibles al ojo humano, pueden ser identificados a partir del análisis propuesto, agregó el investigador de la

Sección de Bioelectrónica.

El ojo electrónico consiste en un sensor de imagen de 8 megapíxeles, una fuente de luz blanca y un soporte para el contenedor de la muestra, componentes ubicados dentro de una caja negra que evita la entrada de luz externa a fin de capturar imágenes de buena calidad. Además, el sistema cuenta con una computadora de placa reducida y una pantalla de cristal líquido.

CONTAR PÍXELES.

Con las imágenes digitales de las muestras, los investigadores emplearon el modelo de color conocido como RGB para detectar las cantidades de píxeles rojos, verdes y azules presentes en ellas.

A partir del promedio de los componentes de color se evaluó la absorbancia experimental de la imagen, una medida de cómo se comporta la luz blanca cuando atraviesa la muestra estudiada, explicó el especialista del Cinvestav.

Así, utilizando un promedio de los valores de absorbancia para las muestras de cada categoría, fue posible identificar que cuando la intensidad en el tono del tequila es mayor, como en el caso del reposado (amarillento) y el añejo (ámbar), la absorbancia aumenta; contrario a lo sucedido con el tequila blanco que es incoloro.

Del mismo modo, se logró establecer una relación con los componentes RGB: las muestras de tequila blanco mostraron una prevalencia del rojo, verde y azul, en las de reposado predominan el rojo y el azul; en tanto en el añejo el azul está más presente.

Lee también

Intimidades del sexo de los agaves: la doble fecundación

ALEJANDRA G. GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, JORGE VERDÍN Y BENJAMÍN RODRÍGUEZ-GARAY *

En el estudio se evaluaron 25 muestras (8 de tipo blanco, 12 reposado y 5 añejo) de diferentes marcas de tequila con Denominación de Origen, elaborados con 100 por ciento agave, certificados por el Consejo

Regulador del Tequila, para asegurar su autenticidad, y producidos en el estado de Jalisco.

El ojo electrónico capturó imágenes digitales de pequeños volúmenes de estos tequilas, mismas que fueron procesadas utilizando análisis de componentes principales y discriminante lineal para lograr la clasificación a partir de la información de color que brinda la imagen.

Por el momento, el sistema bioinspirado está en fase de refinamiento y los investigadores trabajan en un estudio para comparar los resultados obtenidos con un método analítico convencional, principalmente basado en la técnica de espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), empleado en la evaluación de la calidad del tequila.

Investigación nacional

Obtiene Cinvestav carbohidratos del agave tequilero que fortalecen la microbiota y controlan apetito

ANTIMIO CRUZ

¿Las bebidas energizantes en nuestro país son una opción saludable y segura?

MC. LEONEL HERNÁNDEZ MENA *

Se complica la producción de alimentos por aumentos de hasta 300% en fertilizantes

ANTIMIO CRUZ

Tags • [cinvestav](#) • [Tequila](#) • [ojo electrónico](#) • [Falsificación](#)

Apéndice 1. Diagramas Eléctricos del OE

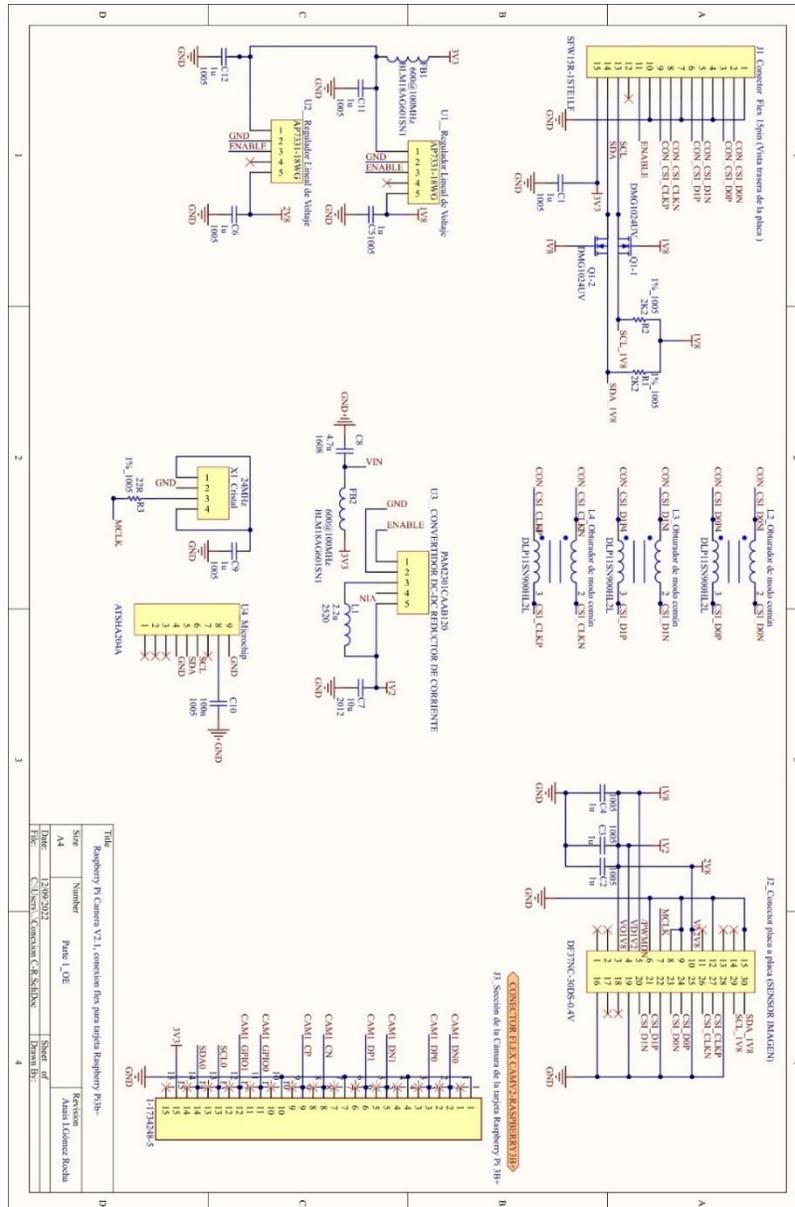
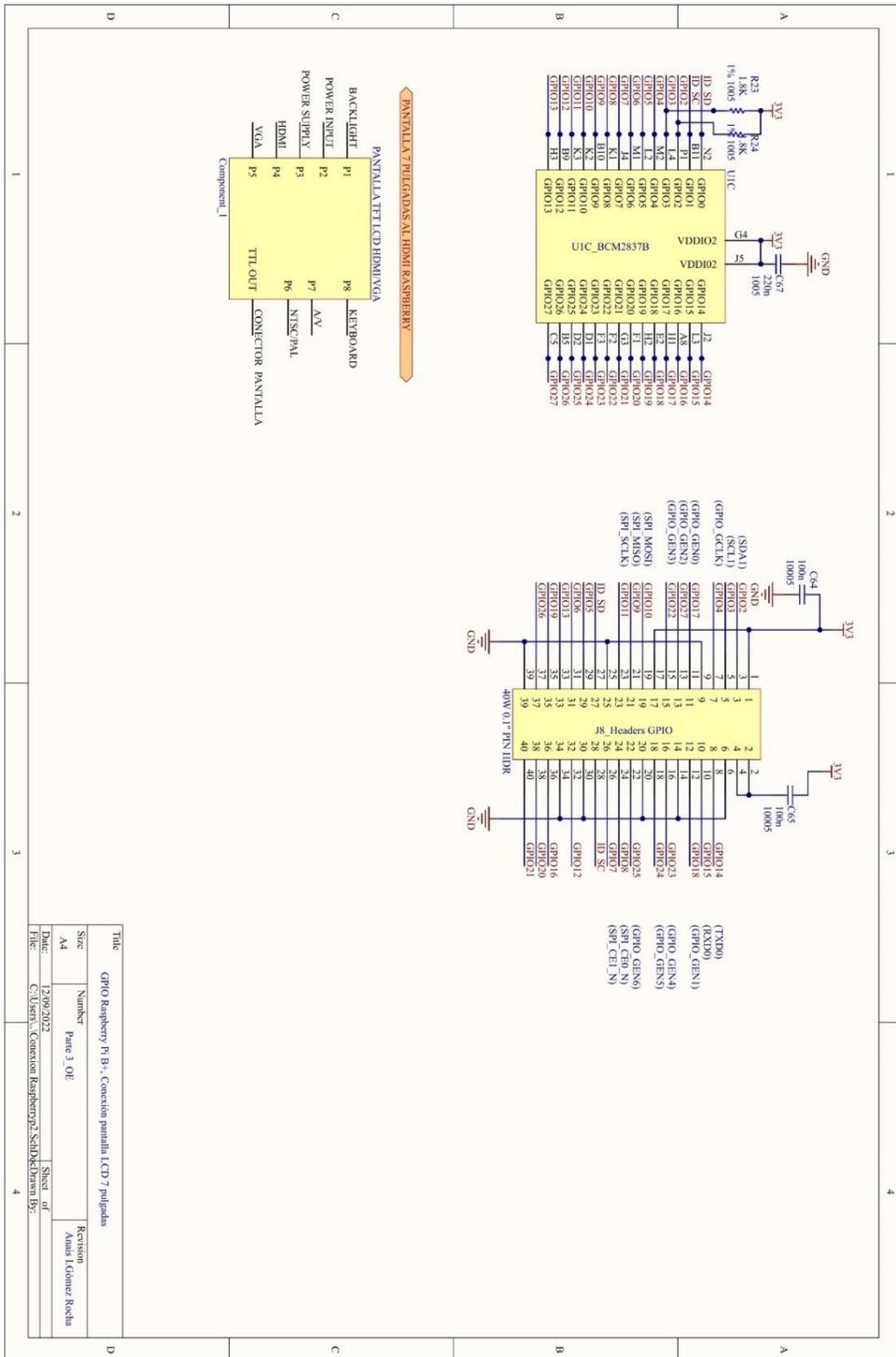


Fig. A1.1. Diagrama eléctrico de la Cámara V2 y conexión a la Raspberry Pi 3B+



USB: Puertos para teclado, mouse

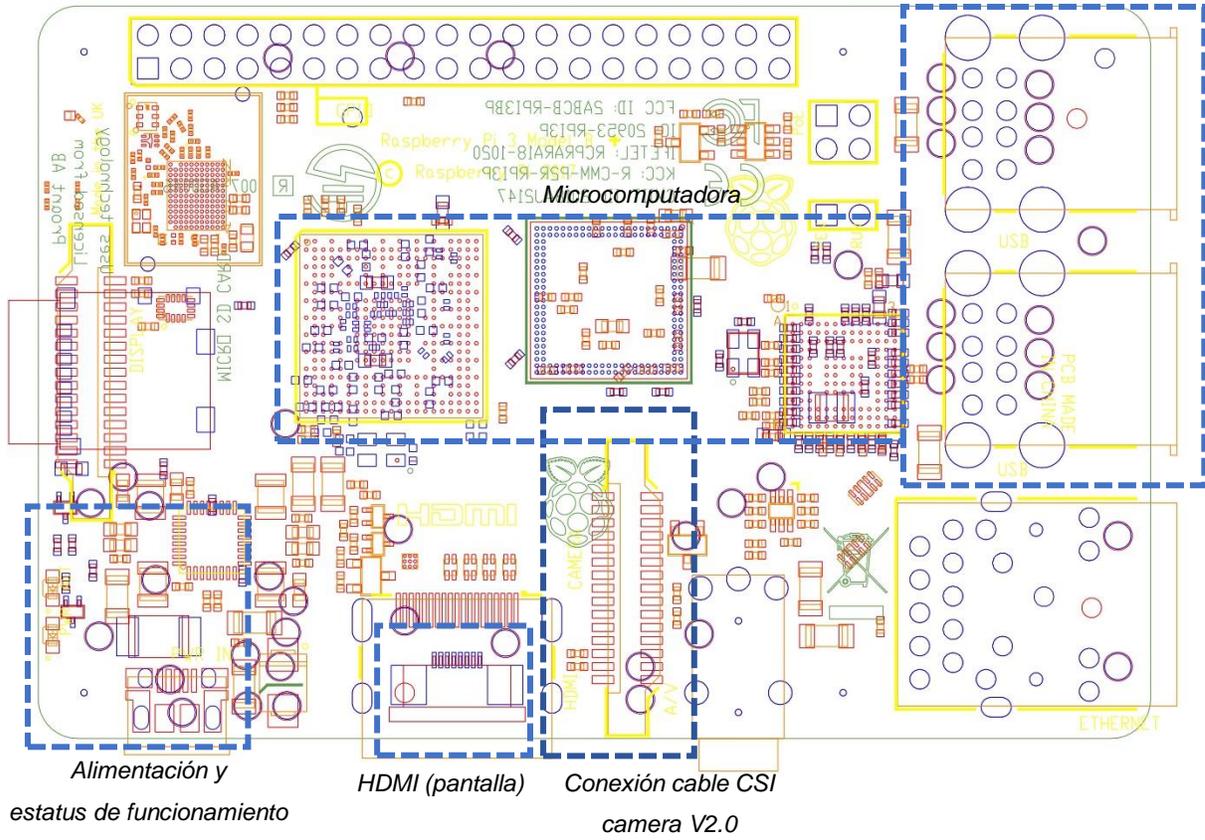


Fig. A1.4. Plano PCB de las Raspberry 3B+. Los cuadros punteados en azul son los elementos básicos de la Raspberry 3B+ para el uso del OE.

