



INAOE

Evaluación Espectral Difusa y Raman de la lechuga (*Parris Island Parris starfighter*), para la Cuantificación de Clorofila y Detección de Azúcar.

Por:

Lic. Leopoldo José Ramírez Landaeta

Tesis sometida como requisito parcial
para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

en el

Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica

agosto, 2023
Tonantzintla, Puebla

Dirigida por:

Dr. Jorge Castro-Ramos*

*INAOE

Co asesor

Dr. Freddy Narea Jimenez⁺

⁺ITSAO

©INAOE 2023

Derechos reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de
reproducir esta tesis en su totalidad o en partes



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi esposa Auribeth, que siempre me apoya en los momentos difíciles, y a mi hija Miranda, que siempre me ayuda a sonreírle a la vida. A mi hermano: Jesús Abraham. A mis padres: Leida y Leopoldo por su cariño y apoyo.

Además de mi familia, quiero agradecer a mi asesor Jorge Castro Ramos por el apoyo continuo en mi tesis de maestría. Por su paciencia, motivación, inmenso conocimiento, y sobre todo por esa gran amistad que me brindó. Su guía me ayudó durante todo el tiempo de investigación y redacción de esta tesis. No podría haber imaginado realizar esta investigación sin su apoyo.

A mi comité de posgrado: Dr. Jorge Castro Ramos, Dr. Alexis Vázquez Villa, Dr. Juan Jaime Sánchez Escobar, Dr. J. Félix Aguilar Váldez y Dr. Freddy Narea Jiménez, por su aliento, comentarios esclarecedores y aportes para mejorar esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento también va para:

Dr. Aáron Muñoz, Dr. Hector Nahum Chavarría Lizárraga, Dra. Caroleni Villalba Hernández, Dr. Luis Enrique Puga, Dr. Nelson Falcón Veloz, Dr. Martin Torres, MSc. Jeiny Erédia Ríos, MSc. Rebeca Bruzual Roa, MSc. Eréndira Vázquez Palacios, MSc. Alejandra López por su apoyo, ayuda y amistad.

Sabiendo que no habrá forma de agradecer una vida de sacrificio, esfuerzo y amor, quiero que sientan que la meta alcanzada es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a lograrla fue su gran apoyo.

Finalmente, agradezco al hermoso pueblo Mexicano, CONAHCyT e INAOE por su apoyo durante la realización de esta Maestría.

Leopoldo José Ramírez Landaeta.

“Todo comenzó porque alguien se preguntó, que es la Luz? .”

Anónimo.

DEDICATORIA

Al *Gran Arquitecto de la Creación* que es donde habito y tengo mi ser
A mi familia quien siempre me apoya
A las personas que han estado conmigo en este momento
A mi esposa *Auribeth Pérez* por su apoyo incondicional durante toda la vida
A mi hija *Miranda Ramírez Pérez* por alegrarme cada día
A mi madre *Leida Landaeta* por brindarme su cariño y bendiciones
A mi Padre *Leopoldo José Ramírez*, por enseñarme la nobleza de la vida ...



ABSTRACT

El estudio de vegetales y hortalizas ha sido siempre de vital importancia, debido al impacto que tienen en la alimentación humana y en la industria agrícola. El análisis de las propiedades físicas, químicas y ópticas de estos productos es esencial para monitorear y garantizar su calidad, frescura y valor nutricional. En este contexto, la cuantificación de la clorofila y la detección de azúcar se han convertido en aspectos fundamentales para evaluar la salud y la madurez de los cultivos, así como para optimizar los procesos de producción y almacenamiento.

Para lograr este cometido se describen y explican técnicas ópticas para cuantificar los componentes biológicos de lechugas cultivadas en un medio hidropónico utilizando la técnica NFT (Nutrient Film Technique). El objetivo principal es cuantificar la concentración de clorofila y detectar el contenido de azúcar en dos variedades de lechuga (*Lactuca orejona*, Var: Parris Island y *Lactuca italiana*, Var: Parris Starfighter) durante sus ciclos de crecimiento, empleando técnicas ópticas no destructivas colorimétricas y espectrofotométricas como la Reflectancia Difusa, Absorbancia y espectroscopia Raman.

El estudio proporciona información detallada sobre el estado fisiológico de las plantas de lechuga resaltando una investigación que contribuye a la agronomía y la producción de alimentos, al ofrecer métodos no destructivos y precisos para evaluar la calidad de las lechugas cultivadas en sistemas hidropónicos NFT.

Palabras clave: hidroponía, NFT, cuantificación de clorofila, detección de azúcar, reflectancia difusa, espectroscopía Raman, cultivo de lechuga, análisis no destructivo.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ERD: Espectroscopía de Reflectancia Difusa

STD: Desviación Estándar

SSA: Singular Spectrum Analysis

Red Edge: Coeficiente relacionado a la presencia de clorofila

NTF: Nutrient Film Technique (técnica de la película de nutriente)

MSC: Multiplicative scatter correction (Corrección de dispersión multiplicativa)

U.A: Unidades Arbitrarias

FWHM: Full Width at Half Maximum (Ancho completo a la mitad del máximo)

PRÓLOGO

Es un gran honor y satisfacción presentarles este prólogo de la tesis de maestría titulada: **Evaluación Espectral Difusa y Raman de la lechuga Parris Island Parris starfighter), para la Cuantificación de Clorofila y Detección de Azúcar**. Esta obra representa un paso importante en la investigación científica y el desarrollo de técnicas innovadoras en el campo de la agronomía y la ciencia de los alimentos.

El estudio de los vegetales y las hortalizas ha sido siempre de vital importancia debido a su impacto directo en la alimentación humana y en la industria agrícola. El análisis preciso y no destructivo de las propiedades de estos productos es esencial para garantizar su calidad, frescura y valor nutricional. En este contexto, la cuantificación de la clorofila y la detección de azúcar se han convertido en aspectos fundamentales para evaluar la salud y la madurez de los cultivos, así como para optimizar los procesos de producción y almacenamiento.

El presente trabajo de investigación se enfoca en la aplicación de técnicas espectroscópicas avanzadas, específicamente la espectroscopia de reflectancia difusa y Raman, para llevar a cabo la evaluación precisa de vegetales y hortalizas. Estas técnicas no destructivas permiten obtener información espectral valiosa sobre las muestras en estudio, brindando datos sobre su composición química y propiedades físicas.

La evaluación espectral difusa es una herramienta poderosa en la caracterización de los vegetales y las hortalizas, ya que se basa en la medición de la luz reflejada por las muestras a diferentes longitudes de onda. Este enfoque ha permitido establecer correlaciones entre las características espectrales y los parámetros bioquímicos de interés, como la concentración de clorofila y caratenoides. De esta manera, se ha logrado desarrollar modelos predictivos confiables para la cuantificación de estos compuestos, ofreciendo una alternativa no invasiva y eficiente a los métodos tradicionales de laboratorio.

Por otro lado, la espectroscopia Raman ha sido una técnica prometedora en el campo de la ciencia de los alimentos, ya que proporciona información detallada sobre las vibraciones moleculares de los componentes presentes en las muestras. Su aplicación en la evaluación de vegetales y hortalizas ha permitido detectar y cuantificar azúcares, que desempeñan un papel fundamental en la calidad y el sabor de estos productos. La combinación de ambas técnicas espectroscópicas ofrece un enfoque integral y complementario para la caracterización de las muestras vegetales, brindando resultados precisos y confiables.

A lo largo de esta tesis de maestría, el autor ha llevado a cabo una exhaustiva revisión de la literatura científica actualizada, ha diseñado experimentos rigurosos y ha recopilado datos de espectros de reflectancia difusa y Raman de una amplia variedad de vegetales y hortalizas. Mediante el análisis estadístico y el desarrollo de modelos de calibración, se ha logrado establecer relaciones cuantitativas entre los espectros y las concentraciones de clorofila y azúcares presentes en las muestras. Además, se ha aplicado la colorimetría a partir de los espectros de reflectancia difusa para complementar el análisis de las muestras.

La colorimetría es una técnica de medición que se basa en la percepción del color por parte del ojo humano. En el contexto de esta investigación, se ha utilizado para cuantificar y analizar de manera objetiva los cambios en el color de las muestras vegetales. A partir de los espectros de reflectancia difusa obtenidos, se han calculado los parámetros de color relevantes, como la luminosidad, la saturación o Croma, Coordenadas cromáticas ($L^*a^*b^*$, $L^*C^*h^*$). Estos parámetros han proporcionado información adicional sobre las propiedades colorimétricas de los vegetales y las hortalizas, en relación con la presencia de clorofila.

La combinación de la espectroscopia de reflectancia difusa, la espectroscopia Raman y la colorimetría ha permitido un enfoque holístico en la evaluación de los vegetales y las hortalizas. Estas técnicas han brindado información complementaria y han permitido obtener una caracterización más completa de las muestras, tanto desde el punto de vista químico como visual.

Los resultados obtenidos a través de esta investigación abren nuevas perspectivas en la aplicación de técnicas espectroscópicas en el campo de la agronomía y la ciencia de los

alimentos. Estos avances podrían tener un impacto significativo en la optimización de los procesos de producción, la evaluación de la calidad de los cultivos y la detección temprana de enfermedades o deficiencias nutricionales.

En conclusión, esta tesis de maestría representa un valioso aporte al conocimiento científico en el ámbito de la evaluación de vegetales y hortalizas. Los resultados obtenidos y las metodologías desarrolladas constituyen una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones en la industria agrícola y alimentaria.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
DEDICATORIA	V
1. EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes y justificación.	3
1.3. Propuesta de tesis	5
1.4. Pregunta de Investigación e hipótesis.	5
1.4.1. Hipótesis:	5
1.5. Objetivos de la investigación	6
1.5.1. Objetivo general	6
1.5.2. Objetivos específicos	6
2. HIDROPONÍA	9
2.1. Hidroponía	9
2.1.1. Ubicación Geográfica	11
2.1.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento	11
2.1.3. Sistema Hidropónico	12
2.1.4. Sustrato	15
2.1.5. Semillas	16
2.1.6. Sistema de Riego	17
2.1.7. Invernaderos	18
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1. Marco Teórico del Objeto de Estudio	21
3.1.1. Lechuga, taxonomía y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico	21
3.1.2. Introducción	21

3.1.3.	Origen y generalidades de la Lechuga	22
3.1.4.	Botánica, Taxonomía y morfología de la Lechuga	22
3.1.5.	Caracteres morfológicos de la Lechuga	24
3.1.6.	Caracteres fisiológicos de la Lechuga	25
3.1.7.	Semilla y germinación	25
3.1.8.	Crecimiento y desarrollo	26
3.1.9.	Requerimiento de la Lechuga	27
3.1.10.	Principales variedades de Lechuga.	28
3.1.11.	Pigmentos Fotosíntesis	28
3.2.	Marco Teórico: Absorción y Colorimetría	29
3.2.1.	Absorción de la luz	29
3.3.	Color, coordenadas cromáticas y reflectancia espectral $R(\lambda)$	31
3.3.1.	Color	31
3.3.2.	Coordenadas Cromáticas	32
3.3.3.	Cálculo de las coordenadas a partir de $R(\lambda)$	39
3.3.4.	Coordenadas cromáticas de la clorofila.	45
3.4.	Utilidad y Comportamiento de las firmas espectrales de reflectancia difusa en vegetales.	48
3.4.1.	Colores orgánicos en la vegetación y La lumínica de los pigmentos	51
3.4.2.	Fotosistemas.	53
3.5.	Cromatografía de Papel	55
3.6.	Espectroscopía	57
3.6.1.	Espectrofotometría de Reflectancia Difusa	57
3.6.2.	Aplicación de corrección MSC en espectros de reflectancia difusa.	60
3.6.3.	Esparcimiento Espectroscopia Raman.	62
3.6.4.	Fundamento de Espectroscopia Raman	63
4.	METODOLOGÍA Y MATERIALES	69
4.0.1.	Planificación de las mediciones	69
4.0.2.	Muestra Biológica sujeta a Estudio	70
4.0.3.	Montaje experimental con Espectroscopía de Reflectancia Difusa	70
4.0.4.	Procedimiento experimental	71
4.0.5.	Espectrómetro OceanOptic USB 4000	71
4.0.6.	Componentes del espectrómetro OceanOptic USB 4000	72
4.0.7.	Características del espectrómetro OceanOptic USB 4000	73
4.0.8.	Software SPECTRASUITE	74

4.0.9.	Obtención de los Espectros de Reflectancia Difusa de lechugas Italianas y Orejonas.	75
4.1.	Arreglo Experimental Espectroscopia Raman	77
4.1.1.	Espectrómetro QE65000	77
4.1.2.	Componentes del espectrómetro QE65000	78
4.1.3.	Características del espectrómetro QE6500	79
4.1.4.	Obtención de los Espectros Raman.	79
5.	RESULTADOS	81
5.0.1.	Resultados obtenidos de Hidroponía.	82
5.0.2.	Resultados obtenidos usando Espectroscopia de Reflectancia Difusa.	83
5.0.3.	Resultados obtenidos usando Colorimetría.	90
5.0.4.	Resultados obtenidos usando Absorbancia Relativa.	100
5.0.5.	Resultados usando Espectroscopia Raman.	102
5.0.6.	Resultados obtenidos usando Cromatografía de Partición.	107
6.	CONCLUSIONES	111
6.1.	Conclusiones	111
6.2.	Trabajos Futuros	112

LISTA DE FIGURAS

	Página
1.1. <i>Área cosechada y producción de Lechuga 2008 – 2018: Fuente: Elaboración CEDRSSA con la Base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura.</i>	2
2.1. <i>Esquema de un sistema hidropónico.</i>	9
2.2. <i>Sistema N.F.T (NUTRIENT FILM TECHNIQUE) para Lechugas, Imagen propia.</i>	12
2.3. <i>Tipos de Sistemas Hidropónicos.</i>	13
2.4. <i>Tipos de Sustratos.</i>	15
2.5. <i>Sustrato Sintético (Espuma fenólica) instalada en la canasta hidropónica.</i> . . .	15
2.6. <i>Tipos de Semillas: a) Semillas Criollas, b) Semillas Mejoradas, c) Semillas híbridas</i>	16
2.7. <i>Proceso de instalación de invernadero, sistema hidropónico y sistema de riego.</i>	17
2.8. <i>Tipos de Invernaderos y su orientación.</i>	19
3.1. <i>Raíz, tallo, hoja e inflorescencia de la lechuga.</i>	23
3.2. <i>Etapas del proceso de germinación de una semilla de lechuga.</i>	26
3.3. <i>Estados de crecimiento de la planta de lechuga</i>	26
3.4. <i>Requerimiento de la Lechuga</i>	27
3.5. <i>Variedades de Lechuga</i>	28
3.6. <i>Esquema de la Ley empírica de Lambert-Beer</i>	30
3.7. <i>Círculo cromático.</i>	32
3.8. <i>Representación gráfica del espacio de color L*a*b*.</i>	36
3.9. <i>El sistema de color Munsell muestra: un círculo de matices con un valor de 5 croma 6; los valores neutros de 0 a 10; y los cromas de purpura-azul (5PB) al valor 5. Representación gráfica del espacio de color L* C* h*.</i> .	37
3.10. <i>Diagrama bidimensional de color L*a*b* y L*C*h*.</i>	38

3.11. Descriptores de color para cambios de tono y croma. El fondo de color tiene una constante $L^*=70$,	38
3.12. a) Iluminante A, es una tabla de energía relativa por cada franja de 10 en 10 nm entre los 300 y los 830 nm. Es un intento de describir la iluminación de una típica bombilla de filamento incandescente. b) Iluminante D50, es una tabla de energía relativa por cada franja de 10 en 10 nm entre los 300 y los 830 nm, describe las condiciones medias de iluminación en un mediodía en Europa Occidental, con una temperatura de color de 5000 K. c) Iluminante D65, es una tabla de energía relativa por cada franja de 10 en 10 nm entre los 300 y los 830 nm, El iluminante D65 describe las condiciones medias de iluminación en un mediodía en Europa Occidental, con una temperatura de color de 6500 K	40
3.13. En el gráfico se ven las funciones de correspondencia o igualación de colores (colour matching functions: CMF) para los primarios CIE XYZ. Esas son literalmente las cantidades de los tres primarios que un observador promedio necesitará para igualar una unidad de luz en cada longitud de onda.	41
3.14. Representación esquemática del paso de reflectancias a coordenadas cromáticas.	42
3.15. Curva de validación entre programa comercial y programa realizado en Matlab.	43
3.16. Diagrama de flujo del programa realizado en Matlab para cálculo de parámetros colorimétricos.	44
3.17. Vista microscópica de los cloroplastos.	46
3.18. Reflectancia espectral de la clorofila a y b.	46
3.19. Diagrama Lab donde se representan, con dos rombos, las coordenadas cromáticas de las clorofilas, siendo "a" la más próxima al origen.	47
3.20. Respuesta espectral característica de la vegetación verde.	49
3.21. Comportamiento de los espectros dependiendo del estado de la hoja.	50
3.22. Superposición de espectros de absorción de las clorofilas a y b, el beta-caroteno y la enina, una antocianina típica. Mientras que las clorofilas y el beta caroteno absorben en las partes azul y amarillo/rojo del espectro visible, la enina absorbe principalmente en la parte verde del espectro, donde las clorofilas no absorben nada.	51
3.23. Colores Orgánicos en las Plantas.	52
3.24. Esquema general de los fotosistemas en el proceso de fotosíntesis.	53

3.25. Cromatografía planar o de papel: (1). Cámara cromatográfica, (2). Fase estacionaria, (3). frente de solvente, (4). fase móvil.	55
3.26. Configuración típica de reflexión difusa	58
3.27. Interacción de la luz con la materia, Reflectancia Difusa.	59
3.28. Diagrama energético en el que la líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones Luz-Materia	64
3.29. Esparcimiento Raman. Un haz incidente violeta y un haz emergente verde, resultado de las vibraciones moleculares de la sustancia iluminada (agua carbonatada y azúcar).	66
4.1. Esquema general de los Experimentos Realizados.	70
4.2. Montaje experimental para la realización de la toma de la firma espectral de las variantes de lechugas, donde se observa la dos variantes de lechugas, el espectrómetro Ocean Optics USB4000, la fibra recolectora de luz, fuente de halógeno y laptop.	71
4.3. Componentes del espectrómetro OceanOptic USB 4000	72
4.4. Pantalla del Software SpectraSuite, mostrando un espectro de Reflectancia Difusa.	75
4.5. Elección de la separación óptima entre la muestra y la fibra recolectora del espectrómetro	76
4.6. Estándar de reflectancia difusa	76
4.7. Componentes del espectrómetro	78
5.1. a) Autor en proceso de monitoreo , Instalación de invernadero y construcción de sistema NFT, b) Imágenes representativas de los momentos de la obtención de las firmas espectrales diarias en sus periodos de crecimientos.	82
5.2. Espectro reflectancia difusa para lechuga seca, madura y bajo estrés hídrico.	84
5.3. Espectros de reflexión difusa de la lechuga <i>Italiana</i> y <i>Orejona</i> : a) y e) Espectros ERD sin procesar, b) y f) Espectros ERD promedio con picos y filtrado, c) y g) Espectro corregido y filtrado, d) y h) Espectros suavizados por Savitzky-Golay y tratados con MSC después de la conversión a absorbancia aparente usando $\log(1/R)$	86

5.4. Espectros de reflexión difusa de la lechuga <i>Italiana</i> : a) Enero, b) Febrero y c) Marzo, Espectros de reflexión difusa de la lechuga <i>Orejona</i> : d) Enero, e) Febrero y f) Marzo	87
5.5. Reflectancia espectral (Superior) y primera derivada de la reflectancia (Inferior) para hojas sanas. Se indican las principales longitudes de onda utilizadas en los índices de reflectancia fisiológica: 430 y 445 nm para carotenoides; 531 y 570 nm para xantófilas; 550-680 nm y posición de Red Edge para la clorofila; 700-800 nm para pigmentos marrones; 800 y 900 nm como longitudes de onda de referencia estructural; 970 nm para agua.	88
5.6. 1ra derivada de la reflectancia difusa de la lechuga <i>Italiana</i> : a) 27 de Enero, b) 30 de Enero y c) 31 de Enero.	90
5.7. a) Coordenadas (L^* , a^* y b^*) 2D, b) Parámetro a^* , c) Parámetro b^* , d) Cromo (Saturación), e) Hue (Color) y f) Luminosidad, Mes Enero a Marzo para las lechugas Italianas.	92
5.8. a) Coordenadas (L^* , a^* y b^*) 2D, b) Parámetro a^* , c) Parámetro b^* , d) Cromo (Saturación), e) Hue (Color) y f) Luminosidad, Mes Enero a Marzo para las lechugas Orejonas.	93
5.9. Variación de Concentraciones en [mg/cm^2] de Clorofilas a y b durante los 58 días de cultivo para: a) Lechuga Italiana, c) Lechuga Orejona; Variación de Concentraciones de Carotenoides en [mg/cm^2] durante los 58 días de cultivo para: b) Lechuga Italiana, d) Lechuga Orejona.	95
5.10. a) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a Lechuga Italiana, b) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b Lechuga Italiana, c) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a Lechuga Orejona, d) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b Lechuga Orejona	98
5.11. Espectros de absorción específicos de clorofila total.	100
5.12. Espectros de absorción específicos de clorofila a y clorofila b.	101
5.13. Concentraciones de Clorofila a y b para lechuga Italiana y Orejona. Calculadas del conjunto de ecuaciones 5.2	101
5.14. Cubeta con la solución de Clorofila, extraída de lechuga Italiana y Orejona.	102
5.15. Espectro Raman con los picos de mayor intensidad, para la muestra: a) <i>Chlorella Vulgaris</i> , b) Fructosa, c) Glucosa, d) Sacarosa, e) <i>Chlorella Vulgaris</i> + Fructosa.	103
5.16. Espectro Raman Lechuga Orgánica diferentes fases + <i>Chlorella</i> , se señalan con etiquetas algunos picos de Fructosa y caratenoides.	104

5.17. Espectro Raman Lechuga Icerberg + Chlorella, se señalan con etiquetas algunos picos de Chlorella y caratenoides.	105
5.18. Espectro Raman Lechuga Italiana Hidropónica + Chlorella, se señalan con etiquetas algunos picos de Fructosa y caratenoides.	106
5.19. Preparación de Separación de Pigmentos.	107
5.20. Separación de Pigmentos fotosintéticos en lechuga Italiana.	108
5.21. Comparación de Separación de Pigmentos fotosintéticos en lechuga Italiana.	109

LISTA DE TABLAS

	Página
2.1. <i>Comparación sistema tradicional versus sistema hidropónico.</i>	10
2.2. Uso de Invernaderos. Fuente Propia	19
3.1. Valores triestímulo XYZ y coordenadas cromáticas (L*a*b*) y (L*C*h*) de las clorofilas a y b.	47
5.1. Coordenadas CIELAB (L*, a*, b*) Promedio total del cultivo, Espacio de Color Lechuga Italiana y Orejona.	94
5.2. Coordenadas LCh Promedio total del cultivo, Espacio de Color Lechuga Italiana y Orejona.	95
5.3. Concentraciones Promedio de Clorofila a, b y Caratenoides [mg/cm ²] .	96
5.4. Correlación entre parámetros ópticos y concentración de clorofila a y clorofila b	99
5.5. Picos Prominentes Raman de las Azúcares.	104

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

En este capítulo se presentan los antecedentes y la justificación de la investigación, brindando el contexto necesario para comprender la relevancia del tema abordado. Además, se expondrá la propuesta de tesis, estableciendo el enfoque y los aspectos que se abordarán en el desarrollo del trabajo. Se sientan las bases fundamentales para el desarrollo de la tesis, al contextualizar y justificar la necesidad de llevar a cabo la investigación. Asimismo, establece la dirección y los objetivos específicos que se persiguen, proporcionando un marco teórico y conceptual sólido para el análisis y la conclusión del estudio.

1.1. Introducción

Las hortalizas, constituyen un alimento fundamental por su alto contenido nutricional conformado por agua, fibra, minerales y aporte de vitaminas, además de que sostienen una baja densidad de calorías y carecen de grasas contribuyendo a formar parte indispensable de la dieta de los humanos. El Sistema Nacional de Información Agroalimentaria y Pesquera [1], clasifica las hortalizas por las partes que son comestibles de la planta, existiendo cinco grupos: el primer grupo, las de raíz caracterizadas por ser plantas de órganos ramificados y vegetativos que se desarrollan debajo de la tierra, teniendo como función principal la absorción del agua y nutrientes que se encuentran en el suelo, misma que se incorporan a la planta por ejemplo la zanahoria, rabo, nabo y betabel. En el segundo grupo están las hortalizas de flor o coles, siendo ejemplo precisamente la coliflor y el brócoli; el tercer grupo son las hortalizas de hoja que son consumidas por sus hojas, las cuales tienen un alto contenido de vitaminas A, C, complejo B, E y K, además de aportar calcio y hierro; el cuarto grupo son las de bulbos que tienen un tallo corto formado por hojas carnosas las cuales ayudan a la planta al almacenamiento de nutrientes para su crecimiento, y son de forma redonda u ovalada,

contienen minerales, vitaminas y fibra; los bulbos más conocidos son el ajo y la cebolla, alimentos utilizados en la mayoría de las cocinas mexicanas; finalmente, el grupo de frutos caracterizadas por tener consistencia de piel gruesa tales como el tomate y la calabaza.

Las hortalizas y vegetales presentan una amplia variación de clases de pigmentos, contenido en sus hojas, variedad de colores, texturas, tamaños y diferentes ciclos de crecimientos, que imponen dificultades para su clasificación. En la actualidad México se ubica en el noveno lugar con 486,440.0 toneladas, cantidad que ha mostrado un aumento en relación con años anteriores; en 2008 México registró una producción de 284,709.0 toneladas, cultivadas en un área de aproximadamente 15,000 ha como se muestra en la figura 1.1, debido al incremento en la demanda por parte de mercados que se han vuelto más selectivos ya que es una de las hortalizas más fáciles de consumir por el modo de preparación y por la implementación de sistemas que permiten una mayor producción de este cultivo; del mismo modo se da un saldo favorable en el área cosechada, traducido en la obtención de altos rendimientos en base a la superficie sembrada.

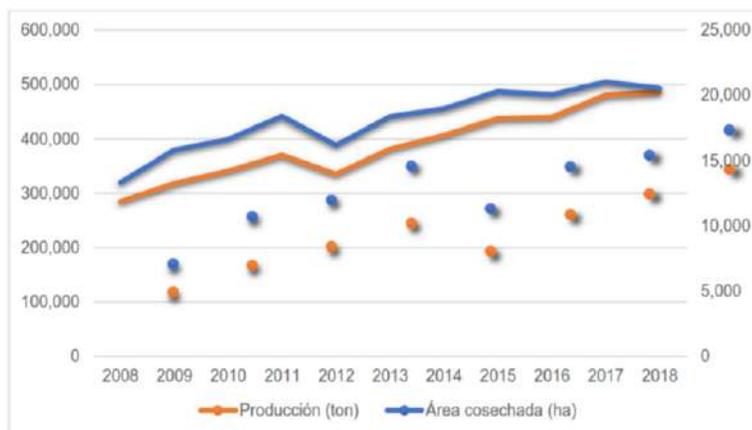


Figura 1.1: Área cosechada y producción de Lechuga 2008 – 2018: *Fuente: Elaboración CEDRSSA con la Base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura.*

Por lo tanto, el uso de técnicas espectrales se ha vuelto esencial para una mejor clasificación [2][3], brindando mediciones no destructivas, rápidas y precisas de clorofila [4][5], estrés de la planta [6], valores nutricionales y fenotipado [5]. En base a esto, el objetivo de este estudio es realizar la evaluación espectrales por medio de espectroscopia de reflectancia difusa y estudio colorimétrico de variedades de lechuga a lo largo de su ciclo de crecimiento, producidas en México, para optimizar sus ciclos de manera que se

pueda mejorar el promedio mensual de cosecha, cabe destacar que lechuga en México es durante todo el año, aunque la época de siembra varía de acuerdo con la zona, sin embargo, debido a estilo de siembra, se realiza de tal manera que cada mes se está haciendo la cosecha de la lechuga para satisfacer la demanda de la población.[7]

Por lo dicho anteriormente los avances tecnológicos en el desarrollo de tecnologías biofotónicas han llevado a la investigación de metodologías que pueden usarse potencialmente para discriminar entre lechuga recién cortada (frescura) usando reflectancia difusa, lechugas decoloradas por medio de técnicas colorimétricas [8], acidez o pH, morfología a través de la tomografía óptica coherente (OCT) [9] y otro parámetro o característica saludable, el uso futuro de estas técnicas, generaran resultados que pueden respaldar el desarrollo de un análisis rápido con procedimientos semiautomáticos de manera repetible, rápida y objetiva que pueda integrarse en granjas y centros de distribución [2],[3].

Ahora, el sistema de apoyo al cultivo con función de detección de alta precisión debe desarrollarse para que el agricultor controle la forma de cultivo en función de la información detectada desde el punto de vista económico y la información sobre la condición de crecimiento de los productos agrícolas adjuntos con la ubicación del campo, el tiempo de cosecha previsto, la garantía de calidad del rendimiento previsto, y pronto, debe estar abierta al canal de flujo de los cultivos a través de la red informática para que los consumidores puedan obtener la información suficiente sobre sus cultivos para seleccionar los mejores materiales [10].

Entre las técnicas ópticas con mayor impacto en las mediciones no invasivas de clorofila [4],[5], estrés de la planta [6], valores nutricionales y fenotipado [5], entre otras, se encuentran la Reflectancia Difusa y Espectroscopia Raman la cual es una técnica ponderosa para identificar la composición natural de los materiales, es también usada para cuantificar las sustancias presentes. Recientemente la reflectancia difusa ha sido utilizada en tejido vegetal para diagnosticar enfermedades, decoloración, variedades, clasificación de la lechuga [3].

1.2. Antecedentes y justificación.

La principal motivación del porque investigar sobre los vegetales y en particular la lechuga *Lactuca sativa L.*, es debido, al historial de producción de este vegetal por parte de Los Estados Unidos de México en relación al mundo, siendo este el 9no productor mundial de este vegetal, siendo unos de sus principales compradores en el ámbito

internacional, Canadá, USA y japon, ahora es menester de la ciencia, tecnología y quienes la ejecutan, voltear la mirada y sus instrumentos hacia las hortalizas y vegetales, los cuales generan aporte a la economía del país y lo mas importante, alimentar a los ciudadanos de manera autosuficiente.

En el 2019 Fan Lu et al. [4], Proponen a la Reflectancia difusa como un método de detección cuantitativa para estimar el contenido de clorofila en vegetales con el objetivo de verificar el estatus de crecimiento de la planta. Donde se toma la firma espectral de tres tipos de variedades de lechuga y haciendo uso de índices vegetales, tales como MDATT, PRI, WI, entre otros, y modelos estadístico logran estimar el contenido de clorofila.

Realizan la caracterización espectral de tres variedades de lechuga (Crystal, Regina y Mimosa), cultivadas bajo diferentes formas de crecimiento, con el objetivo de evaluar técnicas de clasificación automática de lechugas basada en reflectancia difusa, obteniendo como resultados que dicha técnica espectral tiene un alto potencial para la discriminación de lechugas. [11],

En el 2011 Sanmartín et al. [12], Proponen la medida de color como un método eficaz para estimar la degradación de clorofila a phaeopigmentos.

J. Penuelas et al., en 2020 [13], logran estimar la concentración de agua en plantas, usando el índice de agua (WI) mediante la curvas de reflectancia difusa, estimando dicho vital liquido debido a que en la longitud de onda 900 a 970 nm se conoce que el agua absorbe en esta longitud de onda.

La primera pero no la única forma para dar justificación a esta investigación, es dar un sistema de apoyo al cultivo con función de detección de parámetros o características biológicas y químicas, para que el agricultor o productor del campo conozca la forma y cuidados del cultivo en función de la información detectada. Todas estas técnicas mencionadas en la narrativa de esta investigación ofrecen a los agricultores y científicos de plantas una nueva real herramienta de agricultura de precisión para el diagnóstico temprano y el monitoreo en tiempo real del estrés de las plantas en condiciones de campo.

Adicionalmente, la madurez de los vegetales es un factor importante para determinar el momento óptimo de cosecha porque la madurez afecta la calidad y la tasa de cambios de calidad durante la vida útil [9]. El color, la forma y el tamaño son características visuales de la madurez, pero estas características varían entre las diferentes especies de vegetales [14],[15]. Las propiedades mecánicas como la firmeza se utilizaron para evaluar la madurez de la hoja de lechuga [16]. Aunque las hojas de lechuga muy jóvenes

y maduras tienen diferencias significativas en resistencia y rigidez, la complejidad de la red vascular en las hojas dificulta la medición de las propiedades mecánicas. Por tal motivo, se requiere un método confiable y no destructivo para determinar la madurez de los vegetales [17].

1.3. Propuesta de tesis

Esta tesis de modalidad estudio de campo, se orienta a la investigación descriptiva y explicativa de las técnicas ópticas para la cuantificación de componentes biológicos de lechugas, cultivadas en un medio hidropónico empleando la técnica NFT (NUTRIENT FILM TECHNIQUE).

La propuesta es cuantificar mediante técnicas de colorimetría y espectrofotometría, tales como Reflectancia Difusa, Absorbancia y Raman, la concentración de clorofila y detección de azúcar en dos variedades de lechuga (*Lactuca orejona*, Var: *Parris Island*) y (*Lactuca italiana*, Var: *Parris starfighter*) en un invernadero sin calefacción, ventilado en la localidad antes mencionada, a lo largo de sus ciclos de crecimiento.

1.4. Pregunta de Investigación e hipótesis.

- ¿La espectroscopia de reflectancia difusa será capaz de determinar la concentración de clorofila en la lechuga?
- ¿La espectroscopia de reflectancia difusa será capaz de determinar la presencia de agua y estrés hídrico?
- ¿La espectroscopia Raman permitirá detectar azúcares en la lechuga?
- ¿La colorimetría es capaz de determinar características de la salud o crecimiento de la lechuga?

1.4.1. Hipótesis:

Mediante el uso de técnicas ópticas tales como reflectancia difusa, absorbancia y colorimetría, se espera permitan determinar diferencias significativas en la concentración de clorofilas entre las variedades de lechuga orejona e italiana. Además, se hace uso de la espectroscopía Raman para la detección de azúcares en las diferentes variedades de lechuga. Para una comprensión más completa de los cambios en la clorofila, se añadirá el cálculo de las coordenadas $L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$ de ambas variedades de lechuga, lo que

permitirá observar y analizar posibles alteraciones en la pigmentación y coloración de las hojas. Lo cual complementará la evaluación de la concentración de clorofilas y proporcionarán información adicional sobre la relación entre la coloración de las hojas y su composición química.