Apéndice 2. Histogramas de los patrones colorimétricos

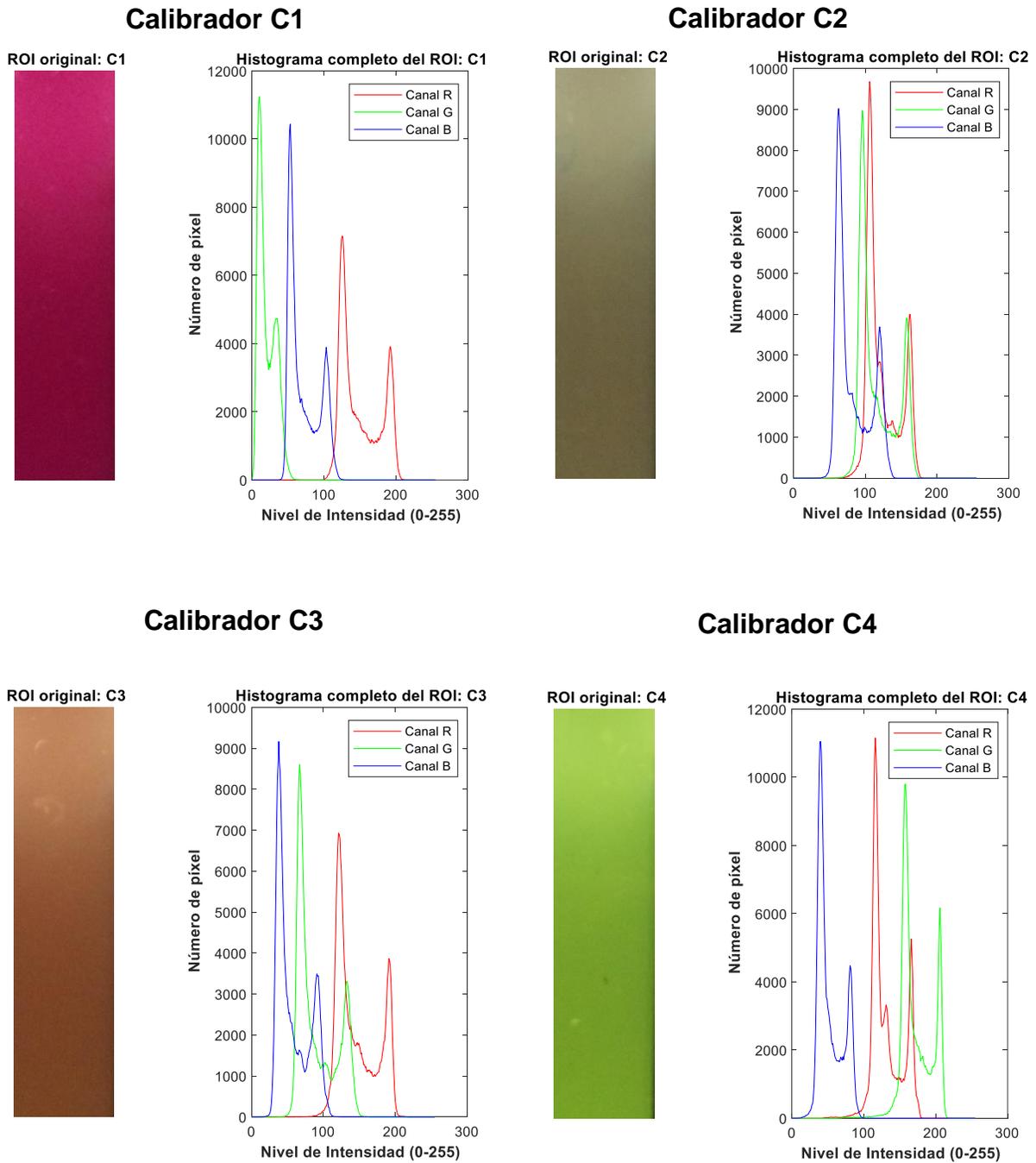
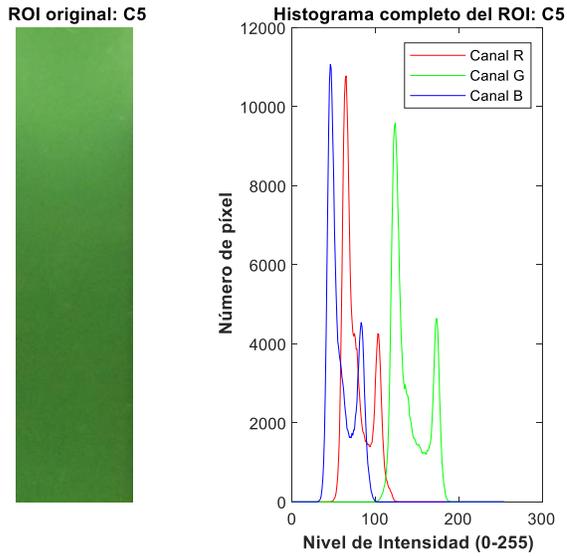
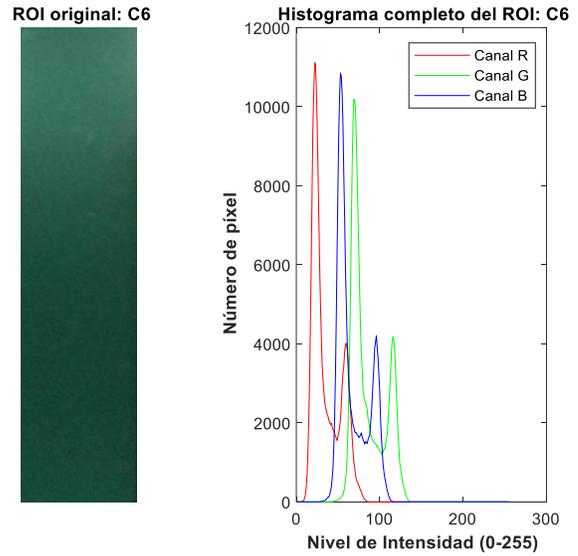


Fig. A2.1. Se observa de izquierda a derecha la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB) de los calibradores C1-C4

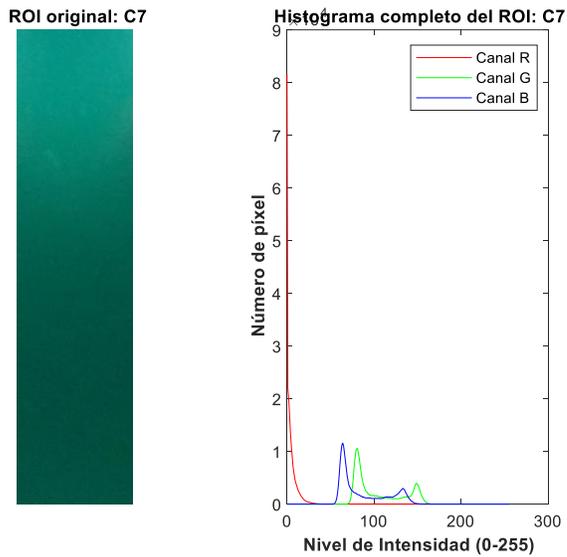
Calibrador C5



Calibrador C6



Calibrador C7



Calibrador C8

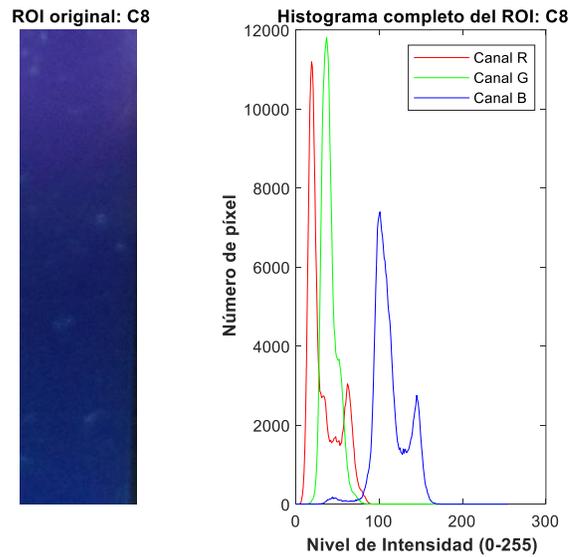
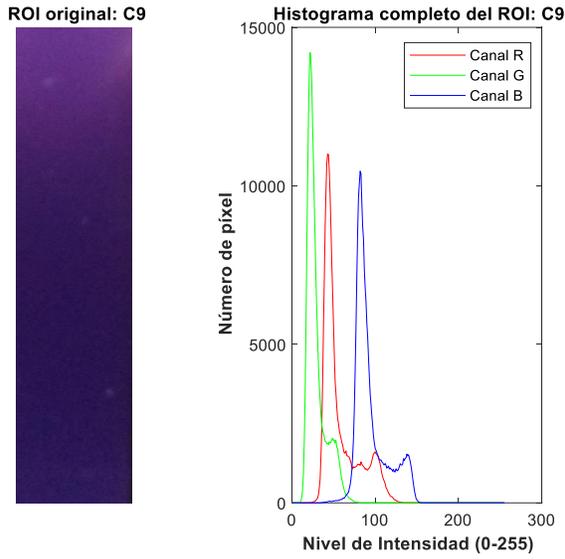
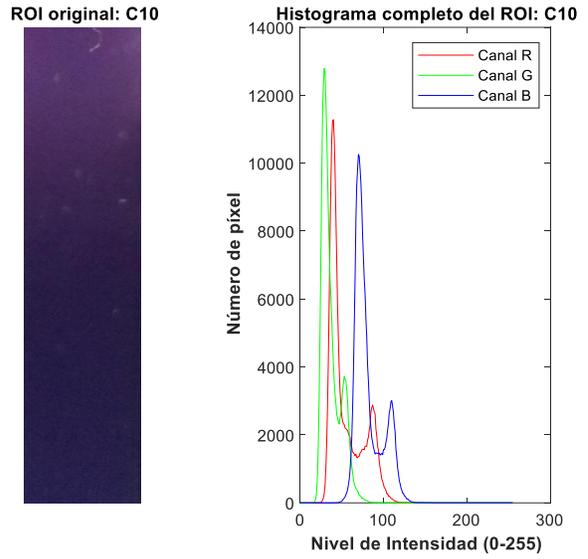


Fig. A2.2. Se observa de izquierda a derecha la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB) de los calibradores C5-C8

Calibrador C9



Calibrador C10



Calibrador CB

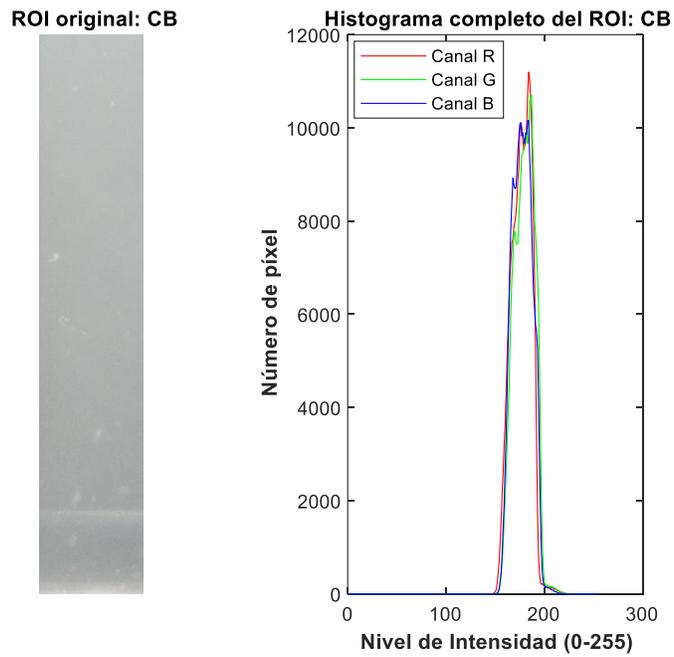


Fig. A2.2. Se observa de izquierda a derecha la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB) de los calibradores C9, C10 y CB

Tabla A2.1. Absorbancias de los calibradores colorimétricos

Cal.	Con ajuste correcto de la lente			
	R	G	B	Absorbancia General
CB	0.01±0.002	0.03±0.001	0.01±0.002	0.02±0.002
C1	0.13±0.001	0.82±0.018	0.40±0.003	0.45±0.007
C2	0.19±0.002	0.20±0.003	0.32±0.005	0.23±0.003
C3	0.11±0.003	0.27±0.001	0.44±0.002	0.27±0.002
C4	0.17±0.002	0.08±0.002	0.48±0.002	0.24±0.002
C5	0.38±0.002	0.16±0.001	0.48±0.006	0.34±0.003
C6	1.37±0.024	0.21±0.002	0.25±0.002	0.61±0.009
C7	0.61±0.006	0.33±0.003	0.41±0.003	0.45±0.004
C8	0.48±0.004	0.44±0.002	0.21±0.003	0.38±0.003
C9	0.34±0.004	0.62±0.008	0.23±0.003	0.40±0.005
C10	0.35±0.005	0.99±0.006	0.18±0.004	0.51±0.005

Apéndice 3. Histogramas de las muestras de tequila analizadas

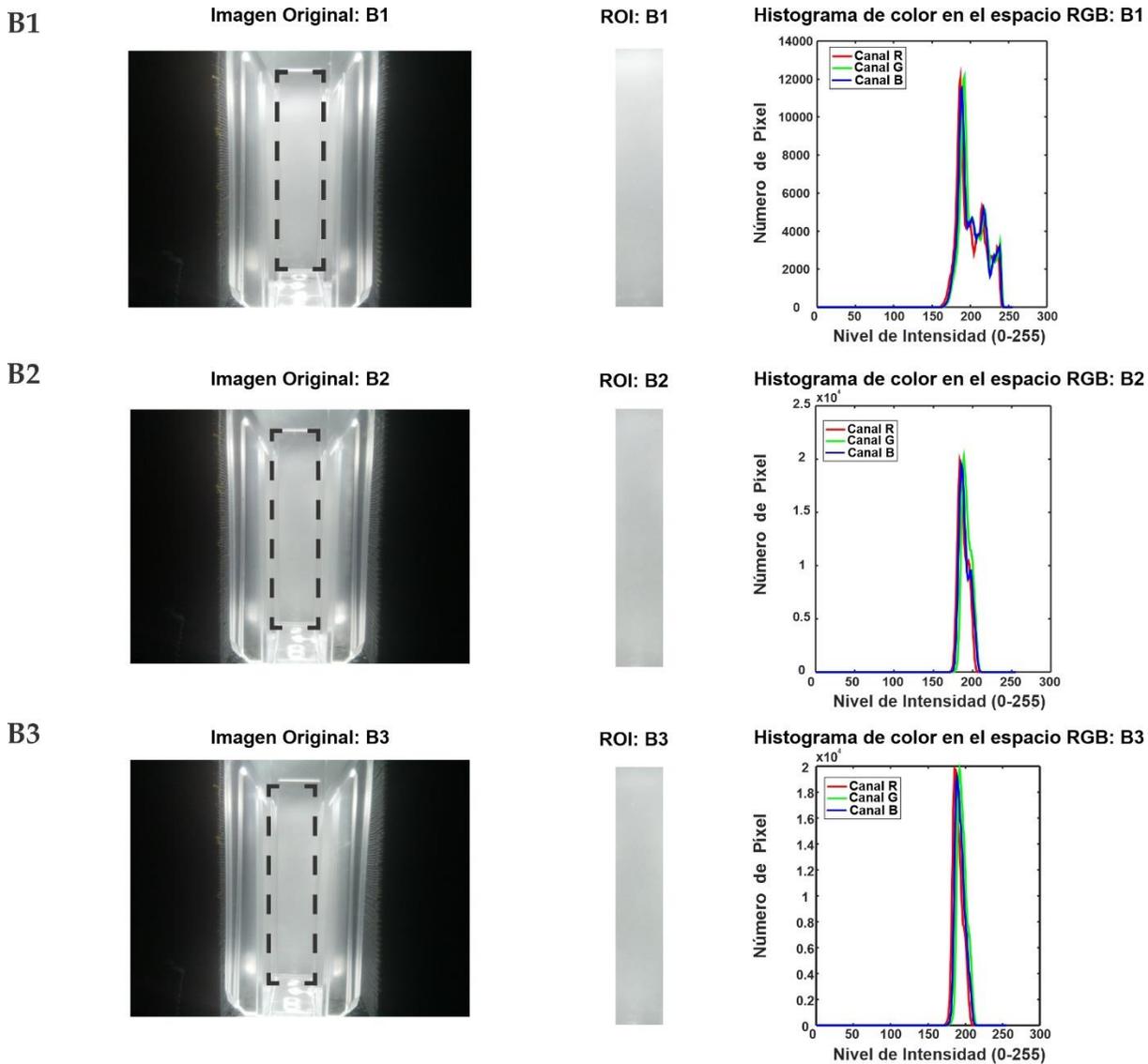
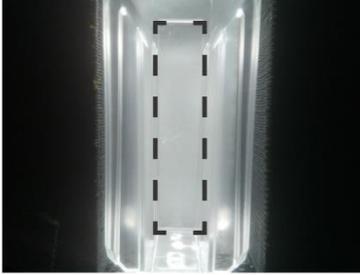


Fig. A3.1. Histogramas de muestras de Tequilas Blancos. (B1, B2, B3) = Tequilas Blancos: Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

B4

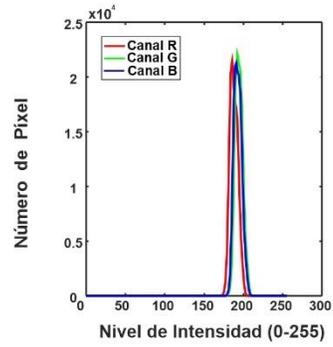
Imagen Original: B4



ROI: B4

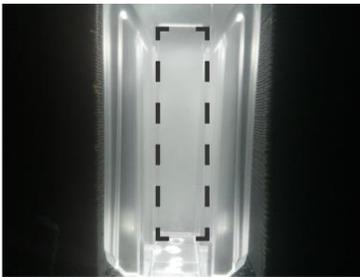


Histograma de color en el espacio RGB: B4



B5

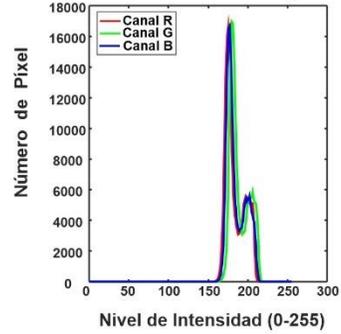
Imagen Original: B5



ROI: B5

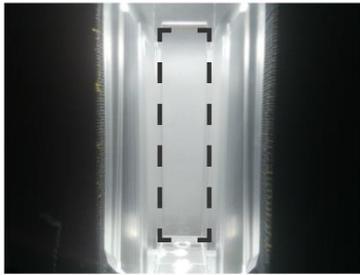


Histograma de color en el espacio RGB: B5



B6

Imagen Original: B6



ROI: B6



Histograma de color en el espacio RGB: B6

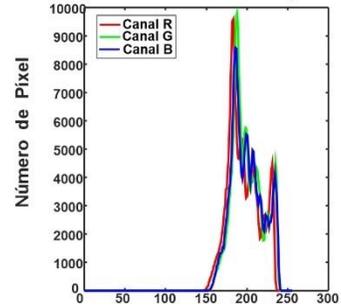
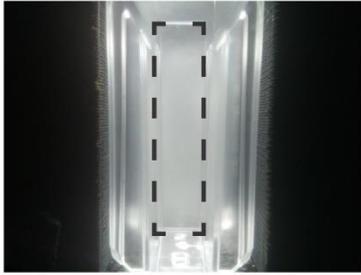


Fig. A3.2. Histogramas de muestras de Tequilas Blancos. (B4, B5, B6) = Tequilas Blancos: Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

B7

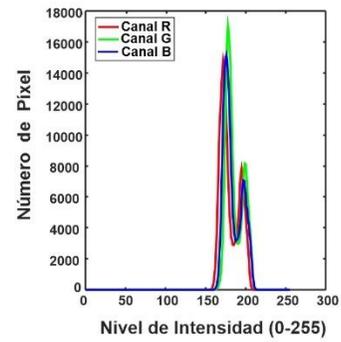
Imagen Original: B7



ROI: B7

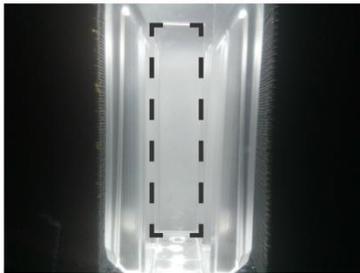


Histograma de color en el espacio RGB: B7



B8

Imagen Original: B8



ROI: B8



Histograma de color en el espacio RGB: B8

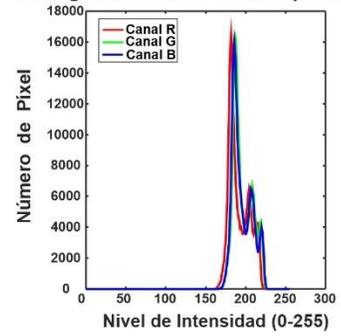
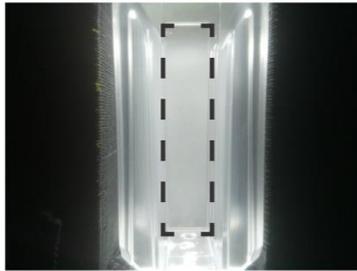


Fig. A3.3. Histogramas de muestras de Tequilas Blancos. **(B7, B8)** = Tequilas Blancos: Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

R1

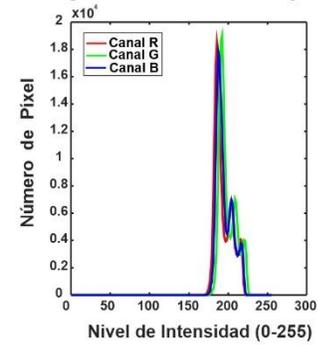
Imagen Original: R1



ROI: R1

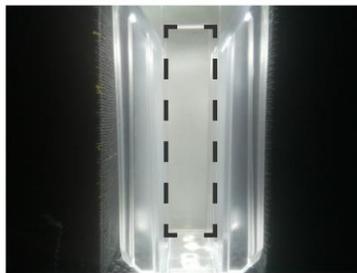


Histograma de color en el espacio RGB: R1



R2

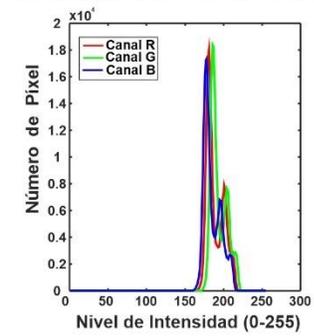
Imagen Original: R2



ROI: R2



Histograma de color en el espacio RGB: R2



R3

Imagen Original: R3



ROI: R3



Histograma de color en el espacio RGB: R3

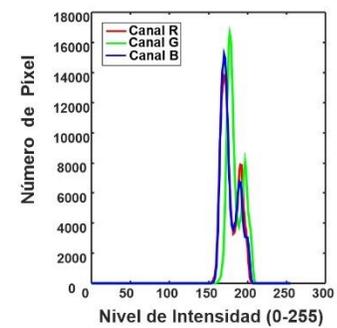
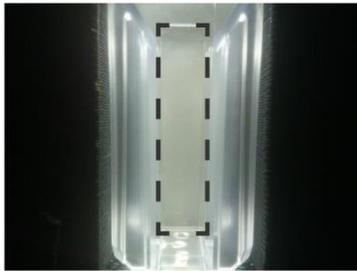


Fig. A3.4. Histogramas de muestras de Tequilas Reposados. (R1, R2, R3) = Tequilas Reposados. Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

R4

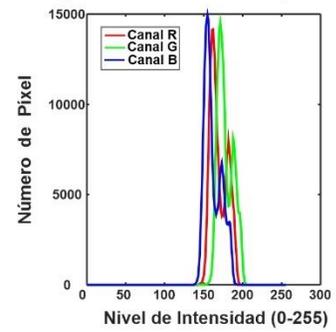
Imagen Original: R4



ROI: R4

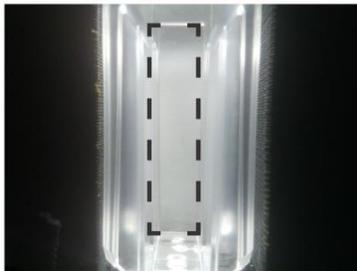


Histograma de color en el espacio RGB: R4



R5

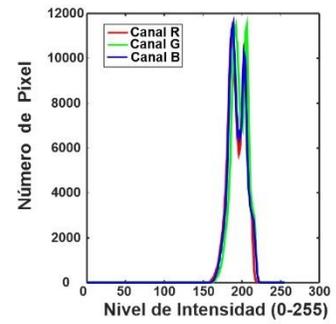
Imagen Original: R5



ROI: R5

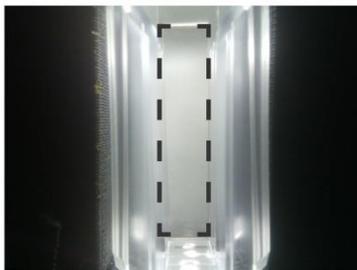


Histograma de color en el espacio RGB: R5



R6

Imagen Original: R6



ROI: R6



Histograma de color en el espacio RGB: R6

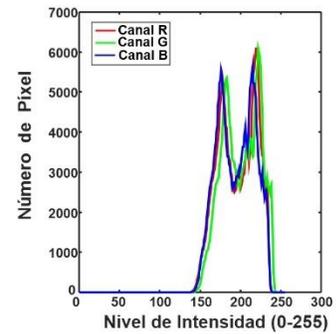


Fig. A3.5. Histogramas de muestras de Tequilas Reposados. (R4, R5, R6) = Tequilas Reposados. Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