1.5. Objetivos de la investigación

1.5.1. Objetivo general

Emplear un cultivo hidropónico mediante la técnica NFT [18], para cultivar lechugas Parris Island y Parris Starfighter, donde se cuantificará mediante técnicas de colorimetría y espectrofotometría, tales como Reflectancia Difusa, Absorbancia y Raman, la concentración de clorofila y detección de azúcar en lechugas, a lo largo de sus ciclos de crecimiento.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Realizar cultivo hidropónico NFT de lechugas Parris Island y Parris Starfighter.
2. Estudio del estado del arte de la biología y fisiología de las plantas, hidroponía, espectroscopía de Reflectancia difusa y Raman, clorofila, características y concentración, Colorimetría y concentración de azúcar.
3. Evaluación espectral de la lechuga para cuantificar la clorofila, usando Reflectancia Difusa, Absorbancia, colorimetría.
4. Determinación de la presencia de azúcares en lechugas usando espectroscopia Raman.
5. Análisis y evaluación de los resultados

En este capítulo, se ha presentado la introducción a la investigación, destacando la importancia de las hortalizas y, en particular, de la lechuga en la alimentación humana. Se ha mencionado la clasificación de las hortalizas y se ha resaltado la relevancia de su producción en México.

La propuesta de tesis se enfoca en la cuantificación de componentes biológicos de lechugas cultivadas en un medio hidropónico mediante técnicas de colorimetría y espectrofotometría, como la reflectancia difusa, absorbancia y Raman, para la estimación de parámetros como la concentración de clorofila y la presencia de azúcares en las plantas.

En el siguiente capítulo se abordará el tema de la hidroponía y su aplicación en el cultivo de la lechuga, seguido de la taxonomía y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico de la lechuga. Posteriormente, se explorarán las bases teóricas relacionadas con la absorción de luz, las coordenadas cromáticas y las técnicas espectrales de reflectancia difusa y Raman. Finalmente, se presentará la metodología y los materiales utilizados en esta investigación.

En resumen, este capítulo establece el contexto y la justificación de la investigación, así como la propuesta de tesis y los objetivos específicos a abordar.

HIDROPONÍA

Este capítulo tiene como objetivo describir en detalle el sistema de cultivo hidropónico, sus componentes, técnicas y beneficios, con el fin de proporcionar una base sólida para comprender y analizar la implementación de la hidroponía como parte integral de la tesis.

Al describir el cultivo hidropónico y su aplicación en diferentes contextos, este capítulo ofrece información clave que respalda y enriquece la investigación realizada en la tesis. Además, se explorarán las ventajas y desafíos de la hidroponía, lo que permitirá evaluar su viabilidad y efectividad en el marco de la problemática abordada en la tesis.

2.1. Hidroponía

La hidroponía deriva de las palabras griegas Hydro (agua) y Ponos (labor o trabajo) y significa literalmente "trabajo en agua". Esta ciencia estudia los cultivos sin tierra [18].

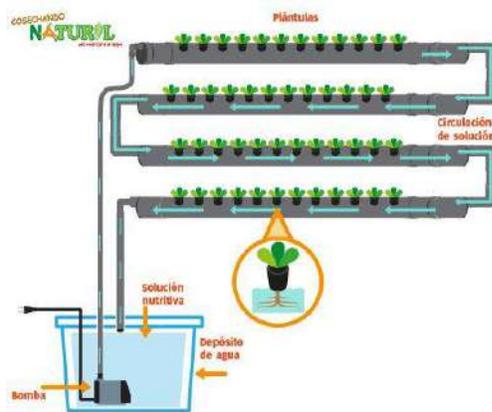


Figura 2.1: Esquema de un sistema hidropónico.

Imagen obtenida de [19]

La Hidroponía es un nuevo método de cultivo de hortalizas en el que no se siembran como tradicionalmente se suelen sembrar sino que, utilizan un método en el que sustancias nutritivas de soluciones minerales compuestas alimentan a la planta a través de la circulación de agua en sustratos que sustituyen el suelo agrícola, los beneficios de cultivar en hidroponía, son muchos empezando porque podemos hacerlo en las ciudades donde no existe un espacio para hacerlo, al utilizar esta tecnología, las raíces absorben una solución de nutrientes disuelta en agua que cumple con todos los requisitos necesarios para el desarrollo de las plantas. Además, favorece el desarrollo de más plantas ya que ocupa la totalidad del espacio, a comparación de una agricultura tradicional.

Sistema tradicional	Sistema hidropónico
Crece mejor en temperaturas entre 18 y 25°C	Al estar el cultivo dentro del invernadero, la temperatura se puede controlar.
Se produce en 2 ciclos por año	Se puede producir durante todo el año, no depende de la temporalidad
Requiere un amplio espacio o un bancale con una gran cantidad de tierra	Se puede producir en pequeños espacios, de forma vertical o piramidal con tubos de p.v.c.
80 % del riego se infiltra a las capas inferiores del terreno, 20 % del agua se evapora.	Se asegura el ahorro de agua, al estar circulando en el sistema.
Posible riego con aguas negras	Es necesario hacer revisión de ph y conductividad eléctrica por lo que el agua potable es la opción para preparar la solución nutritiva
Constante supervisión del cultivo	La hidroponía recurre a apoyos tecnológicos
Es necesario aplicar fertilizantes granulados o foliares, en el suelo u hojas para apoyar el crecimiento de la producción.	Los nutrientes que requiere la planta, los obtiene del agua que circula en el sistema.

Tabla 2.1: Comparación sistema tradicional versus sistema hidropónico.

Tabla obtenida de [20]

La figura 2.1 muestra un esquema de un sistema hidropónico, el cual consiste de un deposito que impulsa por bombeo agua a través del sistema, recipientes, hasta las plántulas y regresa, con soluciones madre es decir nutrientes concentrados, cabezales de riego y canales construidos donde están los sustratos o agua, las plantas, los conductos para aplicación del fertiriego y el receptor del efluente [21].

Este es un método innovador del cultivo de hortalizas; mientras las personas inician con un bancale en el patio con una gran cantidad de tierra; la hidroponía reconoce

que el método tradicional utilizando tierra no siempre es necesario para ayudar a las plantas. La hidroponía es el proceso en el que se distribuye agua asegurándose de mantener calidad y nutrientes que la planta necesita para alcanzar su potencial [19].

El cultivo en hidroponía en ninguna de sus etapas de crecimiento requiere del suelo como soporte o fuente de nutrimentos del cultivo; la planta toma los nutrimentos directamente del agua, donde se encuentran disueltos [22].

Los sistemas hidropónicos requieren de un menor número de horas de trabajo que el método tradicional de producción, además existe un ahorro en mano de obra y en costos. La implementación de la hidroponía amplía el horizonte agrícola permite la inclusión de áreas urbanas por ejemplo en el desarrollo de una producción comercial o de autoconsumo en áreas pequeñas como la zotihuela [23].

Un beneficio de los cultivos hidropónicos, es una cantidad mucho menor de consumo de agua que un cultivo tradicional en tierra, el cultivo en tierra el 80% del riego se infiltra a las capas inferiores del terreno y otro porcentaje del riego se evapora [24].

La técnica de hidroponía resulta conveniente porque no se depende de las temporalidades de siembra, ni de clima a diferencia de la agricultura tradicional de cultivo en suelo, además de que la producción de lechugas en esta técnica será abundante con un alto rendimiento de los cultivos acelerando los tiempos de producción y al no depender de la temporalidad se puede cultivar durante todo el año distintas variedades de lechugas sin esperar el tiempo de lluvias o secas para cosechar [25].

En la tabla 2.1 se muestra, una comparación del sistema tradicional versus el sistema hidropónico.

2.1.1. Ubicación Geográfica

El cultivo fue realizado en el campo experimental del Instituto Nacional de Astrofísica, óptica y electrónica (INAOE), Puebla, Tonantzintla, México, (19°01'58"N 98°19'05"W).

2.1.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se cultivó dos variedades de lechuga *Lactuca sativa* L., (*Lactuca orejona*, Var: *Parris Island*) y (*Lactuca italiana*, Var: *Parris starfighter*) en un invernadero sin calefacción, ventilado en la localidad antes mencionada.

Previamente, las semillas se sembraron en canastas hidropónicas (25 canastas, 2 Pulgadas x 2 Pulgadas) que contenían Cilindro de foami agrícola de 4.3 x 5 cm cada uno (Siembra directa). Como se muestra en la figura 2.5. Se colocaron las canastas para

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island*, *Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

hidroponía en los orificios realizados en tubos de PVC de 4 pulgadas, cuya separación entre orificio y orificio es de 25 cm de separación, como se observa en la figura 2.7.

Las semillas de las variedades de lechugas se regaron con solución nutritiva. La solución nutritiva se almacenó en un tanque y se entregó mediante una bomba sumergible a través de un sistema de riego SISTEMA NFT (NUTRIENT FILM TECHNIQUE). Cada planta recibió alrededor de 200 mL de solución por riego, ocho veces al día [26].

La composición de la solución nutritiva estándar fue de macronutrientes: Nitrógeno (N), Fósforo asimilable (P_2O_5), Potasio asimilable (K_2O), Magnesio (Mg), Azufre (S) a 10, 8, 18, 2.5, por ciento respectivamente; los micronutrientes Calcio (Ca), Hierro (Fe), Bromo (B), Zinc (Zn), Cobre (Cu) y Manganeso (Mn) estaban en 5.90, 0.10, 0.002, 0.010, 0.0002 y 0.002 por ciento, respectivamente [27].

El pH de la solución nutritiva y la conductividad eléctrica se controlaron periódicamente y se mantuvieron en aproximadamente 6,5 y 1,5-2,0 dS/m, respectivamente. Las plantas se cultivaron durante 78 días del 10 de enero al 29 de marzo (2023).

2.1.3. Sistema Hidropónico



Figura 2.2: Sistema N.F.T (NUTRIENT FILM TECHNIQUE) para Lechugas, Imagen propia.

Existen diversos métodos de producción dentro de la hidroponía sin embargo todos se basan en el mismo fundamento; utilizar elementos minerales para elaborar una solución que alimente a las plantas. Un sistema es el medio que ayudará a crear las condiciones perfectas para las plantas, realizando esto se remplazará la necesidad de plantar los vegetales en la tierra.

Existen varios tipos de sistemas hidropónicos, que son clasificados en sistemas abiertos y cerrados, como se observa en la figura 2.3, entre ellos: Aeropónicos, Sistemas de

Goteo, Sistema de Mecha, Sistema de Flujo y Reflujo, Raíz Flotante y los NFT, por sus siglas en inglés “Nutrient Film Technique” [28][29].

Los métodos de cultivo sin suelo son muchos, asumiendo que el auténtico cultivo hidropónico se realiza en agua, donde las raíces de las plantas están suspendidas dentro de una cámara en donde circula una solución compuesta de elementos necesarios para el crecimiento de la planta [30].

La técnica de película nutritiva consiste en hacer recircular de manera permanente una solución nutritiva dentro de los tubos o canales, que permiten la respiración de las raíces como la absorción de nutrientes y del agua durante el periodo vegetativo para lograr esto el canal no debe de tener una altura superior a los 5 o 7 centímetros, como se observa en la figura 2.2 [31].

Clasificación de los sistemas hidropónicos.

Sistema abierto:

En este tipo de sistemas no se reutiliza la solución nutritiva, principalmente porque no se cuenta con un sistema de captación de drenajes.

Sistema cerrado:

La solución nutritiva se recicla y se mantiene en contacto con las raíces, cambiándose o ajustándose periódicamente.



Figura 2.3: Tipos de Sistemas Hidropónicos.

Imagen obtenida de [32]

En los tipos de sistemas cerrados, se encuentran:

- Nutrient Film Technique N.F.T
- Sistema Aeropónica
- Sistema Raíz flotante o Balsa.
- Sistema de flujo y reflujo

El tipo de sistema cerrado usado en este estudio fue N.F.T (Nutrient Film Technique), debido a que esta técnica ofrece un mayor rendimiento en la producción de lechugas debido a que los canales se adecuan a espacios reducidos, a cada canal o tubo se le da una inclinación, por estos pasará la solución nutritiva y al final se encontrará un reservorio en el cual cae el agua, dentro de este se encuentra una bomba que ayuda a llevar la solución a cada una de las plantas que están dentro de los tubos.

La técnica de película nutritiva o Nutrient Film Technique o N.F.T por sus siglas en inglés forma parte de los sistemas hidropónicos; Consiste en cultivar en canales, en este sistema se pueden utilizar tubos de P.V.C ya que estos canales deben soportar el peso de la instalación como el cultivo, además deben ser inertes y no tóxicos para el cultivo dentro de ellos, ver figura 2.2 [28].

El sistema NFT como una técnica de cultivo donde las plantas crecen teniendo sus raíces dentro de una lámina de plástico a través de la que circula la solución de nutrientes, también menciona que el termino hace referencia a la cantidad de solución que pasa por estos canales es mínima para que las plantas siempre dispongan de oxígeno [30].

Los canales o tubos de este sistema deben soportar el peso de la instalación como del cultivo además de ser resistente al deterioro o degradación, los tubos de p.v.c son ideales para este cultivo ya que tienen un fondo plano y liso; en la práctica resulta eficiente manejarlos de 6 m de longitud, el flujo dentro de los canales debe ser de 2 litros por minuto como máximo para alimentar una hilera de 9 a 15 plantas jóvenes recirculando 10 litros de agua por día bombeada al cabezal y la gravedad hará circular la solución por los tubos, estos no se llenaran por completo es conveniente que la solución cubra un mínimo de porcentaje de raíz, para tener aireación dentro del canal [28].

2.1.4. Sustrato

Es un medio sólido e inerte, que protege y da soporte a la planta para el desarrollo de la raíz. Permitiendo la disponibilidad de nutrientes en cualquier etapa de su desarrollo. El sustrato se refiere a un medio inerte que le brinda soporte a la planta. A este medio, o sustrato, se le añade una mezcla de nutrientes que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo del cultivo. Sin embargo, existen cultivos hidropónicos en donde el medio es la misma solución nutritiva, que en el caso de la aeroponía puede llegar a ser una mezcla gaseosa.

A continuación se muestran los tipos de sustratos en la figura 2.4:



Figura 2.4: Tipos de Sustratos.

Imagen obtenida de L. Ramírez

El sustrato utilizado para este estudio, es la espuma sintética fenólica, como se muestra en la figura 2.5:



Figura 2.5: Sustrato Sintético (Espuma fenólica) instalada en la canasta hidropónica.

Imagen obtenida de L. Ramírez

2.1.5. Semillas

Tipos de Semillas:



Figura 2.6: Tipos de Semillas: a) Semillas Criollas, b) Semillas Mejoradas, c) Semillas híbridas

Semillas Criollas

La palabra criollo significa “autóctono o propio” Entonces cuando decimos semillas criollas nos referimos a las semillas adaptadas a nuestro entorno por un proceso de selección natural o manual por los productores. Estas fomentan la agricultura tradicional o de auto-consumo.

Semillas Mejoradas

Se caracterizan por haber sido seleccionadas con la ayuda del hombre por métodos específicos como lo es (polinización controlada). Presentan propiedades especiales como, precocidad, adaptabilidad a ciertas regiones y diferentes temperaturas, resistencia a plagas y enfermedades, así como una mayor producción.

Semillas híbridas

Son semillas obtenidas del cruce de dos diferentes variedades puras denominadas (F₁), es la cruce por polinización controlada de dos variedades muy puras y estables que se combinen bien. Es decir, mezclar una planta de una variedad que casi siempre entrega los mismos resultados con una de otra variedad que también es muy homogénea en sus resultados.

Las semillas utilizadas para este estudio son del tipo: *Semillas Mejoradas*, a continuación se muestra los tipos de semillas en la figura 2.6.

2.1.6. Sistema de Riego



Figura 2.7: Proceso de instalación de invernadero, sistema hidropónico y sistema de riego.

Los sistemas de riego permiten la aplicación de agua, químicos y sustancia nutritiva en el agua, de manera directa o puntual, pero se debe monitorizar la calidad del agua, pH y CE (conductividad eléctrica), para esta investigación se usó el sistema de riego cerrado, usando una bomba de agua sumergible de 65 Watt de potencia y de un caudal máximo de 300 litros/hora y un tanque de 40 litros como reservorio de agua, dicho sistema de riego permite la automatización del riego y distribuir la sustancia nutritiva de manera homogénea a lo largo de las tuberías de PVC donde se encuentran las canastas hidropónicas con el sustrato sintético de espuma fenólica cuya función es dar base y sustento físico a las semillas y plantas.

2.1.7. Invernaderos

Un invernadero presenta ventajas variadas, por ejemplo, éstos se utilizan para cultivar o almacenar plantas y debido a los cambios climáticos, en los meses con más calor permite controlar las altas temperaturas en los cultivos, y sobre todo los que están cubiertos por plástico bajo cualquier otro tipo de cubierta. Mediante un buen monitoreo, no sólo aumenta la seguridad del agricultor, también se incrementa la calidad y la producción, y con ello la rentabilidad.[33]

Un invernadero representa ahorro de dinero, ya que gracias a este sistema se utiliza el material exacto necesario para las plantas, sin hacer desperdicios, y también se hace un ahorro de tiempo, ya que el sistema de invernadero automatizado hace la mayoría de las tareas que deberían estar haciendo los cultivadores, y dejándoles más tiempo libre para utilizarlo en cualquier otra cosa. Un mejor resumen de las bondades al usar un invernadero se observa en la tabla 2.2.