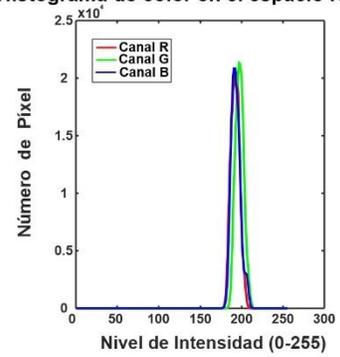
R7



ROI: R7



Histograma de color en el espacio RGB: R7



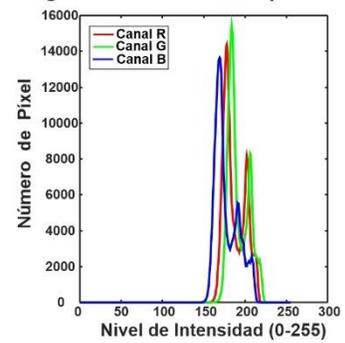
R8



ROI: R8



Histograma de color en el espacio RGB: R8



R9



ROI: R9



Histograma de color en el espacio RGB: R9

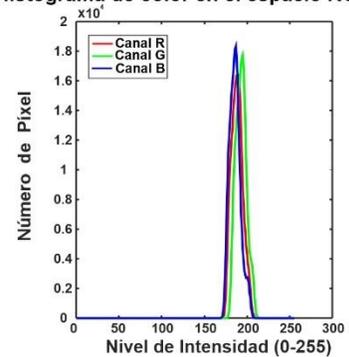


Fig. A3.6. Histogramas de muestras de Tequilas Reposados. (R7, R8, R9) = Tequilas Reposados. Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

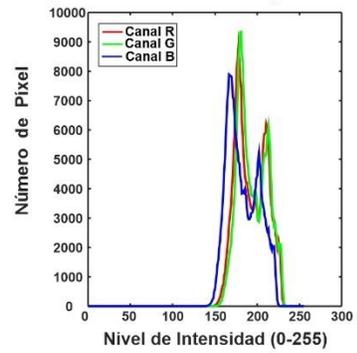
R10



ROI: R10



Histograma de color en el espacio RGB: R10



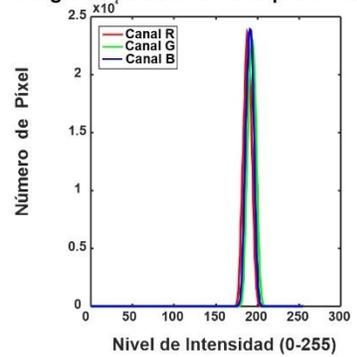
R11



ROI: R11



Histograma de color en el espacio RGB: R11



R12



ROI: R12



Histograma de color en el espacio RGB: R12

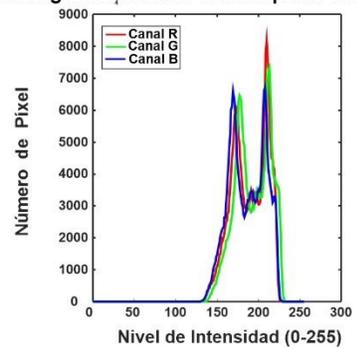
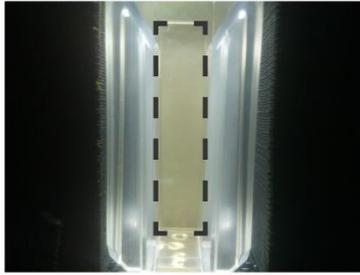


Fig. A3.7. Histogramas de muestras de Tequilas Reposados. (R10, R11, R12) = Tequilas Reposados. Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

A1

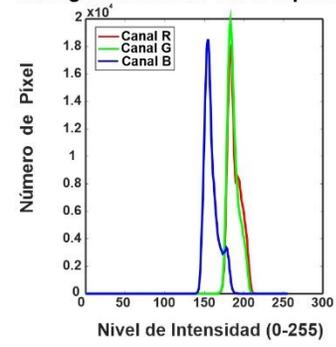
Imagen Original: A1



ROI: A1

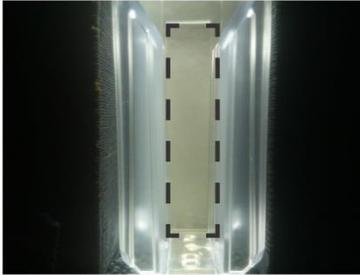


Histograma de color en el espacio RGB: A1



A2

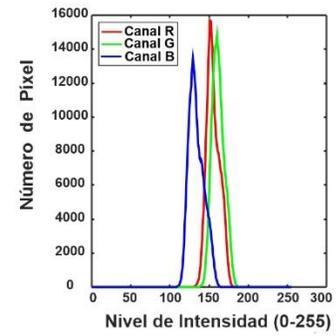
Imagen Original: A2



ROI: A2

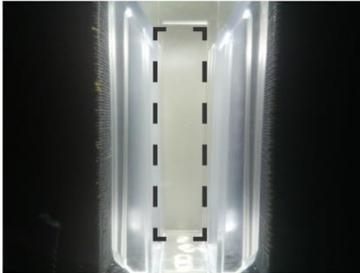


Histograma de color en el espacio RGB: A2



A3

Imagen Original: A3



ROI: A3



Histograma de color en el espacio RGB: A3

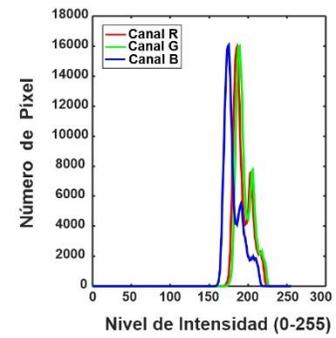
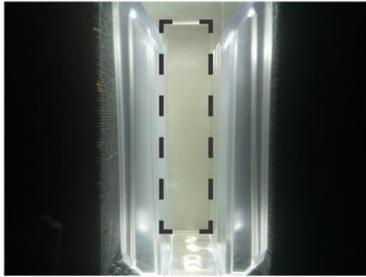


Fig. A3.8. Histogramas de muestras de Tequilas Añejos. ((A1, A2, A3) = Tequilas Añejos. Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

A4

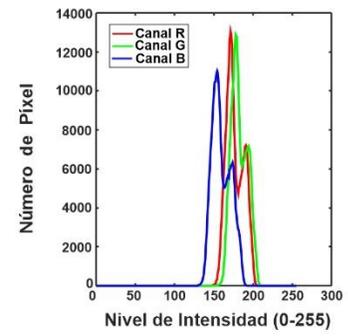
Imagen Original: A4



ROI: A4

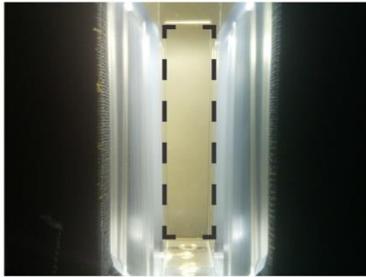


Histograma de color en el espacio RGB: A4



A5

Imagen Original: A5



ROI: A5



Histograma de color en el espacio RGB: A5

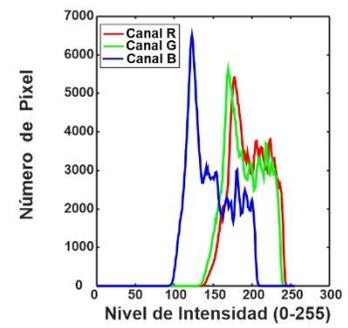
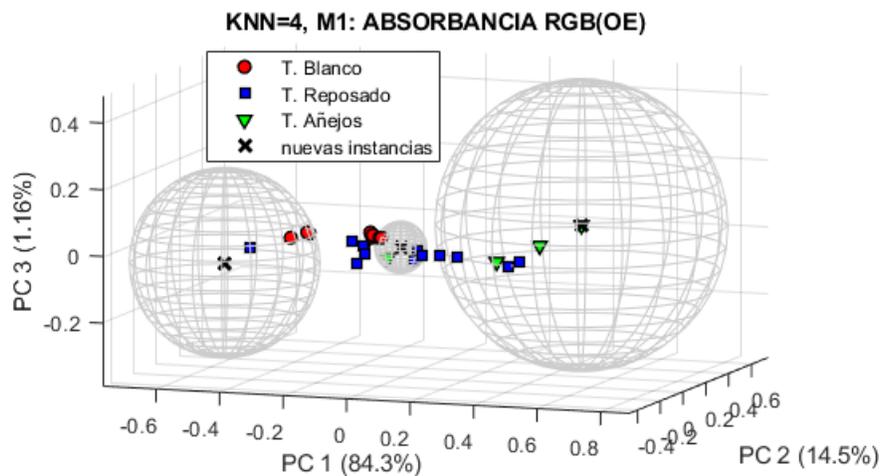


Fig. A3.9. Histogramas de muestras de Tequilas Añejos. **(A4, A5)** = Tequilas Añejos. Se observa de izquierda a derecha la imagen captada por el ojo electrónico (OE), la región de interés (ROI) y el histograma de intensidad de rojo, verde y azul (RGB).

Apéndice 4. Gráficos de modelos clasificadores KNN

(a)



(b)

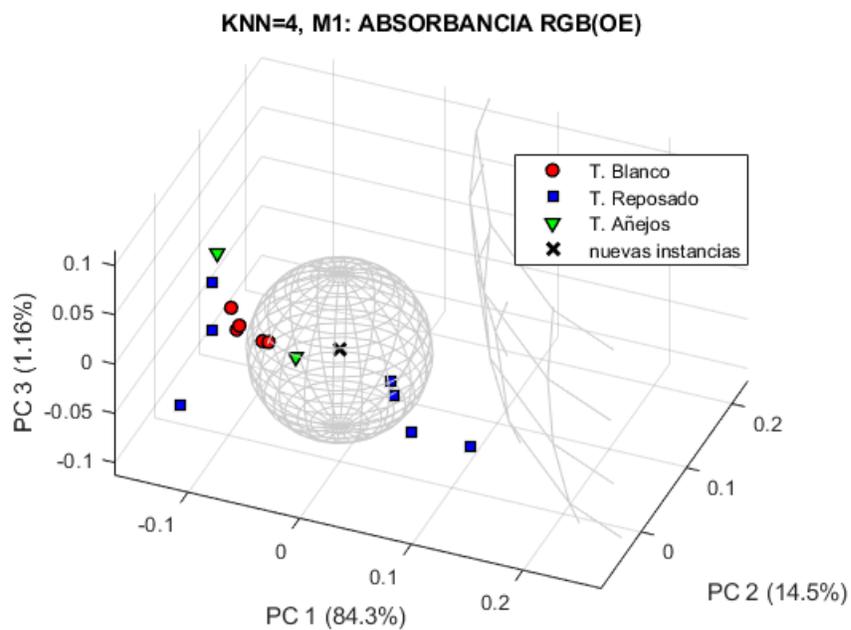


Fig. A4.1. Gráficos KNN tridimensional del modelo M1, tras el análisis de las muestras de tequila según su categoría. (a) Representación del OE con $k=4$; (b) Zoom en la instancia Promedio. Las instancias mínimas, promedio y máximo se muestra con una (x).

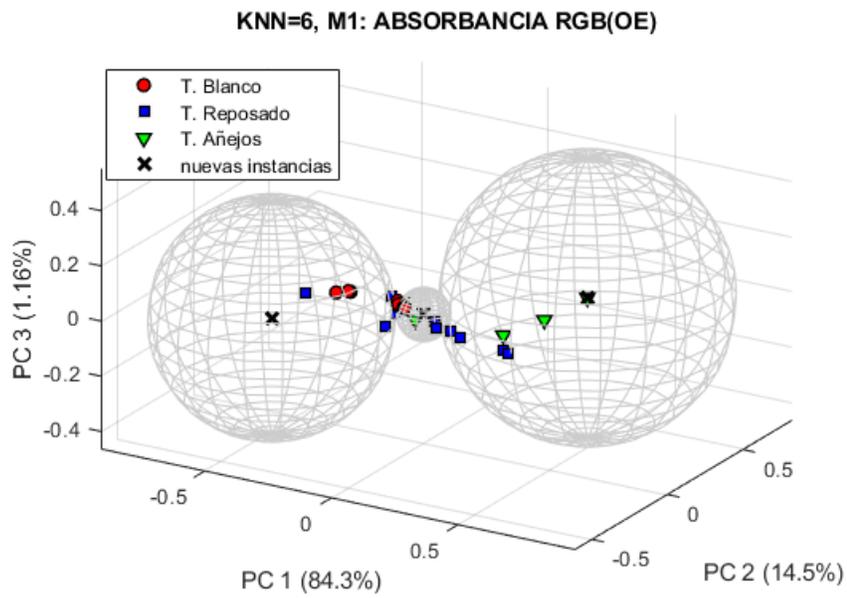
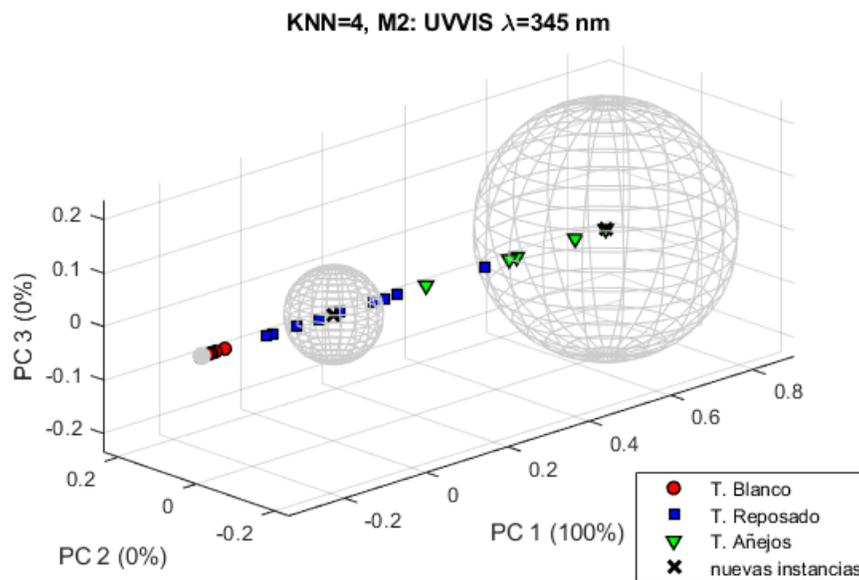


Fig. A4.2. Gráficos KNN tridimensional del modelo M1 con k=6.

(a)



(b)

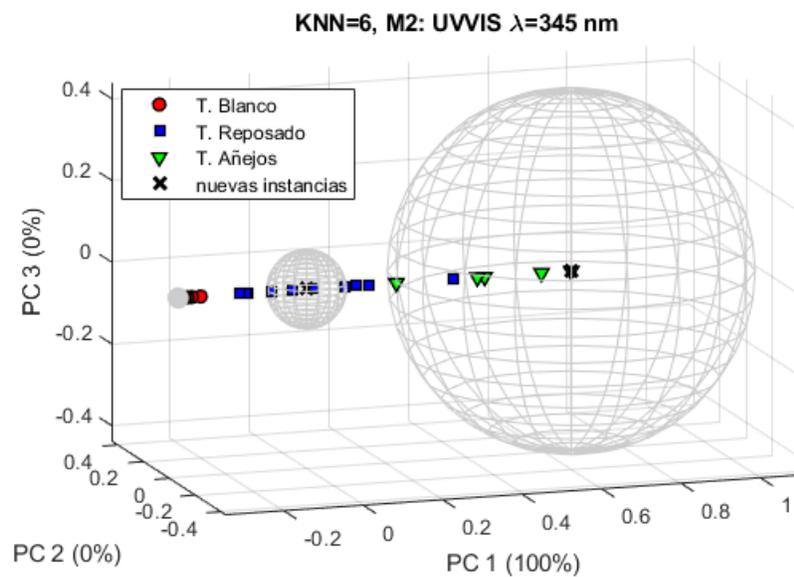
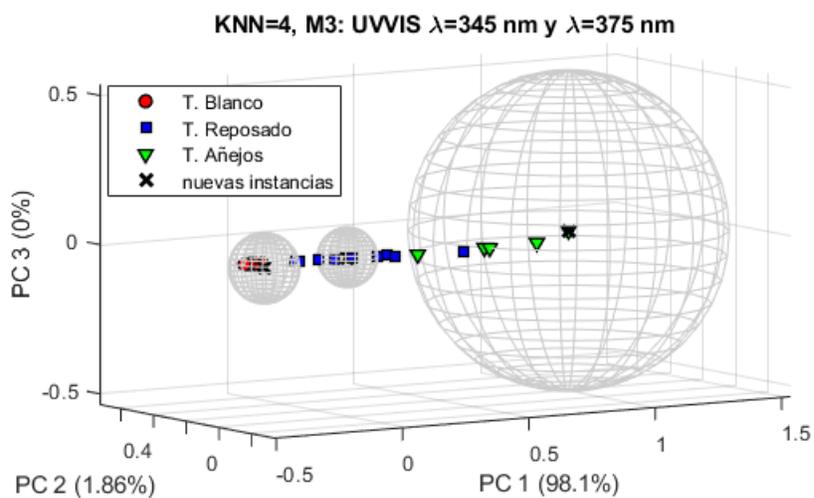


Fig. A4.3. Gráficos KNN tridimensional del modelo M2 para: (a) $k=4$ y (b) $k=6$.

(a)



(b)

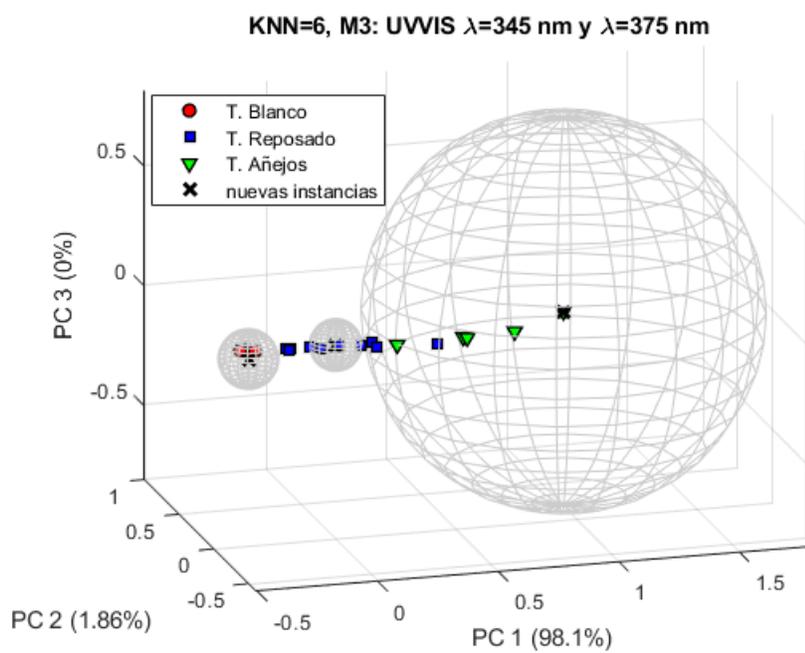
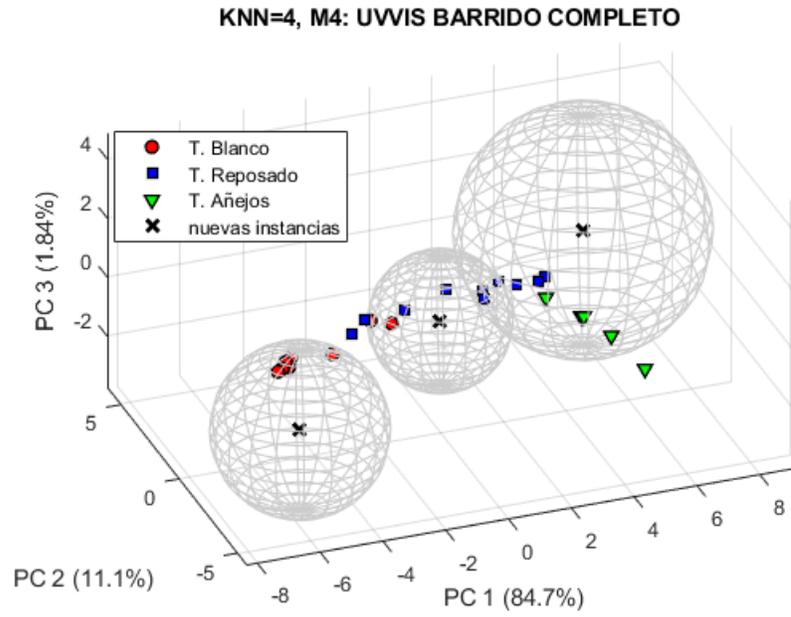


Fig. A4.4. Gráficos KNN tridimensional del modelo M4 para: (a) $k=4$ y (b) $k=6$.

(a)



(b)

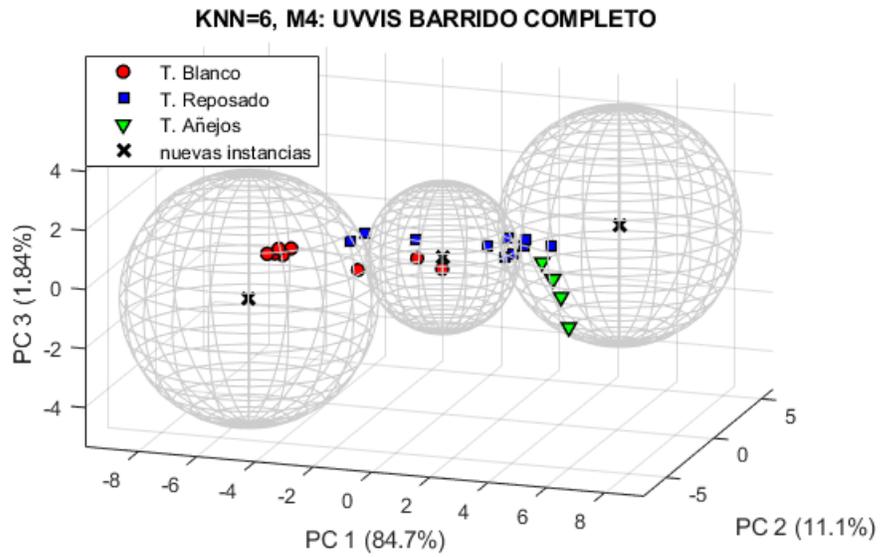


Fig. A4.5. Gráficos KNN tridimensional del modelo M4 para: (a) $k=4$ y (b) $k=6$.

Apéndice 5. Tablas de confusión de los modelos ANN

Tabla A5.1. Tabla de confusión PCA-ANN para el modelo M1 de OE.

B	R	A	TP	FP	TN	FN	% B	% R	% A	% PROM	Exactitud	Precisión	Sensitividad	Especificidad	Kappa
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	12	5	24	1	49	1	87.50	100.00	100.00	95.83	0.97	0.96	0.96	0.98	0.92
7	12	5	24	1	49	1	87.50	100.00	100.00	95.83	0.97	0.96	0.96	0.98	0.92
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.92
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.92
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
Promedio							99.00	99.00	97.60	98.53	0.99	0.99	0.99	0.99	0.97

*Las columnas **B**, **R**, **A** se refieren al número de muestras de tequila identificados correctamente (Blanco, Reposado y Añejo).

TP. Verdaderos Positivos, **FP**. Falsos positivos, **TN**. Verdaderos Negativos, **FN**. Falsos Negativos.

% B. Porcentaje de Clasificación de Tequilas Blancos, **% R**. Porcentaje de Clasificación de Tequilas Reposados, **% A**. Porcentaje de Clasificación de Tequilas Reposados.

% PROM. Porcentaje Promedio de Clasificación

Tabla A5.4. Tabla de confusión PCA-ANN para el modelo M4 para las absorbancias UV-Vis medidas de 200nm a 600nm

B	R	A	TP	FP	TN	FN	% B	% R	% A	% PROM	Exactitud	Precisión	Sensitividad	Especificidad	Kappa
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	11	5	24	1	49	1	100.00	91.67	100.00	97.22	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
8	12	5	25	0	50	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	12	4	24	1	49	1	100.00	100.00	80.00	93.33	0.97	0.96	0.96	0.98	0.93
Promedio							100.00	98.33	96.80	98.38	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98

*Las columnas **B**, **R**, **A** se refieren al número de muestras de tequila identificados correctamente (Blanco, Reposado y Añejo).

TP. Verdaderos Positivos, **FP**. Falsos positivos, **TN**. Verdaderos Negativos, **FN**. Falsos Negativos.

% B. Porcentaje de Clasificación de Tequilas Blancos, **% R**. Porcentaje de Clasificación de Tequilas Reposados, **% A**. Porcentaje de Clasificación de Tequilas Reposados.