Un invernadero está formado por una estructura metálica o de plástico cubierta por materiales translúcidos para conseguir la máxima luminosidad difusa en el interior como se observa en la figura 2.8a y 2.8b. Se recomienda orientarlo con el eje longitudinal del túnel en dirección Norte-Sur como indica la figura 2.8c, a fin de aprovechar la posición angular alta que conserva el Sol la mayoría del año y aprovechar la máxima disponibilidad de buena luz. Dentro de este invernadero obtendremos unas condiciones artificiales (microclima) que generan a las plantas una mayor productividad con un mínimo costo y en menos tiempo. Resguarda a las plantas o cultivos que están en su interior de daños ambientales como heladas, fuertes vientos, granizo, plagas de insectos, etc.[33]

Un invernadero presenta ventajas variadas, por ejemplo, éstos se utilizan para cultivar o almacenar plantas y debido a los cambios climáticos, en los meses con más calor permite controlar las altas temperaturas en los cultivos, y sobre todo los que están cubiertos por plástico bajo cualquier otro tipo de cubierta. Mediante un buen monitoreo, no sólo aumenta la seguridad del agricultor, también se incrementa la calidad y la producción, y con ello la rentabilidad.[33]

Un invernadero representa ahorro de dinero, ya que gracias a este sistema se utiliza el material exacto necesario para las plantas, sin hacer desperdicios, y también se hace un ahorro de tiempo, ya que el sistema de invernadero automatizado hace la mayoría de las tareas que deberían estar haciendo los cultivadores, y dejándoles más tiempo libre para utilizarlo en cualquier otra cosa. Un mejor resumen de las bondades al usar un invernadero se observa en la tabla 2.2.

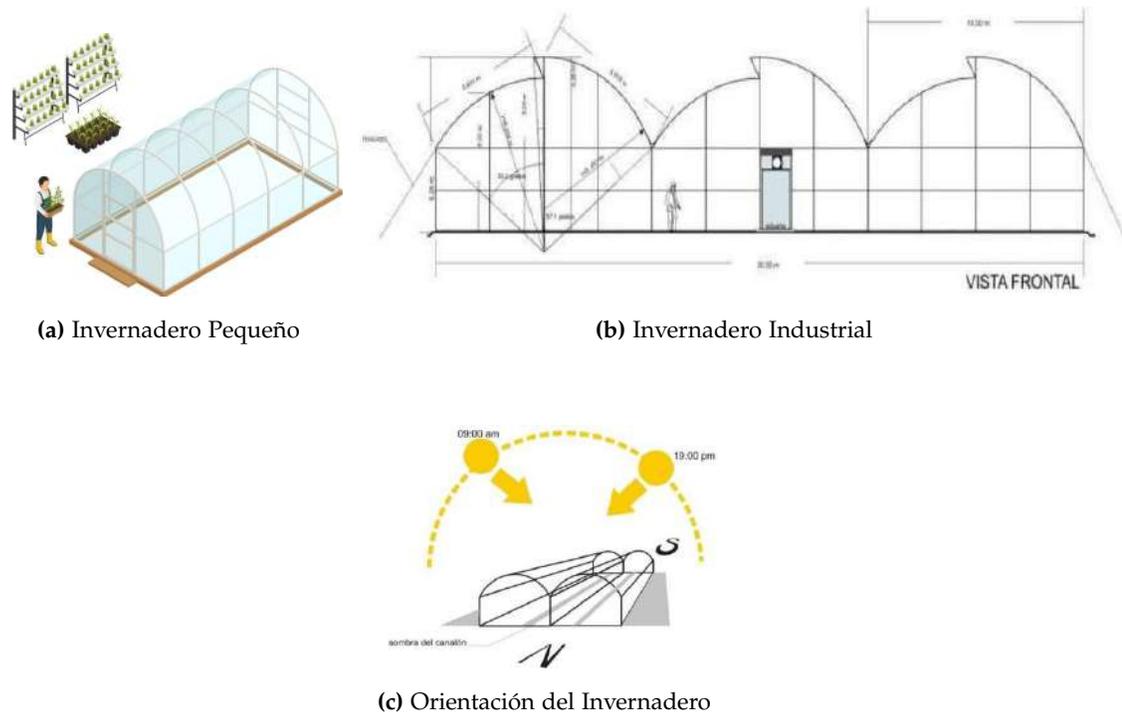


Figura 2.8: Tipos de Invernaderos y su orientación.
Imágenes obtenidas de [33]

USO DE INVERNADEROS		
BONDADES	CONFORMACIÓN	FACTORES DE ÉXITO
Intensificación de la producción.	Estructura metálica	Mercado y distribución
Aumento de los rendimientos.	Cubiertas plásticas	Ubicación
Menor riesgo de producción.	Área de crecimiento de cultivos	Gestión y manejo
Uso más eficiente de insumos.	Sistema de riego y drenaje	Diseño de invernadero
Mayor control de plagas, malezas y enfermedades.	Sistema de ventilación y aireación	Control ambiental
Posibilidad de cultivar todo el año.	Sistema de calentamiento y enfriamiento.	
Obtención de productos fuera de temporada.	Sistema de iluminación.	
Obtención de productos de alta calidad.		
Obtención de productos en regiones con factores adversos.		
Mayor comodidad y seguridad.		
Condiciones ideales para investigación.		

Tabla 2.2: Uso de Invernaderos. Fuente Propia

El presente capítulo ha proporcionado una descripción detallada del sistema de cultivo hidropónico, sus componentes, técnicas y beneficios. La hidroponía es una técnica que permite el cultivo de plantas sin suelo, utilizando una solución nutritiva disuelta en agua para alimentar a las plantas a través de sus raíces. Esta técnica ofrece numerosos beneficios, como la posibilidad de cultivar en áreas urbanas con espacio limitado, un mayor rendimiento en comparación con la agricultura tradicional y una mayor eficiencia en el uso del agua.

Además, se han presentado diferentes tipos de sistemas hidropónicos, como el sistema NFT (Nutrient Film Technique), el sistema aeropónico y el sistema de raíz flotante, entre otros. Cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas y aplicaciones específicas, lo que permite adaptarse a diferentes contextos y necesidades.

El cultivo hidropónico no solo ofrece ventajas agronómicas, sino que también representa una oportunidad para la agricultura en áreas urbanas y espacios reducidos. Gracias a su capacidad para ser implementado en pequeñas áreas, como zotehuelas o invernaderos, la hidroponía permite el desarrollo de una producción comercial o de auto-consumo, incluso en entornos urbanos.

En conclusión, la hidroponía es una alternativa prometedora y sostenible para el cultivo de plantas, que ofrece beneficios significativos en términos de eficiencia en el uso de recursos, rendimiento y adaptabilidad. La implementación de esta técnica puede ser clave para abordar los desafíos actuales de la agricultura y promover una producción de alimentos más segura, eficiente y respetuosa con el medio ambiente.

Conocido esto ahora pasamos a describir Botánica, Taxonomía y morfología de la Lechuga y fenómenos físicos involucrados.

MARCO TEÓRICO

Este capítulo tiene como objetivo proporcionar una base teórica sólida sobre la lechuga como objeto de estudio, abordando aspectos relacionados con su taxonomía, descripciones botánicas, morfológicas y fisiológicas. Además, se explorará la importancia del color en la lechuga y se introducirán conceptos fundamentales de absorción y colorimetría.

Al desarrollar el marco teórico del objeto de estudio, este capítulo proporciona los conocimientos necesarios para comprender en profundidad las características de la lechuga, su ciclo biológico, sus requerimientos y las principales variedades. Además, se abordan conceptos esenciales de absorción y colorimetría, que servirán como base para el análisis y la interpretación de los resultados obtenidos en la investigación, en relación con la calidad y el color de la lechuga.

3.1. Marco Teórico del Objeto de Estudio

3.1.1. Lechuga, taxonomía y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico

3.1.2. Introducción

Las formas y los colores de la lechuga *Lactuca sativa* L. hacen que sea una verdura muy querida, además en todo el mundo, es un vegetal de consumo frecuente siendo este un ingrediente principal de muchos platos típicos. Las regiones templadas y subtropicales son donde se concentra principalmente la producción. Su cultivo es Hidropónico o a base de suelo, interior o exterior.

3.1.3. Origen y generalidades de la Lechuga

Es un cultivo que se conoce desde hace mucho tiempo, siendo uno de las plantas de cultivo mas antiguas existiendo referencias en el 4500 A.C. Los Egipcios, Griegos y Romanos la extendieron por toda Europa. Los Romanos ya conocían distintas variedades.

El origen no esta muy claro. Vavilov pensaba que era el Cercano Oriente, pero hoy en día no se tiene la seguridad, ya que existe un antecesor de la lechuga que puede encontrarse de forma silvestre en la mayor parte de las zonas templadas. Los primeros cultivares de lechuga no formaban cabeza, la primera referencia de las lechugas que forman cogollos es de 1543. Actualmente el interés de la selección se ha dirigido a lechugas que eliminen la subida a flor, sin espinas, con poco contenido en látex, de mayor tamaño de semilla y de cogollos mas grandes.

Es una hortaliza típica de ensaladas, considerada como una planta con propiedades tranquilizantes. Tiene un alto contenido en vitaminas, lo que la hace que forme parte de muchas dietas. Es un componente primordial para los componentes de la 4ª gama.[34]

3.1.4. Botánica, Taxonomía y morfología de la Lechuga

La lechugas son plantas anuales o bienales, autógamas, de porte erecto y hasta 1 m de altura, lampiñas y con tallos ramificados. Hojas basales arrosetadas, a veces arropolladas, obovadas y dentado-crenadas. La lechuga, pertenece a la familia de las compuestas y su nombre botánico es *Lactuca sativa* L., que posee una raíz pivotante, relativamente gruesa en la corona que se adelgaza gradualmente en profundidad, la cual puede alcanzar más de 60 cm de profundidad (Figura 3.1).

Raíz: Raíz pivotante, relativamente gruesa en la corona que se adelgaza gradualmente en profundidad, la cual puede alcanzar más de 60 cm de profundidad, La mayor densidad de raíces laterales está cerca de la superficie; por lo tanto, la absorción de nutrientes y agua ocurre mayormente en los niveles superiores del suelo. La mayor densidad de raíces laterales está cerca de la superficie; por lo tanto, la absorción de nutrientes y agua ocurre mayormente en los niveles superiores del suelo. [35].

Tallo: Es reducido durante la etapa vegetativa, una vez que el periodo vegetativo se produce la elongación del tallo, que puede alcanzar a 1 m de altura, y el periodo reproductivo comienza. Un tallo simple termina en una inflorescencia.

Hoja: Las caulinares hojas sésiles están distribuidas en forma de espiral, abrazadoras, aovadas u orbiculares y de base amplexicaule en una roseta densa alrededor de un



Figura 3.1: Raíz, tallo, hoja e inflorescencia de la lechuga.
Imagen tomada de Agro Krebs.

tallo corto. El desarrollo de la roseta puede continuar durante el periodo vegetativo de la planta como es en el caso de las lechugas de hoja, o formar una cabeza redondeada como en las escarolas y butterhead, o una cabeza elongada como en el caso de Costinas o Romanas , y en otros se acogollan más tarde.

Hay una considerable diversidad de colores, formas, tipos de superficies, márgenes y textura entre los diversos tipos y formas de lechuga. Los grados de color verde de las hojas pueden variar desde oscuros a claros, pero la cualidad de verde puede ser variado por tintes amarillentos. Además, la presencia de antocianinas puede estar en toda la hoja o en sectores dando tonalidades diferentes.

Inflorescencia: Panícula corimbosa compuesta por muchos capítulos, cada uno consistiendo en varios floretes, que varían entre 12 a 20. Cuando la lechuga está madura, es cuando emite el tallo floral, que se ramifica. Las flores de esta planta son autógamas.

Florete: Las flores son amarillas con involucro de brácteas escamosas, sagitadas, lanceoladas y de 10-15 mm. Son todos de tipo rayo, perfectos y fértiles, están rodeados de 3 o 4 filas de brácteas. Cada florete consiste en un simple, ligulado pétalo amarillo con cinco dientes. La parte baja está fusionada como un tubo y rodea los órganos sexuales. Cada florete tiene un carpelo doble, consistiendo en un estilo elongado y un estigma dividido.

Fruto: De tipo aquenio, que está coronado en la parte superior por pelos.

Dentro de la especie *Latuca sativa* L. se diferencian cuatro variedades botánicas:

- *L. sativa* L. var *longifolia* Lam: Lechugas que se aprovechan por sus hijas y no forman verdaderos cogollos. Las hojas son de forma aovada u oblongada. Son las lechugas romanas y las tipo Cos.
- *L. sativa* L. var *capitata* L: Variedades que forman un cogollo apretado. La forma de sus hojas suele ser ancha. Son las lechugas acogolladas Iceberg.
- *L. sativa* L. var *intubacea* Hort: Tienen las hojas sueltas y dispersas. Son las lechugas Lollo Rosa, Lollo Bionda ,hoja de roble, etc.
- *L. sativa* L. var *augustana* Irish: Estas lechugas se aprovechan por sus tallos, tienen hojas puntiagudas y lanceoladas. Son las lechugas espárrago cultivadas solamente en China.[34]

3.1.5. Caracteres morfológicos de la Lechuga

Debido a la gran variabilidad de lechugas que se han conseguido, existe una gran variabilidad morfológica entre ellas. De todos modos, lógicamente mantienen un cierto parecido en los caracteres.

Las hojas, al principio forman una roseta, para formar después un cogollo mas o menos apretado, aunque también existen algunas que no forman cogollo. Estas hojas pueden ser de forma redonda, lanceolada o casi espatulada, con los márgenes lisos o rizados, y con una coloración verde en distintas tonalidades, incluso matices rojizos.

Normalmente es un cultivo anual, aunque algunas variedades lo hacen bianual.

Normalmente en estado vegetativo avanzado, el cogollo se abre y aparece un tallo cilíndrico.

Este tallo se ramifica desde un tercio de su altura, tiene numerosas hojas cada vez más pequeñas y acaba en un a inflorescencia formada por numerosos capítulos de flores amarillas.

Las semillas son frutos en aquenio pequeños y de color blanco o negruzco. Estas semillas están provistas de un vilano plumoso. En un gramo se cuentan 800 semillas.

La capacidad germinativa que tienen es de 4-6 años.

3.1.6. Caracteres fisiológicos de la Lechuga

En el ciclo de cultivo de la mayoría de las lechugas se distinguen tres fases:[34]

- Fase de formación de una roseta de hojas:
- Fase de formación de un cogollo más o menos compacto.
- Fase de reproducción o emisión del tallo floral.

La lechuga es un cultivo de día largo, por lo que si se dan estas condiciones se produce la floración. Este aspecto no es interesante desde el punto de vista comercial, por lo que interesan condiciones de día corto en la que la planta forme un buen acogollado. De todos modos es una característica que depende mucho de las variedades, ya que existen variedades resistentes a la subida a flor que forman un buen cogollo cultivadas en primavera-verano.

La semilla de la lechuga presenta un periodo de latencia que puede durar hasta dos meses tras la recolección, aunque puede ser roto por diversos factores. La temperatura optima de germinación es de 15-20 °C y a partir de 25 °C se pueden dar fenómenos de latencia por altas temperaturas. Existen un sistema conocido como "priming" que mejora las condiciones de germinación incluso con temperaturas elevadas.

También el peso y tamaño de las semillas tienen efecto sobre la nascencia y el posterior formado de los cogollos. En el periodo de formación del cogollo influye el equilibrio entre la luz y la temperatura. Si hay poca iluminación, no acogollan bien si la temperatura es superior a 20 °C. La temperatura nocturna y la fertilización también influyen en este proceso.

Para un buen acogollado las temperaturas diurnas necesarias son de 17-28 °C y las nocturnas de 3-12 °C.

Un accidente frecuente es la subida a flor prematura que es causada por la acción de las altas temperaturas. También puede ser desencadenada por la acción de las giberelinas.

En el cultivo invernal de lechugas es frecuente que aparezcan manchas rojizas debido a la acumulación de antocianos, y no debido a ninguna carencia de elementos.[34]

3.1.7. Semilla y germinación

La semilla de la lechuga es botánicamente un aquenio, definido como un fruto seco e indehisciente de una sola semilla. Esta semilla se embebe con agua, con la cual se activa una serie de mecanismos fisiológicos con los que se inicia el proceso de germinación.

Hay varias etapas durante este proceso, de las cuales se muestran algunas en la Figura 3.2. La primera fase es la imbibición con agua, que penetra e hidrata las membranas celulares; una vez activadas, comienza el crecimiento de la radícula hasta que rompe la testa y comienza la elongación; sigue después la aparición de los cotiledones. Este proceso es de crecimiento y elongación de tejidos, todo dependiente de las reservas alimenticias que tenga la semilla y de la humedad presente. Una vez que la plántula emerge y recibe luz, se convierte en autótrofa, las raíces están completamente habilitadas para absorber agua y nutrientes, los cotiledones pueden realizar fotosíntesis hasta que emerja el primer par de hojas verdaderas.



Figura 3.2: Etapas del proceso de germinación de una semilla de lechuga.

3.1.8. Crecimiento y desarrollo

El crecimiento de la lechuga puede ser dividido en cuatro estadios: plántula, roseta, encabezamiento (no en todos los tipos) y reproductivo, como se muestra en la Figura 3.3.

Ciclo de la lechuga



Figura 3.3: Estados de crecimiento de la planta de lechuga

3.1.9. Requerimiento de la Lechuga



Figura 3.4: Requerimiento de la Lechuga

- Temperatura
- Germinación: 18-20°C
- Crecimiento y desarrollo: 14-18°C durante el día y -5 a 8°C durante la noche
- Humedad: 60-80
- Precipitación 250-350 en periodo vegetativo.
- pH: 6.7-7.4
- Altura: 600-2200 msnm
- Suelo: Un suelo rico en materia orgánica, al retener agua y presentar buen drenaje, favorece al sistema radicular reducido de la lechuga y así puede suplir la demanda de altos volúmenes de agua por parte del cultivo. ver figura 3.4

3.1.10. Principales variedades de Lechuga.

Es bien conocido que hay variedades de lechugas, tales como se nombran algunas de ellas y se muestran en la figura 3.5:



Figura 3.5: Variedades de Lechuga

- Lechuga Romana o Cos (*L. sativa L. var. longifolia*)
- Lechuga Milanesa, Francesa, Reina de Mayo y Española (*Lactuca sativa L.var. capitata*)
- Lechuga tipo Iceberg y Batavia (*Lactuca sativa L.var.crispa*)
- Lechugas Lollo Bionda y Lollo Rossa (*Lactuca sativa L. var. acephala*)
- Lechuga espárrago. (*Lactuca sativa L. var augustuana*)

3.1.11. Pigmentos Fotosíntesis

Dentro del proceso de fotosíntesis existen pigmentos que se van a encargar de absorber distintas longitudes de onda en la luz, que es a lo que se le conoce como espectro de absorción como se observa en la figura 3.22, se estudiarán algunos pigmentos fotosintéticos o más comunes son:

- **Clorofilas:** Las clorofilas son pigmentos fotosintéticos de color verde que contienen en su estructura un anillo de porfirina. Son moléculas estables en forma

de anillo alrededor de las cuales los electrones son libres de migrar. Clorofila "a" hace posible la fotosíntesis porque transfiere sus electrones activados a otras moléculas que fabricarán azúcares. Clorofila "b", la cual se encuentra solo en las llamadas algas verdes y en las plantas. Clorofila "c" se encuentra solo en los miembros fotosintéticos del grupo chromista, como en los dinoflagelados.

- **Carotenoides:** Los carotenoides son otro grupo importante de pigmentos fotosintéticos. Estos absorben luz violeta y azul verdosa. Los carotenoides proporcionan los colores brillantes que presentan las frutas; por ejemplo, el rojo del tomate se debe a la presencia del licopeno, el amarillo de las semillas de maíz es causado por la zeaxantina, y el naranja de las cáscaras de naranjas se debe al β -caroteno. Los carotenoides se pueden clasificar en dos grupos: carotenos y xantofilas.

3.2. Marco Teórico: Absorción y Colorimetría

En la óptica existen teorías que permiten entender cómo un medio al ser irradiado por alguna o muchas longitudes de onda, pueden ser reflejadas, absorbidas o cambiar su dirección de propagación respecto a la de incidencia, a lo cual se le conoce comúnmente como esparcimiento, después de interactuar con las partículas del medio en cuestión. De las primeras teorías establecidas la ley de Lambert-Beer describe como un medio absorbe la luz con que es iluminado [36].

3.2.1. Absorción de la luz

Toda la materia responde al estímulo ocasionado por ondas electromagnéticas, a la cual en adelante la referiremos como luz. La absorción de ondas de luz permite establecer parámetros físicos para caracterizar y cuantificar sustancias. La Ley empírica de Lambert-Beer asocia la luz absorbida con la cantidad de sustancia presente en nuestro objeto de estudio. Dicha ley consiste en lo siguiente se irradia un objeto con un ancho finito y se mide la luz que logra transmitirse figura 3.6. Con ésta información se establece una ecuación en la cual la luz transmitida está en función de la luz incidente y la intensidad emergente [37].

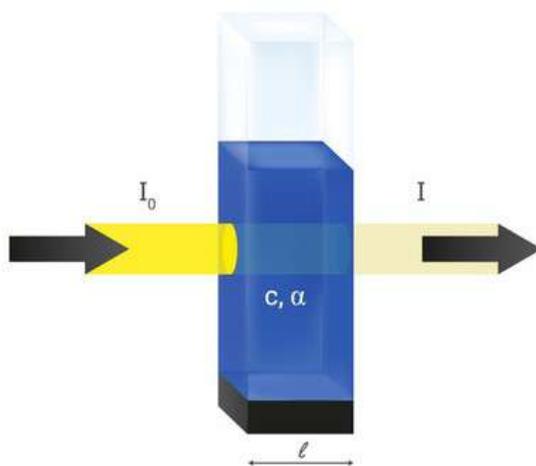


Figura 3.6: Esquema de la Ley empírica de Lambert-Beer

La intensidad del haz de luz se va atenuando a medida que atraviesa la cubeta debido a la absorción de las moléculas de la muestra. El ritmo de absorción depende de la intensidad inicial de luz y de la concentración de moléculas. De esta manera, cuando un haz de luz de intensidad I recorre una distancia dL en una muestra con una concentración de moléculas $[C]$, $[\alpha]$ es la constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción molar cuyo valor depende de la naturaleza del medio absorbente. se produce una atenuación de intensidad dI dada por [38]:

$$dI = -\alpha [C] I dL \quad (3.1)$$

La constante k se denomina coeficiente de absortividad molar. La expresión anterior se puede integrar de la siguiente forma:

$$\frac{dI}{I} = -\alpha [C] dL \Rightarrow \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\alpha [C] \int_0^L dL \Rightarrow \ln \frac{I}{I_0} = -\alpha [C] L \quad (3.2)$$

Lo cual da lugar a la ley de Beer-Lambert para la absorción que relaciona la intensidad a la salida e la muestra I , con la intensidad inicial I_0 , la concentración de moléculas y la distancia recorrida por la luz en la muestra, L :

$$I = I_0 \exp -\alpha [C] L \quad (3.3)$$

El espectrofotómetro, en lugar de la intensidad, mide la absorbancia A que se define por:

$$A \equiv \ln \frac{I_0}{I} = -\alpha [C] L \quad (3.4)$$

La utilización de la absorbancia al realizar los espectros tiene la ventaja de ser directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra.[38]

Donde:

- L es la distancia desde la interfase y es paralela a la dirección de propagación [cm].
- I es la irradiancia incidente [W/m^2] en función de la distancia L.
- I_0 es la irradiancia incidente [W/m^2].
- α es la constante de proporcionalidad de extinción molar [$Lmol^{-1}cm^{-1}$].
- C es concentración de moléculas [mol/L].

3.3. Color, coordenadas cromáticas y reflectancia espectral $R(\lambda)$

En esta sección, se van a definir las magnitudes relacionadas con el estudio de color, los espacios en los que se mide, los diferentes sistemas de coordenadas de color y las relaciones entre las mismas, así como la forma de calcularlo a partir de la reflectancia espectral de un objeto o material dado.

3.3.1. Color

El color es caracterizado por tres magnitudes principales: luminosidad, Hue (tono) y Croma (saturación) [39].

El color es la impresión producida por un tono de luz en los órganos visuales, o más exactamente, es una percepción visual que se genera en el cerebro de los humanos y otros animales al interpretar las señales nerviosas que le envían los fotorreceptores en la retina del ojo, que a su vez interpretan y distinguen las distintas longitudes de onda que captan de la parte visible del espectro electromagnético.[40]

La luminosidad, también denominada brillo, es la cantidad de luz emitida o reflejada por un objeto. En términos de color, esto se traduce como la oscuridad o claridad. Ejemplo: rojo claro, rojo oscuro.

El Hue (tono) es la longitud de onda dominante en el color observado. Especifica si el color es puro, o si se trata de una mezcla de varios. Ejemplo: rojo, amarillo, verde, azul, ver figura 3.9

El croma, medido radialmente desde el centro de cada rebanada, representa la "pureza" de un color (relacionado con la saturación), siendo el croma inferior menos puro

(mas desteñido, como en los pasteles). Tenga en cuenta que no hay un límite superior intrínseco para el croma. Diferentes áreas del espacio de color tienen diferentes coordenadas cromáticas máximas. Por ejemplo, los colores amarillo claro tienen un croma considerablemente mayor que los violetas claros, debido a la naturaleza del ojo y la física de los estímulos de color. Los colores sólidos vivos están en el rango de aproximadamente 8. El croma, también conocido como saturación, describe la viveza o la falta de brillo del color. Ver figura 3.9[41]

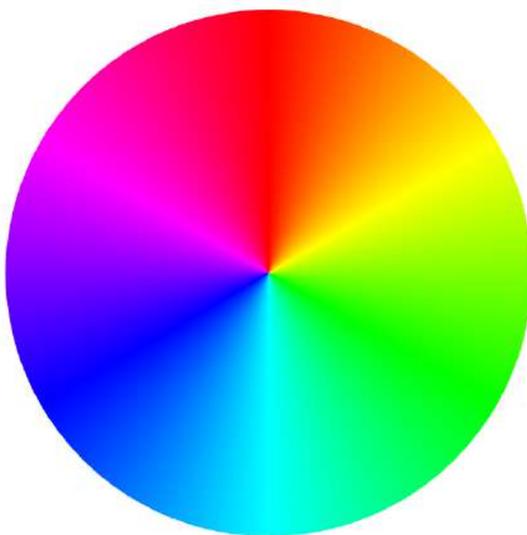


Figura 3.7: Círculo cromático.

En el círculo cromático [42], mostrado en Figura 3.7, la luminosidad se encuentra asociada a la dimensión vertical del círculo, siendo la mayor luminosidad la correspondiente a la parte más alta, y la de menor a la más baja; el tono varía según el ángulo que se tome en el círculo; y la saturación cambia según la distancia al centro, encontrándose los colores centrales menos saturados que los próximos al borde.

3.3.2. Coordenadas Cromáticas

Un espacio de color es un sistema a través del cual es posible crear, especificar y visualizar el color. El color se especifica usando tres coordenadas o parámetros que describen la posición del mismo en un determinado espacio de color. La referencia estándar más común es el espacio de color CIE Lab o CIEXYZ [43]. Estos espacios están diseñados para abarcar el rango de colores que el ser humano es capaz de percibir.

El CIE ha definido un sistema para clasificar el color según el sistema visual humano HVS (human visual system), midiendo las sensibilidades de tres bandas en el ojo, relacionando colores espectrales con mezclas de tres luces de colores. La distribución espectral de energía SPD (spectral power distribution) de un color es transmitida con estas funciones de sensibilidad para producir valores triestímulo que representan un único color. Sin embargo, el tipo de luz y la geometría de observación afectan a las medidas, por lo que estos valores son definidos con gran precisión.

Uno de los primeros espacios matemáticos de color que fue definido es el espacio de color CIE 1931 [44]. En él, la combinación de los valores X, Y, Z, o colores primarios, permite definir cualquier color en el diagrama de cromaticidad CIE. Estos tres números son los llamados valores triestímulo, que no constituyen colores reales, sino una estructura matemática. Representan un único color perceptible, y las combinaciones de diferentes longitudes de ondas que presentan el mismo conjunto de valores triestímulo, representarán un color indistinguible para el ojo humano. Este sistema no resulta intuitivo, dado que en algunos casos es necesario sumar dos estímulos y restar el tercero. Apoyado en este sistema, aparece el espacio de color definido por el CIE en ese año, denominado Yxy, el sistema básico sobre el que se construyeron los que le sucedieron y se encuentra definido de manera que todos los colores visibles pueden ser descritos empleando únicamente valores positivos, al contrario de lo que sucede con los valores triestímulo. Se puede definir una tercera coordenada z, resultando redundante ya que $x+y+z = 1$ [45]. Este espacio presenta un importante problema, y es que el diagrama de cromaticidad es no lineal, por lo que distancias iguales no corresponden a diferencias de color iguales. La variable Y denota luminosidad o brillo total, lo cual constituye una medida de la sensibilidad del ojo humano, mientras que x e y son las coordenadas cromáticas que especifican un cierto tono y saturación.

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad (3.5)$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z}$$

Años después, en 1976, el CIE creó el sistema L*a*b* [46][47] basado en el anterior, pero que solucionaba el problema. La información sobre el color se ofrece, en este sistema, en función de un blanco de referencia, denotado por el subíndice n. Este sistema de colorimetría CIELAB es un modelo de color perceptualmente uniforme, diseñado para medir y representar todos los colores visibles por el ojo humano de manera objetiva y consistente. Fue desarrollado por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) en

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

1976 y ha sido ampliamente adoptado en diversas industrias debido a su versatilidad y precisión.

$$\begin{aligned} L^* &= 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - 16 \\ a^* &= 500 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \\ b^* &= 200 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \end{aligned} \quad (3.6)$$

Siendo X_n , Y_n , Z_n los valores triestímulo de un blanco de referencia. En este diagrama de color (ver Figura 3.8), el brillo crece con la altura, pero en representaciones bidimensionales es, de las tres coordenadas, el que no aparece, por ser el de menor relevancia. La coordenada a se coloca en el eje de abscisas, y la coordenada b en el de ordenadas, determinando así cualquier punto en el diagrama bidimensional o en el plano horizontal del diagrama tridimensional [48].

El sistema CIELAB es útil en varios campos y tiene diversas aplicaciones, algunas de las cuales incluyen:

- Industria de impresión y diseño gráfico: En este ámbito, se utiliza para definir colores estándar y asegurar la consistencia en la reproducción de colores en diferentes dispositivos de impresión, monitores y materiales impresos. Permite comunicar y especificar colores de manera precisa entre diseñadores, impresoras y fabricantes.
- Industria textil y moda: En la fabricación y diseño de textiles, prendas de vestir y productos relacionados, este sistema se emplea para controlar la consistencia del color en diferentes lotes de tejidos y para crear paletas de colores armoniosas.
- Industria automotriz: En el diseño y fabricación de automóviles, el sistema CIELAB ayuda a definir los colores estándar para pinturas y recubrimientos utilizados en la industria automotriz. Esto garantiza que los colores de diferentes piezas y modelos de automóviles sean consistentes.
- Industria Cosmética: Se utiliza para definir colores estándar para maquillaje y otros productos cosméticos, lo que garantiza una reproducción coherente y precisa de los colores en diferentes lotes de productos.

- Control de calidad: En diversas industrias, es utilizado para controlar la calidad del color de productos manufacturados, asegurando que los productos cumplan con los estándares de color establecidos.
- Investigación científica y académica: En la investigación del color y la percepción visual, el sistema CIELAB es una herramienta fundamental para medir y cuantificar las diferencias de color y la apariencia visual.
- Aplicaciones médicas y odontológicas: En la odontología, es utilizado para medir el color de los dientes y para fabricar restauraciones dentales que se adapten al color natural de los dientes del paciente.

Las relaciones no lineales para L^* , a^* y b^* pretenden imitar la respuesta logarítmica del ojo, donde L significa brillo o luminosidad, mientras que a^* y b^* son las coordenadas cromáticas que, en semejanza con el sistema anterior, determinan un cierto valor del tono y de la saturación. Es importante entender que indican los parámetros L^* , a^* y b^* :

- Parámetro L^* : Representa el componente de luminosidad o brillo. Toma valores desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). Un valor de $L^* = 50$ generalmente se considera el punto medio entre blanco y negro. Valores más altos indican mayor luminosidad, mientras que valores más bajos indican menor luminosidad.
- Parámetro a^* : Representa el componente de cromaticidad en el eje rojo-verde. Toma valores negativos y positivos. Los valores negativos indican verde, mientras que los valores positivos indican rojo. El valor cero ($a^* = 0$) representa una neutralidad en el eje rojo-verde.
- Parámetro b^* : Representa el componente de cromaticidad en el eje amarillo-azul. También toma valores negativos y positivos. Los valores negativos indican azul, mientras que los valores positivos indican amarillo. El valor cero ($b^* = 0$) representa una neutralidad en el eje amarillo-azul.

El sistema de mayor uso actualmente hace uso del mismo diagrama que $L^* a^* b^*$ [49] (ver Figura 3.8), Sin embargo empleando coordenadas cilíndricas en lugar de rectangulares, se encuentra el sistema $L^* C^* h^*$, donde L^* es la luminosidad, C^* es la saturación o chroma y h^* es el tono o hue, ver (Figura 3.9).