% PROM. Porcentaje Promedio de Clasificación

Referencias

- [1] B. M. Carlson, "Chapter 7 - Special Senses—Vision and Hearing," in *The Human Body*, B. M. Carlson Ed.: Academic Press, 2019, pp. 177-207.
- [2] J. D. Mollon, "Color vision: Opsins and options," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 9, p. 4743, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.9.4743.
- [3] C. P. van den Berg, J. Troscianko, J. A. Endler, N. J. Marshall, and K. L. Cheney, "Quantitative Colour Pattern Analysis (QCPA): A comprehensive framework for the analysis of colour patterns in nature," *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 11, no. 2, pp. 316-332, 2020, doi: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13328>.
- [4] T. W. Cronin and M. J. Bok, "Photoreception and vision in the ultraviolet," (in eng), *J Exp Biol*, vol. 219, no. Pt 18, pp. 2790-2801, Sep 15 2016, doi: 10.1242/jeb.128769.
- [5] J. Troscianko, J. Skelhorn, and M. Stevens, "Camouflage strategies interfere differently with observer search images," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 285, no. 1886, p. 20181386, 2018, doi: doi:10.1098/rspb.2018.1386.
- [6] J. R. Mosedale and J. L. Puech, "Wood maturation of distilled beverages," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 9, no. 3, pp. 95-101, 1998/03/01/ 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00024-7).
- [7] E. Acosta-Salazar *et al.*, "Effect of Age of Agave tequilana Weber Blue Variety on Quality and Authenticity Parameters for the Tequila 100% Agave Silver Class: Evaluation at the Industrial Scale Level," (in eng), *Foods (Basel, Switzerland)*, vol. 10, no. 12, p. 3103, 2021, doi: 10.3390/foods10123103.
- [8] R. A. Magdaleno, "Mecanismos de maduración del Tequila," *Manual del Técnico Tequilero*, C. R. d. Tequila(CRT), Ed., Guadalajara, Jalisco México, 2019, pp. 289-310.
- [9] C. Prissa. "La importancia del tequila para el país." <https://prissa.mx/blog-api/la-importancia-del-tequila-para-el-pais/> (accessed 29/03/2022).
- [10] M. C. Cedeño, "Tequila Production," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1-11, 1995/01/01 1995, doi: 10.3109/07388559509150529.
- [11] C. R. d. Tequila. "Elaboración Normativa." <https://www.crt.org.mx/index.php/es/el-tequila-3/elaboracion-normativa> (accessed 7/02/2022, 2022).
- [12] W. M. Warren-Vega, R. Fonseca-Aguíñaga, L. V. González-Gutiérrez, F. Carrasco-Marín, A. I. Zárate-Guzmán, and L. A. Romero-Cano, "Chemical characterization of tequila maturation process and their connection with the physicochemical properties of the cask," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 98, p. 103804, 2021/05/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103804>.
- [13] J. E. López-Ramírez, S. T. Martín-del-Campo, H. Escalona-Buendía, J. A. García-Fajardo, and M. Estarrón-Espinosa, "Physicochemical quality of tequila

- during barrel maturation. A preliminary study," *CyTA - Journal of Food*, vol. 11, no. 3, pp. 223-233, 2013/08/01 2013, doi: 10.1080/19476337.2012.727033.
- [14] I. W. González-Robles and D. J. Cook, "The impact of maturation on concentrations of key odour active compounds which determine the aroma of tequila," *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 122, no. 3, pp. 369-380, 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/jib.333>.
- [15] S. T. Martín-del-Campo, J. E. López-Ramírez, and M. Estarrón-Espinosa, "Evolution of volatile compounds during the maturation process of silver tequila in new French oak barrels," *LWT*, vol. 115, p. 108386, 2019/11/01/ 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108386>.
- [16] O. Aguilar-Méndez *et al.*, "Volatile compound profile conferred to tequila beverage by maturation in recycled and regenerated white oak barrels from *Quercus alba*," *European Food Research and Technology*, vol. 243, no. 12, pp. 2073-2082, 2017/12/01 2017, doi: 10.1007/s00217-017-2901-7.
- [17] F. J. F. U. F. M. Clydesdale, *Food Colorimetry: Theory And Applications*. (Food / Nahrung, no. 1). John Wiley & Sons, Ltd, 1975, pp. 90-91.
- [18] C. Xu, "4 - Electronic eye for food sensory evaluation," in *Evaluation Technologies for Food Quality*, J. Zhong and X. Wang Eds.: Woodhead Publishing, 2019, pp. 37-59.
- [19] R. S. K. Dr, *Handbook of Analytical Instruments, Second Edition*, 2nd edition. ed. New York: McGraw-Hill Education (in en), 2006.
- [20] W. Wardencki, "Alcoholic Beverages," in *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, and M. Miró Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 67-76.
- [21] "6 - Instrumental analyses for alcoholic beverages," in *Sensory and Instrumental Evaluation of Alcoholic Beverages*, H. Heymann and S. E. Ebeler Eds. San Diego: Academic Press, 2017, pp. 106-132.
- [22] "Introduction," in *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, A. J. Buglass Ed., no. Volume 1 & 2), John Wiley & Sons, Ed., 2011, pp. 631-646.
- [23] Y. Bar-Cohen, "Biomimetics – Using nature to inspire human innovation," *Bioinspiration & biomimetics*, vol. 1, pp. P1-P12, 04/01 2006, doi: 10.1088/1748-3182/1/1/P01.
- [24] C. R. d. Tequila. <https://www.crt.org.mx/index.php/en/pages-2/proteccion-del-tequila-a-nivel-internacional> (accessed 2 de Febrero, 2022).
- [25] *Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones*. [Online] Available: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5282165&fecha=13/12/2012
- [26] S. Fengxia, C. Yuwen, Z. Zhanming, and Y. Yifeng, "Determination of Beer Color Using Image Analysis," *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 62, no. 4, pp. 163-167, 2004/09/01 2004, doi: 10.1094/ASBCJ-62-0163.
- [27] J. Lukinac, K. Mastanjević, K. Mastanjević, G. Nakov, and M. Jukić, "Computer Vision Method in Beer Quality Evaluation—A Review," *Beverages*, vol. 5, no. 2, p. 38, 2019. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2306-5710/5/2/38>.
- [28] J. Mrw i , S. Posavec, S. a. P. Kazazi , D. Stanzer, A. Pfaa, and V. Stehlik-Tomas, "Spirit drinks: a source of dietary polyphenols," *Croatian journal of food science and technology*, vol. 4, pp. 102-111, 2012.

- [29] F. R. Jack, "19 - Whiskies: composition, sensory properties and sensory analysis," in *Alcoholic Beverages*, J. Piggott Ed.: Woodhead Publishing, 2012, pp. 379-392.
- [30] F. Jack, "Chapter 18 - Sensory analysis," in *Whisky and Other Spirits (Third Edition)*, I. Russell, G. G. Stewart, and J. Kellershohn Eds.: Academic Press, 2022, pp. 321-333.
- [31] L. Louw and M. G. Lambrechts, "13 - Grape-based brandies: production, sensory properties and sensory evaluation," in *Alcoholic Beverages*, J. Piggott Ed.: Woodhead Publishing, 2012, pp. 281-298.
- [32] M. Lambrechts, D. van Velden, L. Louw, and P. van Rensburg, "Brandy and Cognac: Consumption, Sensory and Health Effects," in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá Eds. Oxford: Academic Press, 2016, pp. 456-461.
- [33] J. B. Faria, "17 - Sugar cane spirits: cachaça and rum production and sensory properties," in *Alcoholic Beverages*, J. Piggott Ed.: Woodhead Publishing, 2012, pp. 348-358.
- [34] A. M. Bortoletto, A. C. Correa, and A. R. Alcarde, "Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça," *Food Research International*, vol. 86, pp. 46-53, 2016/08/01/ 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.003>.
- [35] E. Larousse, "Cata del Tequila," in *Larousse del Tequila*, E. i. S. A. d. C.V. Ed., Primer edición ed., I. S. A. d. C.V., Ed. Ciudad de México: Larousse, 2016, ch. 367, pp. 150-159.
- [36] B. Zhang, J. Cai, C.-Q. Duan, M. J. Reeves, and F. He, "A Review of Polyphenolics in Oak Woods," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 4, pp. 6978-7014, 2015. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/4/6978>.
- [37] G. H. Palmer, "Beverages, Distilled," in *Reference Module in Food Science*: Elsevier, 2016.
- [38] A. C. Muñoz-Muñoz, A. C. Grenier, H. Gutiérrez-Pulido, and J. Cervantes-Martínez, "Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of aging markers in tequila," (in eng), *J Chromatogr A*, vol. 1213, no. 2, pp. 218-23, Dec 12 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.10.018.
- [39] A. Kendrick, "7 - Coloring Aqueous Food Types_4.2. Alcoholic Beverages," in *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, R. Carle and R. M. Schweiggert Eds.: Woodhead Publishing, 2016, pp. 163-177.
- [40] *Regulation(EU) No 1169/2011: Labelling of alcoholic beverages in the EU: some facts*, E. Commision, 2011. [Online]. Available: https://ec.europa.eu/food/safety/labelling-and-nutrition/food-information-consumers-legislation/alcohol-labelling_en
- [41] D. O. d. I. Federación, "Acuerdo: por el que se modifica el diverso por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias," *Anexo III: Colorantes con IDA establecida*. [Online]. Available: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5437267
- [42] A. N. Gilbert, Fridlund, Alan J. Lucchina, Laurie A., "1.4.1 Sensory Analysis for Beverage Quality Control," in *Quality Control in the Beverage Industry*, vol.

Volume 17: the Science of Beverages, A. M. H. Alexandru Mihai Grumezescu Ed.: Academic Press, 2016, ch. 1 - Quality Control in Beverage Production: An Overview, pp. 25-28.

- [43] A. S. f. Testing and Materials, "Standard Test Method for Visual Examination of Used Electrical Insulating Liquids in the Field," ed: ASTM International West Conshohocken, PA, USA, 2015.
- [44] M. Arslan *et al.*, "Recent trends in quality control, discrimination and authentication of alcoholic beverages using nondestructive instrumental techniques," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 107, pp. 80-113, 2021/01/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.021>.
- [45] "European Brewery Convention," *Cerevisia*, vol. 35, no. 4, p. 84, 2011/01/01/ 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2010.12.003>.
- [46] N. Davies, "Chapter 1 - Malts," in *Brewing Materials and Processes*, C. W. Bamforth Ed. San Diego: Academic Press, 2016, pp. 1-25.
- [47] N. Jornet-Martínez, R. Herráez-Hernández, and P. Campíns-Falcó, "Scopolamine analysis in beverages: Bicolorimetric device vs portable nano liquid chromatography," *Talanta*, vol. 232, p. 122406, 2021/09/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122406>.
- [48] R. Riovanto, W. U. Cynkar, P. Berzaghi, and D. Cozzolino, "Discrimination between Shiraz Wines from Different Australian Regions: The Role of Spectroscopy and Chemometrics," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 18, pp. 10356-10360, 2011/09/28 2011, doi: 10.1021/jf202578f.
- [49] V. Uríčková and J. Sádecká, "Determination of geographical origin of alcoholic beverages using ultraviolet, visible and infrared spectroscopy: A review," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 148, pp. 131-137, 2015/09/05/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.03.111>.
- [50] Q. J. Wang and C. Spence, "Drinking through rosé-coloured glasses: Influence of wine colour on the perception of aroma and flavour in wine experts and novices," *Food Research International*, vol. 126, p. 108678, 2019/12/01/ 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108678>.
- [51] K. D. Pessoa, W. T. Suarez, M. F. dos Reis, M. de Oliveira Krambeck Franco, R. P. L. Moreira, and V. B. dos Santos, "A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 185, pp. 310-316, 2017/10/05/ 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.072>.
- [52] G. Pérez-Caballero *et al.*, "Authentication of tequilas using pattern recognition and supervised classification," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 94, pp. 117-129, 2017/09/01/ 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.008>.
- [53] L. I. Segura, V. O. Salvadori, and S. M. Goñi, "Characterisation of liquid food colour from digital images," *International Journal of Food Properties*, vol. 20, no. sup1, pp. S467-S477, 2017/12/18 2017, doi: 10.1080/10942912.2017.1299758
- [54] K. Ntrallou, H. Gika, and E. Tsochatzis, "Analytical and Sample Preparation Techniques for the Determination of Food Colorants in Food Matrices," *Foods*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.3390/foods9010058.