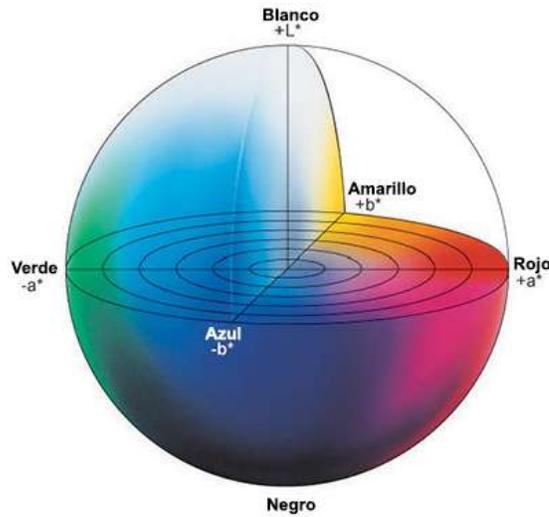


Figura 3.8: Representación gráfica del espacio de color $L^*a^*b^*$.

$$\begin{aligned}
 L^* &= 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - 16 \\
 C^* &= (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}} \\
 h^* &= \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right)
 \end{aligned} \tag{3.7}$$

Las coordenadas de color $L^*C^*h^*$ también son parte del sistema de colorimetría CIE (Comisión Internacional de Iluminación) y son una alternativa a las coordenadas $L^*a^*b^*$. Estas coordenadas representan un color en términos de su luminosidad (L^*), su cromaticidad (C^*) y su tono (h^*).

- L^* (Luminosidad): Es similar al componente L^* en el sistema Lab^* . Representa la claridad o luminosidad del color. El valor L^* varía de 0 a 100, donde 0 es negro (ausencia total de luminosidad) y 100 es blanco (máxima luminosidad). Un valor de L^* de 50 generalmente se considera un gris neutro.
- C^* (Cromaticidad): Representa la saturación o intensidad del color. Cuanto mayor sea el valor de C^* , más saturado será el color, y cuanto menor sea, más cercano estará al gris. C^* se refiere a la distancia desde el punto central (eje de grises) hasta el punto que representa el color en el espacio de color $L^*C^*h^*$.
- h^* (Color): Representa la tonalidad del color y se mide en grados. Define el ángulo en el círculo cromático que va desde el eje de los grises ($L^* = 50$) hasta

el punto que representa el color. Esto nos da información sobre el matiz o color dominante.

Para entenderlo mejor, podemos visualizar las coordenadas $L^*C^*h^*$ en un espacio tridimensional, donde el eje vertical representa la luminosidad (L^*), el eje horizontal la cromaticidad (C^*), y la dirección del ángulo (h^*) indica el tono del color ver figura 3.9.

El uso de las coordenadas $L^*C^*h^*$ tiene algunas ventajas sobre $L^*a^*b^*$, especialmente cuando se trata de describir la apariencia visual de los colores, ya que el espacio $L^*C^*h^*$ se asemeja más a cómo percibimos y hablamos sobre los colores en nuestra vida cotidiana.[50]

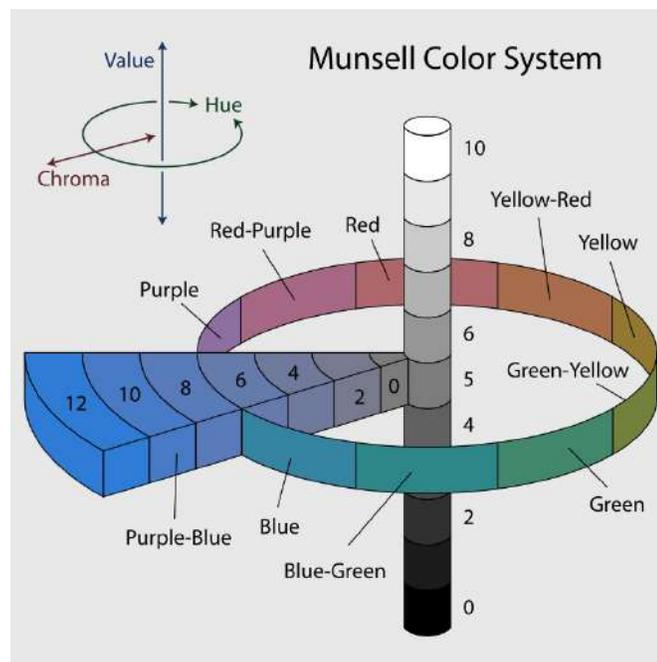


Figura 3.9: El sistema de color Munsell muestra: un círculo de matices con un valor de 5 cromas 6; los valores neutros de 0 a 10; y los cromas de purpura-azul (5PB) al valor 5. Representación gráfica del espacio de color $L^* C^* h^*$.

La Figura 3.10 muestra un corte transversal de los espacios de color tridimensionales representados en las Figuras 3.8 y 3.9. En esta representación se comprueba que la coordenada L^* es la misma en ambos espacio, aunque que a^* y b^* sean coordenadas cartesianas y C^* y h polares [51].

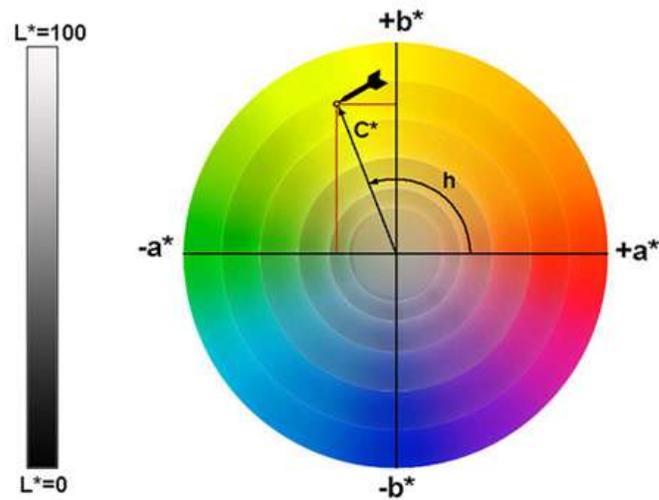


Figura 3.10: Diagrama bidimensional de color $L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$.

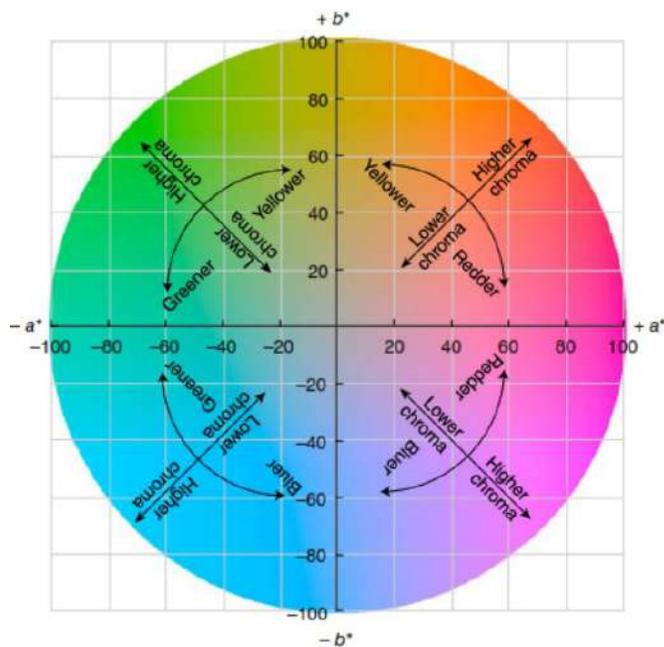


Figura 3.11: Descriptores de color para cambios de tono y croma. El fondo de color tiene una constante $L^*=70$,

Imagen obtenida de [52].

La figura 3.11, muestra un diagrama con un fondo coloreado para los colores que rodean el estándar con una luminosidad igual al estándar como método visual para relacionar la posición con el color. Se usan términos tales como más rojo (Redder), más amarillo (Yellower), más verde (Greener), más azul (Bluer), croma más alto y croma

más bajo (Lower and Higher Chroma. Los modificadores de tono cambian en cada cuadrante a^*b^* , como se muestra en la Figura 3.11.

3.3.3. Cálculo de las coordenadas a partir de $R(\lambda)$

Para realizar la explicación de esta sección es necesario explicar brevemente algunos conceptos, tales como: Iluminantes, firma espectral, observador estándar y valores triestímulos.

Iluminantes

Para las aplicaciones colorimétricas, un Iluminante es la cuantificación de una fuente, a diferencia de una fuente de luz, un iluminante no es un objeto físico sino una representación de la distribución de energía espectral, en un gráfico o forma numérica de % energía relativa en función de la longitud de onda (ver Figura 3.12). En particular, se ha definido la distribución espectral energética de una serie de iluminantes (algunos de los cuales no existen como fuentes luminosas) para poder usarlos en la descripción del color. Éstos son los gráficos de las distribuciones espectrales de algunos iluminantes estándares de la CIE, todos ellos normalizados con un valor máximo de 0,0 a 1,0. Los datos espectrales para estos iluminantes son almacenados en instrumentos de medición de color para calcular el color de una muestra en base a como se vería bajo cada fuente de luz. Estos espectros determinados y que se utilizan en los cálculos en sustitución de las fuentes reales representan fuentes ficticias llamadas iluminantes.[53]

Firma Espectral

Una firma espectral de reflectancia difusa es una representación gráfica o un conjunto de datos (Longitud de onda λ [nm] versus % Reflexión), que muestra cómo un objeto o una superficie refleja la luz a diferentes longitudes de onda del espectro visible. En otras palabras, es una curva que muestra la cantidad de luz reflejada por el objeto en cada longitud de onda.

Cada material tiene una firma espectral de reflectancia única que lo caracteriza y lo distingue de otros materiales. Esta firma espectral es el resultado de la interacción entre la luz incidente y las propiedades ópticas del material, como la absorción, la dispersión y la reflexión de diferentes longitudes de onda, ver gráfica 5.2, cabe recordar que las curvas de reflectancia difusa de las lechugas, fueron obtenidas con un espectrómetro OceanOptic 4000, el cual tiene una fuente de luz de Halógeno, y el iluminante que intenta imitar la distribución espectral de dicha fuente, es un Iluminante D65, es decir,

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

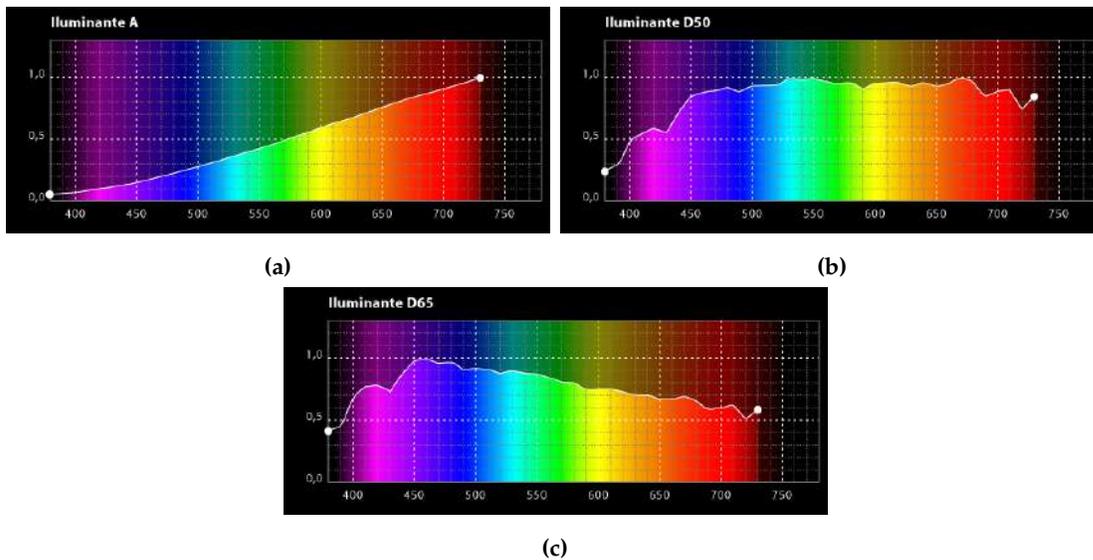


Figura 3.12: a) Iluminante A, es una tabla de energía relativa por cada franja de 10 en 10 nm entre los 300 y los 830 nm. Es un intento de describir la iluminación de una típica bombilla de filamento incandescente. b) Iluminante D50, es una tabla de energía relativa por cada franja de 10 en 10 nm entre los 300 y los 830 nm, describe las condiciones medias de iluminación en un mediodía en Europa Occidental, con una temperatura de color de 5000 K. c) Iluminante D65, es una tabla de energía relativa por cada franja de 10 en 10 nm entre los 300 y los 830 nm, El iluminante D65 describe las condiciones medias de iluminación en un mediodía en Europa Occidental, con una temperatura de color de 6500 K

Imagen obtenida de [54]

la superficie de las hojas de las lechugas fueron iluminadas con una fuente de luz de Halógeno en el proceso de la captación de la luz reflejada; observando la misma gráfica se observa variaciones en las curvas, tal variación como se explicará mas adelante, dependerá de varios factores, tales como: estado de salud de la hoja de la lechuga, actividad biológica, estrés hídrico, etc.

Observador Estándar

Según la teoría tricromática de la visión en color[52], un observador puede igualar un estímulo de color mediante una mezcla aditiva, es decir añadiendo tres colores primarios. Por tanto, cualquier estímulo cromático se puede especificar mediante la cantidad de primarios que un observador necesitará para igualar o hacer corresponder ese estímulo. De hecho, el observador estándar es una tabla en la que se indica cuánto de cada primario necesita un observador promedio para igualar cada longitud de onda. [53]

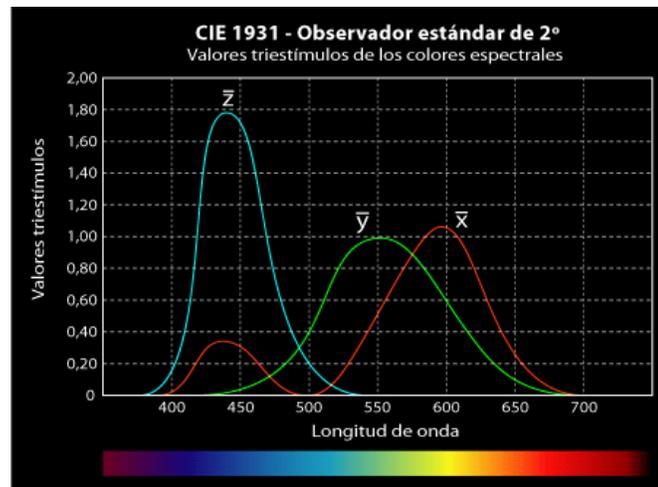


Figura 3.13: En el gráfico se ven las funciones de correspondencia o igualación de colores (colour matching functions: CMF) para los primarios CIE XYZ. Esas son literalmente las cantidades de los tres primarios que un observador promedio necesitará para igualar una unidad de luz en cada longitud de onda.

Imagen obtenida de [54].

Se procede a explicar cómo se obtienen las coordenadas cromáticas a partir de la medida de la reflectancia de un objeto, para distintas longitudes de onda.

la Figura 3.14, muestra de forma esquemática y resumida el proceso de como calcular las coordenadas ($L^*a^*b^*$) y ($L^*C^*h^*$), a partir de la firma espectral o datos de la reflectancia difusa, todo esto se realizó cargando las data de Iluminantes estándares

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

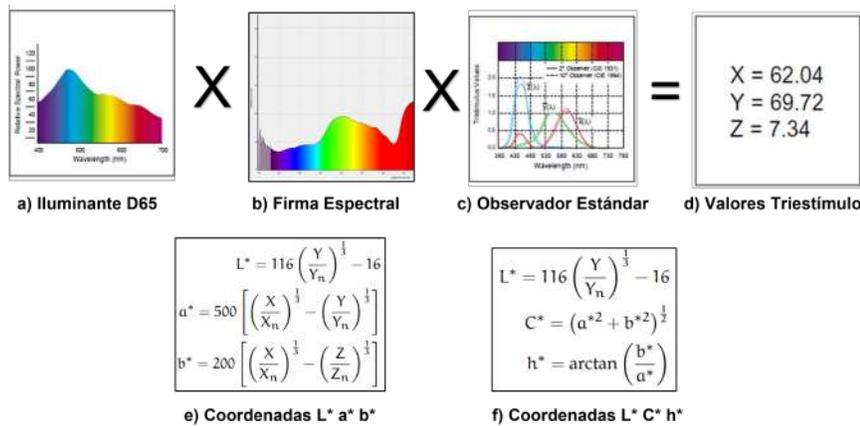


Figura 3.14: Representación esquemática del paso de reflectancias a coordenadas cromáticas.

y observadores estándares obtenidas de CIE Technical Report [55] en un código realizado en Matlab 2023A, adicionalmente la data de la reflectancia difusa obtenida de las lechugas italiana y Orejona tratadas en esta tesis es cargada y utilizada para el calculo de sus coordenadas ($L^*a^*b^*$) y ($L^*C^*h^*$) posteriormente:

- **a) Escoger el iluminante estándar:** El iluminante estándar escogido para realizar los cálculos es el D65, debido a que la fuente de luz del OceanOptic USB 4000 es de halógeno, El iluminante D65 es una fuente de luz estándar que representa la luz del día en condiciones de luz natural al mediodía, Como se explicó anteriormente, el iluminante estándar es una tabla de datos de energía espectral relativa [adimensional], en función de la longitud de onda [55], dicha tabla o matriz emula una fuente ficticia con una temperatura de color particular.
- **b) Carga la data de reflectancia difusa:** La data obtenida de reflectancia difusa es una serie de valores que representan la cantidad de luz reflejada en porcentaje por una superficie de en este caso de hojas de lechugas italianas y orejonas a diferentes longitudes de onda del espectro visible. Esta información se obtuvo mediante un espectrofotómetro OceanOptic USB 4000 que mide el porcentaje de reflectancia de luz reflejada para cada longitud de onda.
- **c) Escoger observador estándar CIE:** El observador estándar CIE (X, Y, Z) describen la sensibilidad del ojo humano a diferentes longitudes de onda del espectro visible. Esta data [55] es utilizada para convertir los datos de reflectancia difusa en valores triestímulo (X, Y, Z).
- **d) Calcular los valores triestímulo (X, Y, Z):** Para cada longitud de onda, se realiza la multiplicación del iluminante por la curva de reflectancia y por la curva

de observador estándar. Luego, se integra la respuesta para obtener los valores X, Y, Z , que representan las cantidades de estímulo de los tres tipos de conos en el ojo humano.

- **e) y f) Calcular las coordenadas ($L^*a^*b^*$) y ($L^*C^*h^*$):** Finalmente, las coordenadas ($L^*a^*b^*$) y ($L^*C^*h^*$) se calculan a partir de los valores triestímulo normalizados utilizando las siguientes ecuaciones 3.6 y 3.7.

Se realizó la validación del programa de obtención de parámetros colorimétricos, tales como Coordenadas (Lab^*) y (LCh^*), utilizando MATLAB 2023A. Se tomaron 10 espectros de lechugas, y se utilizó el programa desarrollado en MATLAB para analizarlos. Al mismo tiempo, se obtuvieron los datos de los parámetros colorimétricos generados por el software comercial SpectraSuite para los mismos espectros de reflectancia mencionados anteriormente.

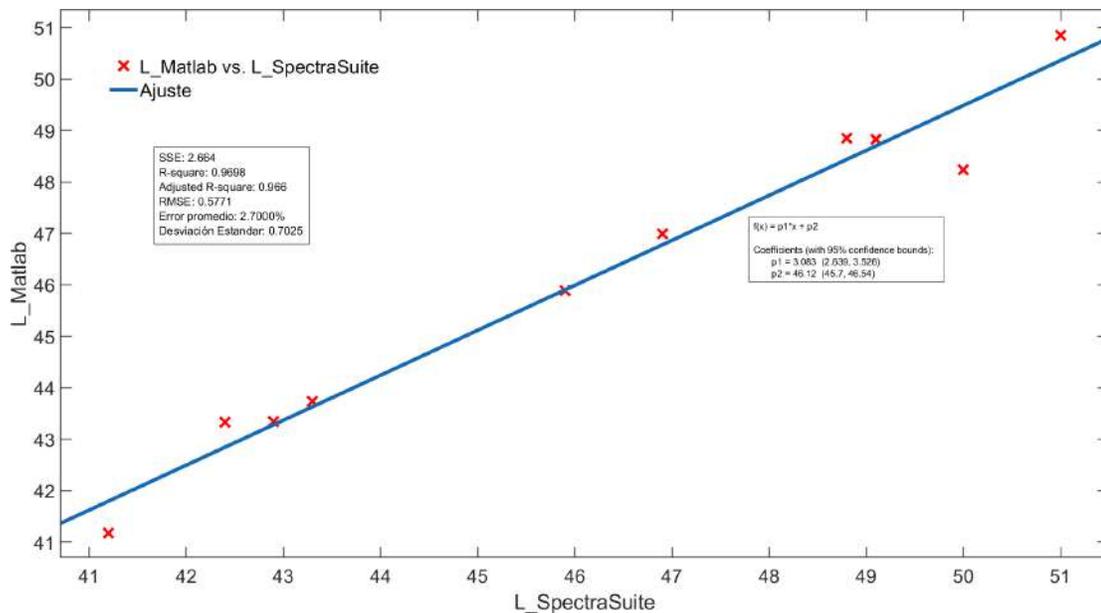


Figura 3.15: Curva de validación entre programa comercial y programa realizado en Matlab.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de error respecto a la diferencia entre los valores obtenidos por ambos programas (ver figura 3.15). Adicionalmente, se graficó la luminosidad de los 10 espectros obtenidos con el programa comercial versus la luminosidad de los 10 espectros calculados con el programa en MATLAB.

Después de realizar la gráfica, se llevó a cabo el ajuste de una recta, la cual dependiendo del porcentaje de ajuste, es también el error que hay entre ambos programas, entre

mayor sea el porcentaje de ajuste (Donde 0 representa ajuste nulo y 100 sería el ajuste máximo), mas precisos son los valores obtenidos programa en MATLAB respecto al comercial.

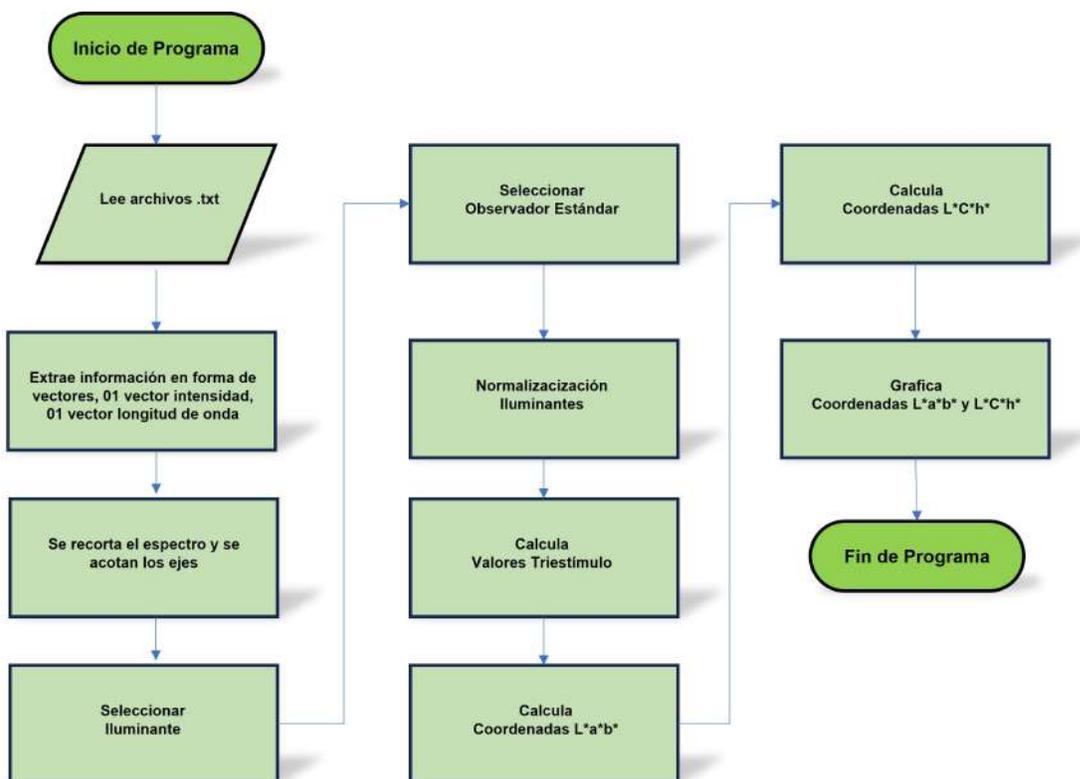


Figura 3.16: Diagrama de flujo del programa realizado en Matlab para cálculo de parámetros colorimétricos.

La figura 3.16, muestra el diagrama de flujo que recoge de forma general los pasos realizados por el programa realizado en MATLAB para calcular los parámetros colorimétricos, llámese coordenadas $(L^*a^*b^*)$ y $(L^*C^*h^*)$, donde comienza con el inicio del programa eliminando todas las variables almacenadas en el espacio de trabajo y cierra todas las figuras, ventanas gráficas abiertas. Siguiendo el proceso de cargar los datos de espectros de reflectancia difusa de las variedades de lechugas obtenidos con el espectrómetro OceanOptic USB 4000, en formato .TXT, extrayendo la información en forma de vectores, un vector para el porcentaje de reflectancia y un vector para la longitud de onda en nanómetros. Subsecuentemente se realiza el recorte del espectro pues la colorimetría solo esta definida para el rango del visible adicionalmente se toman mediciones discretas a intervalos regulares de 10 nm para que los datos puedan ser interpolados o integrados utilizando las funciones de sensibilidad espectral del

observador estándar y obtener valores significativos en términos de percepción del color y la luminancia por el ojo humano. Inmediatamente se selecciona y se carga en memoria el iluminante más cercano a la fuente de luz con la cual estamos iluminando la superficie de la hoja de la lechuga, que nuestro caso es D65, seguidamente y se carga la matriz de datos del observador estándar, se procede a normalizar el iluminante a 100, ya habiendo seleccionado y cargado, los espectros de reflectancia difusa, el iluminante y y el observador estándar, se procede a realizar la integración (suma) de la multiplicación de estas entradas y usando las ecuaciones antes mencionadas se calcula los valores triestímulos (X, Y, Z), obtenidos estos valores se procede a calcular respectivamente las coordenadas ($L^*a^*b^*$) y ($L^*C^*h^*$), finalizando con la graficación de las respectivas coordenadas.

3.3.4. Coordenadas cromáticas de la clorofila.

La clorofila es una mezcla de pigmentos verdes (a y b), junto con varios pigmentos amarillos. Se encuentra en organismos procariotas como las cianobacterias, así como en organismos eucariotas que poseen cloroplastos en sus células, como las plantas y ciertos grupos de protistas o algas [56]. Esta biomolécula es esencial en el proceso de la fotosíntesis, ya que permite a las plantas absorber la energía de la luz solar.

Las moléculas de clorofila presentan típicamente dos bandas de absorción en el espectro visible: una en la región azul (400-500 nm) y otra en la región roja (600-700 nm) [57][58]. Esto resulta en la reflectancia de la luz en la parte media del espectro, correspondiente al color verde (500-600 nm). Es debido a esta propiedad que la vegetación muestra un color verde característico (ver Figura 3.17).

La Figura 3.18 muestra el perfil de reflectancia espectral de las clorofilas a y b [59], procedentes de una hoja de vegetación, obtenido del espectro de absorbancia, estas curvas de reflectancias en unidades de % de reflectancia en función de la longitud de onda λ [nm].

A partir de este espectro mostrado en la 3.18, el autor[60] realiza un programa el cual permite calcular los valores triestímulo y a partir de ellos las coordenadas cromáticas, obteniéndose los resultados que se muestran en tabla 3.1.

Como se observa en la Figura 3.19, las coordenadas cromáticas que se obtienen se encuentran en la zona verde-amarillo, lo cual demuestra que el código programado funciona correctamente, el autor [60] realiza esta afirmación debido a que habría sido validado al comparar sus medidas con un colorímetro Konica Minolta CR-400.

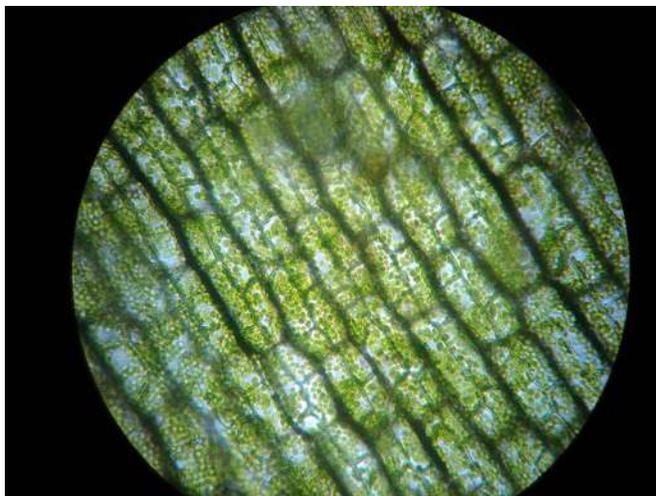


Figura 3.17: Vista microscópica de los cloroplastos.

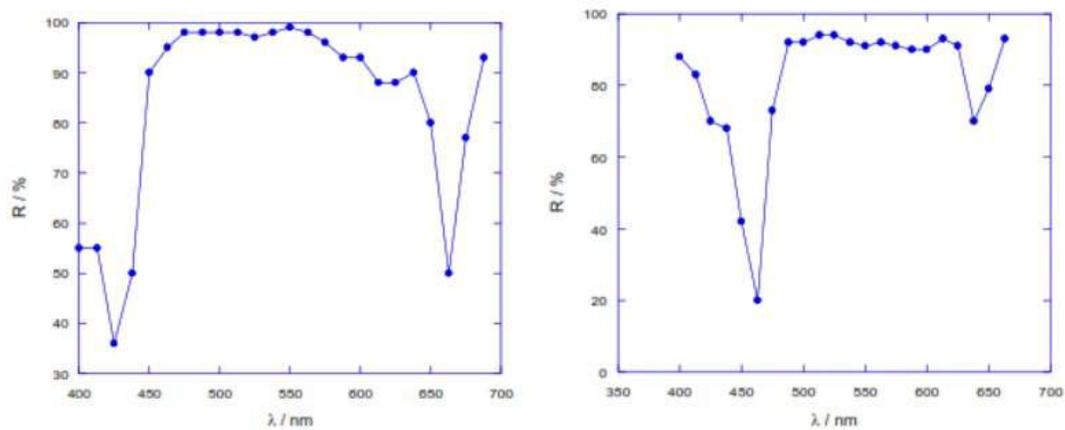


Figura 3.18: Reflectancia espectral de la clorofila a y b.
imagen obtenida de [59]

Clorofilas	Valores triestímulo	Coordenadas cromáticas	
a	X = 17,5646	L* = 51,909	L* = 51,909
	Y = 20,0639	a* = -7,915	C* = 10,594
	Z = 18,1374	b* = 7,041	h* = -41,656
b	X = 16,3245	L* = 50,567	L* = 50,567
	Y = 18,8976	a* = -8,996	C* = 18,192
	Z = 13,1898	b* = 15,812	h* = -60,363

Tabla 3.1: Valores triestímulo XYZ y coordenadas cromáticas (L*a*b*) y (L*C*h*) de las clorofilas a y b.

Tabla obtenida de [59]

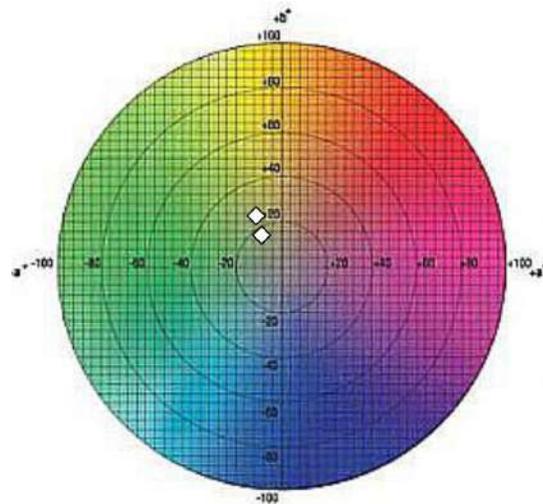


Figura 3.19: Diagrama Lab donde se representan, con dos rombos, las coordenadas cromáticas de las clorofilas, siendo "a" la más próxima al origen.

imagen obtenida de [59]

Dado todo esto, Andrés et al, [60], comenta que que el color que se ha determinado no presenta un valor alto de croma o saturación, encontrándose, sus coordenadas, próximas al origen. Este hecho encuentra su explicación en que la clorofila estudiada es la correspondiente al pigmento puro, a una molécula de clorofila, no siendo representativa del color verde saturado de una hoja de vegetación, la cual constituye una composición de muchas moléculas enlazadas.

3.4. Utilidad y Comportamiento de las firmas espectrales de reflectancia difusa en vegetales.

El estudio de las firmas espectrales de reflectancia difusa [61][62] [13] [4] [63] [11] entre otros, han proporcionado las bases para este estudio, donde se han citado varios artículos actualizados, observándose como eje central que la utilidad del estudio de éstas permite:

- Identificación de características de las plantas: Las firmas espectrales permiten identificar características específicas de las plantas, como la presencia de pigmentos fotosintéticos (clorofila), estructuras celulares y contenido de agua.
- Detección de estrés en las plantas: Las firmas espectrales pueden indicar la presencia de estrés en las plantas, ya sea por sequía, enfermedades, deficiencias nutricionales o contaminación.
- Evaluación de la salud vegetal: Al comparar las firmas espectrales de plantas sanas con las de plantas enfermas, se pueden identificar patrones que ayuden a evaluar la salud general de las poblaciones vegetales.
- Estimación de contenido de clorofila: La clorofila es esencial para la fotosíntesis, y su contenido se puede estimar mediante la espectroscopia de reflectancia, lo que proporciona información sobre la eficiencia fotosintética de las plantas.
- Determinación de composición química: Las firmas espectrales pueden revelar información sobre la composición química de las plantas, incluyendo la presencia de compuestos como proteínas, lípidos y carbohidratos.

El comportamiento de las firmas espectrales de reflectancia difusa de lechuga y vegetales en general dependerá de las propiedades ópticas de las hojas vienen determinadas por la estructura foliar, el contenido de agua y la concentración de sustancias bioquímicas. Como se observa en la sección de resultados 5, en figura 5.2, se observa la variación espectral entre una lechuga, seca, madura, bajo estrés hídrico. A forma de observar el comportamiento y respuesta espectral de la vegetación en general, la (Figura [64]) muestra los rasgos típicos en los tres principales dominios espectrales de una hoja verde y sana.