- [55] R. L. Gil, C. G. Amorim, M. C. B. S. M. Montenegro, and A. N. Araújo, "HPLC-potentiometric method for determination of biogenic amines in alcoholic beverages: A reliable approach for food quality control," *Food Chemistry*, vol. 372, p. 131288, 2022/03/15/ 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131288>.
- [56] J. Martín-Gómez, T. García-Martínez, M. Á. Varo, J. Mérida, and M. P. Serratos, "Phenolic compounds, antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts," *LWT*, vol. 146, p. 111661, 2021/07/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111661>.
- [57] F. Turak and M. U. Ozgur, "Simultaneous Determination of Allura Red and Ponceau 4R in Drinks with the Use of Four Derivative Spectrophotometric Methods and Comparison with High-Performance Liquid Chromatography," *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, vol. 96, no. 6, pp. 1377-1386, 2013, doi: 10.5740/jaoacint.12-393.
- [58] M. J. Scotter, "6 - Methods of analysis for food colour additive quality and safety assessment," in *Colour Additives for Foods and Beverages*, M. J. Scotter Ed. Oxford: Woodhead Publishing, 2015, pp. 131-188.
- [59] "5 - Rapid methods to analyze alcoholic beverages," in *Sensory and Instrumental Evaluation of Alcoholic Beverages*, H. Heymann and S. E. Ebeler Eds. San Diego: Academic Press, 2017, pp. 84-104.
- [60] P. Wiśniewska *et al.*, "Authentication of whisky due to its botanical origin and way of production by instrumental analysis and multivariate classification methods," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 173, pp. 849-853, 2017/02/15/ 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.10.042>.
- [61] *List of Methods of Analysis for Nonbeverage Products*, JAOAC 7:5, 1994.
- [62] G. Ziyatdinova, I. Salikhova, N. Skorobogatova, M. Chibisova, and H. Budnikov, "New Electrochemistry-Based Approaches to Brandy Quality Evaluation Using Antioxidant Parameters," *Food Analytical Methods*, vol. 8, no. 7, pp. 1794-1803, 2015/08/01 2015, doi: 10.1007/s12161-014-0059-5.
- [63] E. Larousse, "El tequila y su relación con otros destilados de agave," in *Larousse del Tequila*, E. i. S. A. d. C.V. Ed., Primera Edición ed. Ciudad de México 2016, pp. 122-135.
- [64] K. N. Ramírez-Guzmán *et al.*, "15 - Traditional Fermented Beverages in Mexico," in *Fermented Beverages*, A. M. Grumezescu and A. M. Holban Eds.: Woodhead Publishing, 2019, pp. 605-635.
- [65] *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.* [Online] Available: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883475&fecha=12/06/1997
- [66] *Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCFI-2004. Bebidas alcohólicas-Bacanora-Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado.* [Online] Available: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4917328&fecha=14/12/2005
- [67] *Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004: Bebidas Alcohólicas-Sotol-Especificaciones y Métodos de Prueba.* [Online] Available: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5599531&fecha=02/09/2020&print=true

- [68] Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, *Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial*. [Online] Available: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5386313&fecha=23/03/2015
- [69] "Chapter 1 - The Importance of Vision," *Ophthalmology*, vol. 94, pp. 9-13, 1987/04/01/ 1987, doi: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(87\)33553-5](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(87)33553-5).
- [70] a. N. D. F. A. Vera-Díaz, "The Human Eye and Adaptive Optics," in *Topics in Adaptive Optics*. London, United Kingdom: IntechOpen, 2012.
- [71] M. Bertalmío, "Chapter 2 - The biological basis of vision: the retina," in *Vision Models for High Dynamic Range and Wide Colour Gamut Imaging*, M. Bertalmío Ed.: Academic Press, 2020, pp. 11-46.
- [72] T. Gollisch and M. Meister, "Eye smarter than scientists believed: neural computations in circuits of the retina," (in eng), *Neuron*, vol. 65, no. 2, pp. 150-164, 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.009.
- [73] W. F. Ganong, "Consideraciones anatómicas: Retina," in *Fisiología Médica*, S. A. d. C. V. El Manual Moderno Ed., Decimacuarta ed. México, D.F.-Santafé de Bogotá, 1994, ch. 8. Visión, pp. 157-162.
- [74] L. S. Costanzo, "Vision," in *Fisiología*, S. L. EdidE Ed., Cuarta ed. Barcelona (España): Elsevier España, S.L., 2011, pp. 88-96.
- [75] D. H. Hubel, "Impulses, Synapses and Circuits: The membrane Potential," vol. 12, *Eye, brain, and vision* W. H. Freeman, Ed., New York: Scientific American Library, 1988.
- [76] O. S. Dhande, B. K. Stafford, J. A. Lim, and A. D. Huberman, "Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors," (in eng), *Annu Rev Vis Sci*, vol. 1, pp. 291-328, Nov 24 2015, doi: 10.1146/annurev-vision-082114-035502.
- [77] L. Lagnado and F. Schmitz, "Ribbon Synapses and Visual Processing in the Retina," (in eng), *Annu Rev Vis Sci*, vol. 1, pp. 235-262, Nov 24 2015, doi: 10.1146/annurev-vision-082114-035709.
- [78] B. M. Carlson, "Vision: Rods and Cones," in *The Human Body*, B. M. Carlson Ed.: Academic Press, 2019, pp. 187-190.
- [79] S. G. Solomon and P. Lennie, "The machinery of colour vision," (in eng), *Nat Rev Neurosci*, vol. 8, no. 4, pp. 276-86, Apr 2007, doi: 10.1038/nrn2094.
- [80] D. Camuffo, "Chapter 13 - Photometric Aspects of Visible Light and Colours: Trichromatic Theory and Metamers," in *Microclimate for Cultural Heritage (Third Edition)*, D. Camuffo Ed.: Elsevier, 2019, pp. 273-299.
- [81] R. E. W. a. S. L. E. Rafael C. Gonzales, "How the eye sense color," in *Digital Image Processing with Matlab*, Third Edition ed.: Gatesmark Publishing, 2020, ch. Chapter 7. Color Fundamentals, pp. 380-381.
- [82] T. N. Cornsweet, "X - Color Vision III—The Perception of Color," in *Visual Perception*, T. N. Cornsweet Ed.: Academic Press, 1970, pp. 224-267.
- [83] H. Wässle, "Parallel processing in the mammalian retina," (in eng), *Nat Rev Neurosci*, vol. 5, no. 10, pp. 747-57, Oct 2004, doi: 10.1038/nrn1497.
- [84] H. v. Helmholtz, "Handbuch der physiologischen Optik ", *Encyklopädie der Physik*, L. L. Voss, Ed., 1867, pp. 298-325. [Online]. Available: <https://wellcomecollection.org/works/pb7v7uvr>

- [85] V. Viqueira Pérez, D. De Fez Saiz, and F. Martinez Verdú, "1 - Colour vision: theories and principles," in *Colour Measurement*, M. L. Gulrajani Ed.: Woodhead Publishing, 2010, pp. 3-e2.
- [86] M. Bertalmío, "Chapter 6 - Colour representation and colour gamuts," in *Vision Models for High Dynamic Range and Wide Colour Gamut Imaging*, M. Bertalmío Ed.: Academic Press, 2020, pp. 131-155.
- [87] R. E. W. Rafael C. Gonzales, "Color Models," *Digital Image Processing*, I. Pearson Education, Ed., Third Edition ed. New Jersey, 2007, pp. 401-414.
- [88] J. S. Setchell, "8 - Colour description and communication," in *Colour Design*, J. Best Ed.: Woodhead Publishing, 2012, pp. 219-253.
- [89] R. W. P. Hunt, M.R., F. P. Ltd, Ed. *Measuring Colour*, 4th ed ed. Kingston, UK, 1998.
- [90] A. K. R. Choudhury, "7.2.5.RGB colour spaces," in *Principles of Colour and Appearance Measurement*, A. K. R. Choudhury Ed.: Woodhead Publishing, 2014, ch. 7, pp. 270-317.
- [91] G. B. a. M. Charbit, "CMYK Coding ", *vol. 1, Digital signal and Image Processing using Matlab*, I. L. J. W. Sons, Ed., 2nd Edition ed. Great Britain and the Un it ed States, 2014.
- [92] A. K. R. Choudhury, "7.2.7. CMY colour spaces," in *Principles of Colour and Appearance Measurement*, A. K. R. Choudhury Ed.: Woodhead Publishing, 2014, pp. 270-317.
- [93] H. Blitzer, K. Stein-Ferguson, and J. Huang, "Color Space: The HSL and HSV color spaces," in *Understanding Forensic Digital Imaging*, H. Blitzer, K. Stein-Ferguson, and J. Huang Eds. Burlington: Academic Press, 2008, ch. CHAPTER 7 pp. 107-136.
- [94] E. Chavolla, D. Zaldivar, E. Cuevas, and M. A. Perez, "Color Spaces Advantages and Disadvantages in Image Color Clustering Segmentation:1.2 Perceptual Color Spaces," in *Advances in Soft Computing and Machine Learning in Image Processing*, A. E. Hassanien and D. A. Oliva Eds. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 3-22.
- [95] E. Chavolla, D. Zaldivar, E. Cuevas, and M. A. Perez, "Color Spaces Advantages and Disadvantages in Image Color Clustering Segmentation: 1.1 Additive Color Spaces," in *Advances in Soft Computing and Machine Learning in Image Processing*, A. E. Hassanien and D. A. Oliva Eds. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 3-22.
- [96] M. H. Penner, "Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectroscopy," in *Food Analysis*, S. S. Nielsen Ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 89-106.
- [97] M. J. Martelo-Vidal and M. Vázquez, "3 - Advances in Ultraviolet and Visible Light Spectroscopy for Food Authenticity Testing," in *Advances in Food Authenticity Testing*, G. Downey Ed.: Woodhead Publishing, 2016, pp. 35-70.
- [98] J. Claßen, F. Aupert, K. F. Reardon, D. Solle, and T. Scheper, "Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 409, no. 3, pp. 651-666, 2017/01/01 2017, doi: 10.1007/s00216-016-0068-x.

- [99] N. V. Tkachenko, "Chapter 5 - Steady State Absorption Spectroscopy," in *Optical Spectroscopy*, N. V. Tkachenko Ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2006, pp. 89-106.
- [100] A. C. Power, J. Chapman, S. Chandra, and D. Cozzolino, "6 - Ultraviolet-visible spectroscopy for food quality analysis," in *Evaluation Technologies for Food Quality*, J. Zhong and X. Wang Eds.: Woodhead Publishing, 2019, pp. 91-104.
- [101] É. Dufour, "Recent advances in the analysis of dairy product quality using methods based on the interactions of light with matter," *International Journal of Dairy Technology*, vol. 64, no. 2, pp. 153-165, 2011, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00665.x>.
- [102] G. Kaur, H. Singh, and J. Singh, "Chapter 2 - UV-vis spectrophotometry for environmental and industrial analysis," in *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Inamuddin, R. Boddula, and A. M. Asiri Eds.: Elsevier, 2021, pp. 49-68.
- [103] W. Măntele and E. Deniz, "UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 173, pp. 965-968, 2017/02/15/ 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>.
- [104] D. N. Barreto *et al.*, "UV/Vis-Based Optical Sensors for Gaseous and Volatile Analytes," in *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier, 2021.
- [105] A. Samokhvalov, "Analysis of various solid samples by synchronous fluorescence spectroscopy and related methods: A review," *Talanta*, vol. 216, p. 120944, 2020/08/15/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120944>.
- [106] R. R. de Souza, D. D. d. S. Fernandes, and P. H. G. D. Diniz, "Honey authentication in terms of its adulteration with sugar syrups using UV–Vis spectroscopy and one-class classifiers," *Food Chemistry*, vol. 365, p. 130467, 2021/12/15/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130467>.
- [107] S. Kiani, S. Minaei, and M. Ghasemi-Varnamkhasti, "Fusion of artificial senses as a robust approach to food quality assessment," *Journal of Food Engineering*, vol. 171, pp. 230-239, 2016/02/01/ 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.007>.
- [108] J. Tan and J. Xu, "Applications of electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue) in food quality-related properties determination: A review," *Artificial Intelligence in Agriculture*, vol. 4, pp. 104-115, 2020/01/01/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aiia.2020.06.003>.
- [109] C. YongXia *et al.*, "Quality evaluation based on color grading: quality discrimination of the Chinese medicine Corni Fructus by an E-eye," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 17006, 2019/11/18 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53210-5.
- [110] D. Wu and D. W. Sun, "6 - Food colour measurement using computer vision," in *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality*, D. Kilcast Ed.: Woodhead Publishing, 2013, pp. 165-195e.
- [111] D. Wu and D.-W. Sun, "Colour measurements by computer vision for food quality control – A review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 29, no. 1, pp. 5-20, 2013/01/01/ 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.08.004>.
- [112] J. F. S. Gomes and F. R. Leta, "Applications of computer vision techniques in the agriculture and food industry: a review," *European Food Research and*

- Technology*, vol. 235, no. 6, pp. 989-1000, 2012/12/01 2012, doi: 10.1007/s00217-012-1844-2.
- [113] S. Buratti, C. Malegori, S. Benedetti, P. Oliveri, and G. Giovanelli, "E-nose, e-tongue and e-eye for edible olive oil characterization and shelf life assessment: A powerful data fusion approach," *Talanta*, vol. 182, pp. 131-141, 2018/05/15/2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.096>.
- [114] S. Gunasekaran, "Computer vision technology for food quality assurance," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 7, no. 8, pp. 245-256, 1996/08/01/1996, doi: [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10028-5](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10028-5).
- [115] K. K. Patel, A. Kar, S. N. Jha, and M. A. Khan, "Machine vision system: a tool for quality inspection of food and agricultural products," (in eng), *J Food Sci Technol*, vol. 49, no. 2, pp. 123-141, 2012, doi: 10.1007/s13197-011-0321-4.
- [116] M. Z. Abdullah, "1 - Computer vision and infrared techniques for image acquisition in the food and beverage industries**Adapted from Computer vision technology for food quality evaluation, ed. Da-Wen Sun, Chapter 1, Image acquisition systems, pp. 3–35. Copyright (2007), with permission from Elsevier," in *Computer Vision Technology in the Food and Beverage Industries*, D.-W. Sun Ed.: Woodhead Publishing, 2007, pp. 3-26.
- [117] S. Dhanani and M. Parker, "8 - Sensor Processing for Image Sensors," in *Digital Video Processing for Engineers*, S. Dhanani and M. Parker Eds. Oxford: Newnes, 2013, pp. 53-59.
- [118] D. B. Hernández, "Métodos ópticos y electroquímicos para la detección de contaminantes en alimentos: Part C Image processing," Doctor en Ciencias, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, 2016. [Online]. Available: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3135>
- [119] D.-W. Sun, "Inspecting pizza topping percentage and distribution by a computer vision method," *Journal of Food Engineering*, vol. 44, no. 4, pp. 245-249, 2000/06/01/2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00024-8).
- [120] E. Richards, C. Bessant, and S. Saini, "Multivariate data analysis in electroanalytical chemistry," *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, vol. 14, no. 22, pp. 1533-1542, 2002.
- [121] M. Esteban, C. Arino, and J. Díaz-Cruz, "Chemometrics in electroanalytical chemistry," *Critical reviews in analytical chemistry*, vol. 36, no. 3-4, pp. 295-313, 2006.
- [122] R. B. D. Cruz, "Plataforma general para construcción, caracterización y prueba de biosensores y sensores químicos," Doctor en Ciencias, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Ciudad de México 2014. [Online]. Available: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3167>
- [123] D. Ballabio and R. Todeschini, "Chapter 4 - Multivariate Classification for Qualitative Analysis," in *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, D.-W. Sun Ed. San Diego: Academic Press, 2009, pp. 83-104.
- [124] X. Cetó, F. Céspedes, and M. del Valle, "Comparison of methods for the processing of voltammetric electronic tongues data," *Microchimica Acta*, vol. 180, no. 5-6, pp. 319-330, 2013.

- [125] A. I. G. Rocha, "Desarrollo de un pH-metro óptico para medidas in-situ," Maestría en Ciencias, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Ciudad de México 2016. [Online]. Available: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/2659>
- [126] J. Garson, "Connectionism. In: Zalta EN (ed), The Stanford Encyclopaedia of Philosophy ", ed, 2007.
- [127] R. J. Beale, T., "Neural computing, an introduction.," *IOP Publishing Ltd*, 1992. Bristol.
- [128] T. Fine, *Feedforward neural network methodology*. New York, 1999.
- [129] M. I. Pividori and S. Alegret, "Nuevos genosensores amperométricos," 2004.
- [130] Á. A. Arrieta, M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. D. Saja, "Voltametric electronic tongue application to wines classification and correlation study with the chemical and sensory characterization," *Química Nova*, vol. 33, no. 4, pp. 787-793, 2010.
- [131] G. S. J. Manuel, "Sistema de monitoreo en tiempo real para la cuantificación de compuestos en soluciones acuosas basado en lenguas electrónicas híbridas e inteligencia artificial " 2008, Ingeniería Eléctrica Sección Bioelectrónica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional México, D.F., 2008.
- [132] A. G. Santana Rayo, "Implementación de modelos multivaria en el procesamiento de señales de lenguas electrónicas," Maestría, Ingeniería Eléctrica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, México, D.F., 2013.
- [133] J. Hertz, Krogh, A., Palmer, R.G, *Introduction to the theory of neural computation*. Reedwood City, 1991.
- [134] J. Wu, J. Liu, M. Fu, G. Li, and Z. Lou, "Classification of Chinese Yellow Wines by Chemometric Analysis of Cyclic Voltammogram of Copper Electrodes," *Sensors*, vol. 5, no. 12, pp. 529-536, 2005.
- [135] J. A. Freeman, Skapura, D.M., , *Neural networks: algorithms, applications and programming techniques*. Redwood City, C.A., 1992.
- [136] X. Wu *et al.*, "Top 10 algorithms in data mining," *Knowledge and Information Systems*, vol. 14, no. 1, pp. 1-37, 2008/01/01 2008, doi: 10.1007/s10115-007-0114-2.
- [137] J. Hu, H. Peng, J. Wang, and W. Yu, "kNN-P: A kNN classifier optimized by P systems," *Theoretical Computer Science*, vol. 817, pp. 55-65, 2020/05/12/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2020.01.001>.
- [138] Q. Chaudhry *et al.*, "Chapter 4 - Algorithms for (Q)SAR model building/3.3. k-NN methods," in *Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) for Pesticide Regulatory Purposes*, E. Benfenati Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, pp. 111-147.
- [139] A. Srivastava, "Impact of K-Nearest Neighbour on Classification Accuracy in KNN Algorithm Using Machine Learning," in *Advances in Smart Communication and Imaging Systems*, Singapore, R. Agrawal, C. Kishore Singh, and A. Goyal, Eds., 2021// 2021: Springer Singapore, pp. 363-373.
- [140] *ColorQuest XE User's Manual*. [Online]. Available: <https://www.hunterlab.com/media/documents/colorquest-xe-user-manual.pdf>

- [141] Colorimeter SD-1(beer)/SD-2, China. [Online]. Available: <https://shyfinstruments.diytrade.com/sdp/1709993/4/pd-6383638/10073198-0/colorimeter.html>. Accessed: 28/06/2002.
- [142] I. PerkinElmer. LAMBDA 25/35/45 UV/Vis Spectrophotometers, PerkinElmer® [Online]. Available: https://resources.perkinelmer.com/corporate/cmsresources/images/44-74448bro_lambda.pdf
- [143] LabX. "Shimadzu UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer with Computer/Software." <https://www.labx.com/item/shimadzu-uv-1800-uv-vis-spectrophotometer-with-computer/13105340#description> (accessed).
- [144] V. Kakani, V. H. Nguyen, B. P. Kumar, H. Kim, and V. R. Pasupuleti, "A critical review on computer vision and artificial intelligence in food industry," *Journal of Agriculture and Food Research*, vol. 2, p. 100033, 2020/12/01/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100033>.
- [145] S. Bayarri, C. Calvo, E. Costell, and L. Durán, "Influence of Color on Perception of Sweetness and Fruit Flavor of Fruit Drinks," *Food Science and Technology International*, vol. 7, no. 5, pp. 399-404, 2001, doi: 10.1106/jjwn-ffrq-jbmc-lq5r.
- [146] R. Fernández-Vázquez, C. M. Stinco, A. J. Meléndez-Martínez, F. J. Heredia, and I. M. Vicario, "Visual and Instrumental Evaluation of orange juice color: a consumers' preference study " *Journal of Sensory Studies*, vol. 26, no. 6, pp. 436-444, 2011, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2011.00360.x>.
- [147] S. Buratti, S. Benedetti, and G. Giovanelli, "Application of electronic senses to characterize espresso coffees brewed with different thermal profiles," *European Food Research and Technology*, vol. 243, no. 3, pp. 511-520, 2017/03/01 2017, doi: 10.1007/s00217-016-2769-y.
- [148] Y. Wang, L. Li, Y. Liu, Q. Cui, J. Ning, and Z. Zhang, "Enhanced quality monitoring during black tea processing by the fusion of NIRS and computer vision," *Journal of Food Engineering*, vol. 304, p. 110599, 2021/09/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110599>.
- [149] C. Apetrei, I. M. Apetrei, S. Villanueva, J. A. de Saja, F. Gutierrez-Rosales, and M. L. Rodriguez-Mendez, "Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness," *Analytica Chimica Acta*, vol. 663, no. 1, pp. 91-97, 2010/03/17/ 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.034>.
- [150] A. Figueroa, J. Caballero-Villalobos, E. Angón, R. Arias, A. Garzón, and J. M. Perea, "Using multivariate analysis to explore the relationships between color, composition, hygienic quality, and coagulation of milk from Manchega sheep," *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 6, pp. 4951-4957, 2020, doi: 10.3168/jds.2019-17201.
- [151] S. Shafiee, S. Minaei, N. Moghaddam-Charkari, M. Ghasemi-Varnamkhasti, and M. Barzegar, "Potential application of machine vision to honey characterization," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 30, no. 2, pp. 174-177, 2013/04/01/ 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.12.004>.
- [152] O. H. A. Abildgaard *et al.*, "Non-Invasive Assessment of Dairy Products Using Spatially Resolved Diffuse Reflectance Spectroscopy," *Applied Spectroscopy*, vol. 69, no. 9, pp. 1096-1105, 2015/09/01 2015, doi: 10.1366/14-07529.

- [153] M. L. G.-M. Martin, W. Ji, R. Luo, J. Hutchings, and F. J. Heredia, "Measuring colour appearance of red wines," *Food Quality and Preference*, vol. 18, no. 6, pp. 862-871, 2007/09/01/ 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.01.013>.
- [154] L. G. C. L. Ming Ronnier Luo, Derby (GB); Guihua Cui, Derby (GB), "Apparatus and method for measuring colour: DIGIEYE PLC," United States, 2005. [Online]. Available: <https://patentimages.storage.googleapis.com/03/bc/94/3346ac5a59c52f/US20050018191A1.pdf>
- [155] J. M. Andrade, D. Ballabio, M. P. Gómez-Carracedo, and G. Pérez-Caballero, "Nonlinear classification of commercial Mexican tequilas," *Journal of Chemometrics*, vol. 31, no. 12, p. e2939, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/cem.2939>.
- [156] A. Rinaldi, M. Coppola, and L. Moio, "Aging of Aglianico and Sangiovese wine on mannoproteins: Effect on astringency and colour," *LWT*, vol. 105, pp. 233-241, 2019/05/01/ 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.034>.
- [157] M. Monagas, P. J. Martín-Álvarez, B. Bartolomé, and C. Gómez-Cordovés, "Statistical interpretation of the color parameters of red wines in function of their phenolic composition during aging in bottle," *European Food Research and Technology*, vol. 222, no. 5, pp. 702-709, 2006/03/01 2006, doi: 10.1007/s00217-005-0037-7.
- [158] Q. Ouyang, J. Zhao, and Q. Chen, "Instrumental intelligent test of food sensory quality as mimic of human panel test combining multiple cross-perception sensors and data fusion," *Analytica Chimica Acta*, vol. 841, pp. 68-76, 2014/09/02/ 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.001>.
- [159] D. D. de Sousa Fernandes, V. E. de Almeida, M. M. Fontes, M. C. U. de Araújo, G. Vêras, and P. H. G. D. Diniz, "Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA," *Food Chemistry*, vol. 273, pp. 77-84, 2019/02/01/ 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.035>.
- [160] L. P. d. S. Benedetti, V. B. dos Santos, T. A. Silva, E. B. Filho, V. L. Martins, and O. Fatibello-Filho, "A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks," *Analytical Methods*, 10.1039/C5AY00529A vol. 7, no. 10, pp. 4138-4144, 2015, doi: 10.1039/C5AY00529A.
- [161] A. I. Anita Martinovic Bevanda, Stanislava Talic, Antonio Stipanovic, Danijela Petrovic, "Determination of Ethanol in Wine and Distilled Alcoholic Beverages Using a Smartphone as a Detector," *International Journal of Computational and Theoretical Chemistry*, vol. 9, no. 2, pp. 43-47, 2021, doi: 10.11648/j.ijctc.20210902.13
- [162] W. Burger and M. J. Burge, "Histograms and Image Statistics," in *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction*, W. Burger and M. J. Burge Eds. Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 29-48.
- [163] *Digital Lux Meter Intruction Manual NW1130B*, NW Formations GmbH.
- [164] L. Li, J. Wang, S. Yang, and H. Gong, "Binocular stereo vision based illuminance measurement used for intelligent lighting with LED," *Optik*, vol. 237, p. 166651, 2021/07/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2021.166651>.

- [165] R. G. Congalton, "A review of assessing the accuracy of classifications of remotely sensed data," *Remote Sensing of Environment*, vol. 37, no. 1, pp. 35-46, 1991/07/01/ 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(91\)90048-B](https://doi.org/10.1016/0034-4257(91)90048-B).
- [166] T.-T. Wong, "Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation," *Pattern Recognition*, vol. 48, no. 9, pp. 2839-2846, 2015/09/01/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2015.03.009>.
- [167] S. G. Ceballos-Magaña *et al.*, "Characterisation of tequila according to their major volatile composition using multilayer perceptron neural networks," *Food Chemistry*, vol. 136, no. 3, pp. 1309-1315, 2013/02/01/ 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.048>.
- [168] H. P. i. S.-O. Worldwide. "Calibration standards to check the wavelength accuracy." https://www.microlabtech.co.uk/documents/literature/Calibration_Standards_Catalogue.pdf (accessed 4/10/2022).