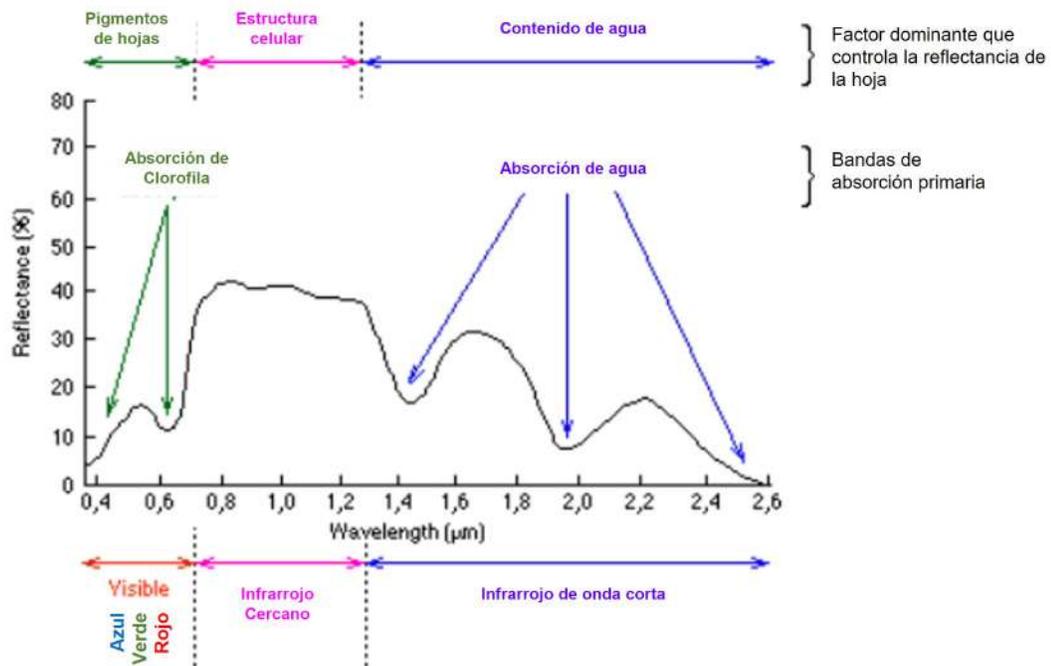


Figura 3.20: Respuesta espectral característica de la vegetación verde.

Imagen tomada de [64]

El espectro de reflectancia, en las plantas adultas y sanas, se caracteriza por una fuerte absorción en el azul (480 nm), un incremento en la reflectancia en el verde (550 nm), una fuerte absorción en el rojo (670 nm) y una fuerte reflectancia y transmitancia en el infrarrojo cercano (NIR) 700 a 1500 nm. En el espectro visible (VIS) (400-700 nm), los pigmentos fotosintéticos son los que condicionan la respuesta espectral de la vegetación, mientras que en la región del infrarrojo cercano (700-1.350 nm), es la estructura interna de la hoja el factor condicionante. En el rango visible (400-700 nm), se pueden observar dos bandas de absorción principales, en el azul (480 nm) y en el rojo (670 nm), debido a la absorción de los dos pigmentos principales de las hojas; la clorofila A y B, que representan el 65 % total de los pigmentos foliares de las plantas. Estas bandas de absorción inducen un pico de reflectancia en la banda verde (550 nm). Por esta razón, la clorofila se denomina comúnmente “pigmento verde”. [65]

En cuanto al comportamiento espectral de la vegetación, la vegetación sana tiene una reflectividad baja en el visible aunque con un pico en el color verde debido a la clorofila. La reflectividad de la vegetación es muy alta en el infrarrojo próximo debido a la escasa absorción de energía por parte de las plantas en esta banda. En el infrarrojo medio hay una disminución especialmente importante en aquellas longitudes de onda

en las que el agua de la planta absorbe la energía.

La vegetación enferma presenta una disminución de la reflectividad en las bandas infrarrojas y un incremento en el rojo y azul. Se observa también que la reflectividad de una planta depende de su contenido en agua. Cuando el contenido de agua aumenta disminuye la reflectividad ya que aumenta la absorción de radiación por parte del agua contenida en la planta, como se observa en la figura 3.21.

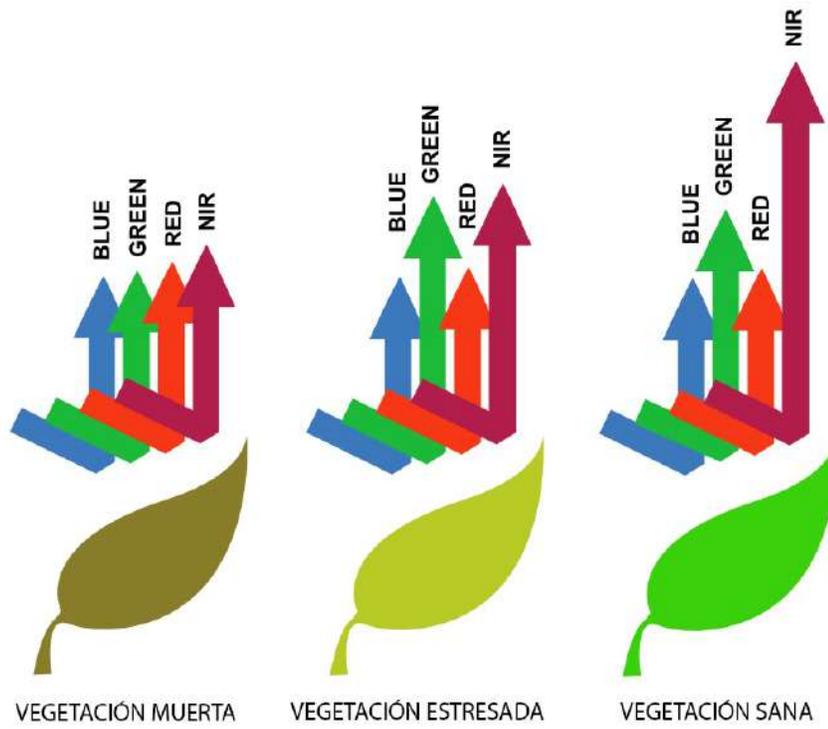


Figura 3.21: Comportamiento de los espectros dependiendo del estado de la hoja.
Imagen obtenida de [66]

Una planta normal y saludable absorberá la luz visible azul y roja y reflejará la luz verde visible, por lo que se ven verdes a nuestros ojos. Además de la luz verde visible, las plantas también reflejan el infrarrojo cercano (NIR), ya que este tipo de luz no se usa activamente para el proceso de fotosíntesis. Cuando una planta está débil o enferma, el reflejo de esta luz NIR disminuye considerablemente.

En resumen, la forma particular de la firma espectral de una hoja está determinada por la interacción de la luz con los pigmentos y tejidos presentes en la hoja, a través de procesos de absorción, transmisión y reflexión. La absorción selectiva de diferentes longitudes de onda por los pigmentos, especialmente las clorofilas, y las propiedades

ópticas de los tejidos determinan la forma característica de la firma espectral de una hoja.

3.4.1. Colores orgánicos en la vegetación y La lumínica de los pigmentos

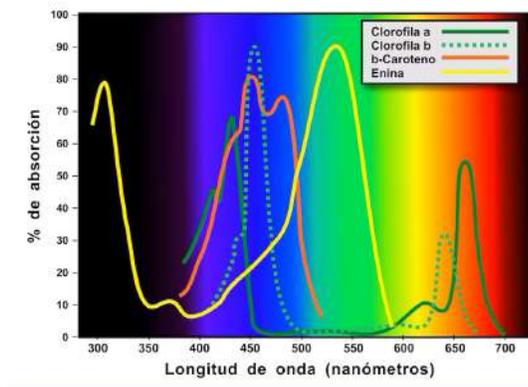


Figura 3.22: Superposición de espectros de absorción de las clorofilas a y b, el beta-caroteno y la enina, una antocianina típica. Mientras que las clorofilas y el beta caroteno absorben en las partes azul y amarillo/rojo del espectro visible, la enina absorbe principalmente en la parte verde del espectro, donde las clorofilas no absorben nada.

Imagen obtenida de [67]

Las hojas de lechugas, al igual que en otros árboles y plantas, experimentan cambios de coloración influenciados por la interacción entre el genotipo y el ambiente, principalmente la luz. Durante su proceso de crecimiento y maduración, las lechugas también pueden cambiar su color, y esto está relacionado con la variedad, pigmentos presentes en ellas, como la clorofila, los carotenoides y las antocianinas [67, 68].

La luz es fundamental para capturar la energía necesaria para la fotosíntesis, y los pigmentos presentes en los cloroplastos y vacuolas celulares son los encargados de absorberla [67]. Cada pigmento tiene su propio espectro de absorción, lo que significa que solo ciertas longitudes de onda de luz pueden excitarlos, como se observa en la figura 3.22. Cuando un pigmento absorbe un fotón, se excita y comienza el proceso fotosintético, donde la energía luminosa se convierte en energía química utilizada para producir azúcares [69].



Figura 3.23: Colores Orgánicos en las Plantas.
Imagen obtenida de [67]

Bajo ciertas en condiciones ambientales, algunas lechugas pueden perder su color verde habitual debido a la disminución de la fotosíntesis y la degradación de la clorofila. La reducción de horas de luz solar afecta el proceso fotosintético, lo que resulta en la producción de otros pigmentos, como los carotenoides, que confieren a las hojas de lechuga una gama de tonalidades que van desde amarillo hasta naranja [67].

Algunas variedades de lechuga también pueden desarrollar colores púrpuras o rojizos en sus hojas debido a la presencia de antocianinas. Estos pigmentos, que absorben los rayos verdes y azules, son responsables de los tonos rojos, púrpuras y azules en las hojas de lechuga en determinadas condiciones ambientales o durante su etapa de maduración [68].

La función fisiológica de estos pigmentos en las hojas de lechuga está relacionada con la captura de la energía luminosa necesaria para la fotosíntesis. La clorofila, que domina en las hojas verdes, es esencial para convertir la luz solar en energía química utilizada para la producción de azúcares. Por otro lado, los carotenoides y las antocianinas también participan en el proceso fotosintético y desempeñan un papel importante en la disipación del exceso de energía luminosa, protegiendo así a la planta de posibles daños [67].

En conclusión, las hojas de lechugas, al igual que otras plantas, exhiben cambios de coloración debido a la presencia de pigmentos específicos como la clorofila, los carotenoides y las antocianinas. Estos pigmentos desempeñan un papel fundamental

en el proceso fisiológico de la planta, permitiendo la captura de energía luminosa y su transformación en energía química a través de la fotosíntesis. La diversidad de colores observados en las hojas de lechuga es el resultado de una compleja interacción entre estos pigmentos y el entorno en el que crecen las plantas [67, 68].

3.4.2. Fotosistemas.

La figura 3.24 resume la función de los fotosistemas en la fotosíntesis. En la fotosíntesis, los organismos foto-autótrofos, como algas, cianobacterias o plantas, captan energía de la luz solar y la transforman en energía química en forma de ATP (Adenosín Trifosfato o Trifosfato de Adenosina) es la molécula portadora de la energía primaria para todas las formas de vida (bacterias, levaduras, mohos, algas, vegetales, células animales) y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato o NADPH, es una coenzima reducida que juega un papel clave en la síntesis de los hidratos de carbono en los organismos fotosintéticos) como portador de electrones, que después utilizan para sintetizar glúcidos a partir de compuestos inorgánicos sencillos, liberando oxígeno en el proceso.

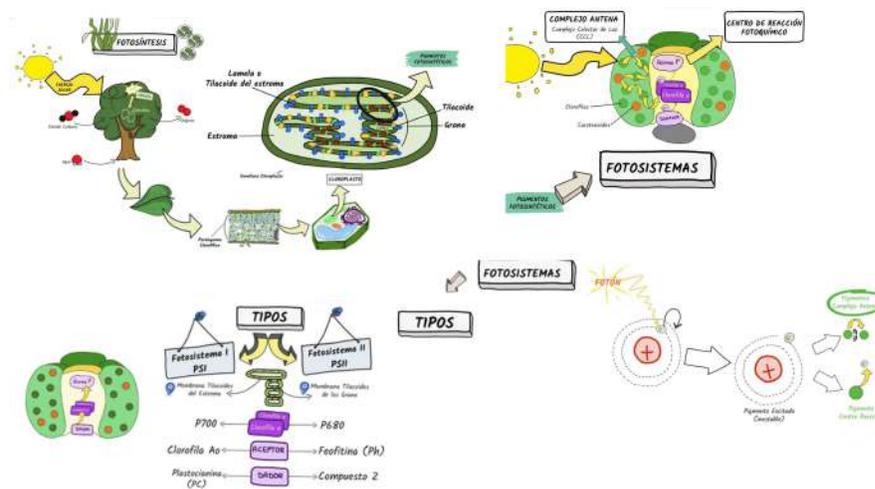


Figura 3.24: Esquema general de los fotosistemas en el proceso de fotosíntesis.

En las plantas superiores, la fotosíntesis se realiza principalmente en las hojas, concretamente en su parénquima clorofílico, tejido compuesto por células que contienen un elevado número de cloroplastos, en el interior de estos orgánulos de doble membrana es donde se localizan estos pigmentos fotosintéticos encargados de captar la luz solar, concretamente se sitúan en las membranas de los Tilacoides, estructuras en forma de panqueques cuyo interior se le llama Lumen, el medio que rodea los Tilacoides se

conoce como estroma, se pueden encontrar apilados llamados Grana o extendidos por todo el estroma en el caso de las Lamelas. [70]

Los pigmentos fotosintéticos se agrupan en complejos moleculares llamados Fotosistemas, cada fotosistema se compone de un Complejo Antena o Complejo Colector de Luz (CCL), formados por proteínas y cientos de pigmentos fotosensibles donde se encuentran entre los que se encuentran mayoritariamente clorofilas A y B, pero también otros pigmentos que absorben luz en diferentes longitudes de onda que las clorofilas, especialmente Carotenoides. En definitiva, este complejo actúa como antena Solar, recoge la energía de los fotones de luz y la transfiere por resonancia desde un pigmento a su pigmento vecino, canalizando esta energía hasta una molécula especial un Dímero de Clorofila A, localizado en el llamado del centro de reacción fotoquímico, segundo componente de un fotosistema.

Donde se encuentra un aceptor primario que recibe los electrones excitados de la clorofila y un dador de electrones encargado de rellenar el hueco electrónico que ha quedado en la clorofila [70].

Como ya se comentaba anteriormente, cuando un pigmento absorbe luz, sucede que cuando los pigmentos captan fotones, se excitan, es decir, los electrones saltan a un orbital de mayor energía y más alejado del núcleo. Un pigmento excitado es inestable, y para recuperar su estabilidad puede transferir su energía extra por resonancia a pigmentos vecinos como sucede en el complejo antena, o bien ceder su electrón de alta energía a una molécula vecina, como sucede en centro de reacción.

Hay dos tipos de fotosistemas, el fotosistema I o PSI que se localiza preferentemente en las membranas de los tilacoides no apilados en contacto con el estroma y el fotosistema II o PSII localizado en las membranas de los tilacoides de los granas, con respecto al centro de reacción, el pigmento diana del fotosistema I tiene dos moléculas de clorofila a denominadas P700 por tener su punto de máxima absorción a los 700 nm, mientras que el fotosistema II denominado P680 tiene su máxima absorción en 680 nm.[70]

Los electrones de alta energía de la clorofila son cedidos a un aceptor primario que en el caso del fotosistema I es la clorofila A₀ y en el fotosistema II es la Feofitina, ambos cederán esos electrones a otras moléculas, el hueco electrónico que ha quedado en la clorofila es cubierto por electrones de baja energía procedentes de un dador de electrones que en caso del fotosistema I es la plastocianina y en el fotosistema II es el compuesto Z quien cede los electrones procedentes del agua.[70]

3.5. Cromatografía de Papel

La cromatografía (del griego chroma, color y graphos, escritura) está íntimamente relacionada con los pigmentos fotosintéticos. El término fue utilizado por el botánico ruso Tswett en su experiencia publicada en 1906, para definir el procedimiento de separar un extracto vegetal a través de una columna rellena con carbonato de calcio. Los diferentes colores de los pigmentos obtenidos no solo inspiraron al nombre sino además, propiciaron el inicio formal de una metodología que revolucionó los campos más diversos de la química. Su impacto científico fue confirmado cuando los británicos Martin y Synge recibieron el Premio Nóbel en 1952 por la invención de la cromatografía de partición en el año 1941. Posteriormente, la utilización de trozos de papel en lugar de las tradicionales columnas, dieron origen a la cromatografía sobre papel descrita por Consden, Gordon y Martin en el año 1944. [71]

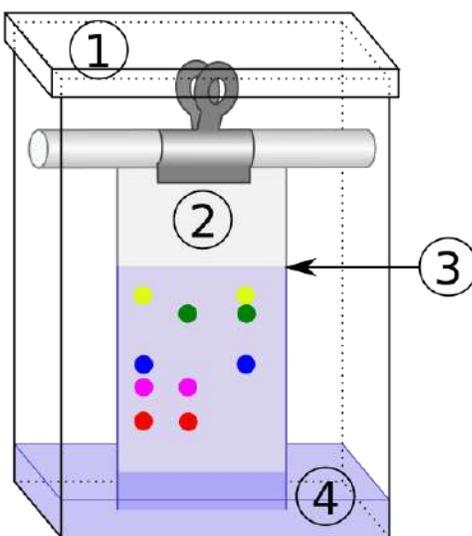


Figura 3.25: Cromatografía planar o de papel: (1). Cámara cromatográfica, (2). Fase estacionaria, (3). frente de solvente, (4). fase móvil.

La cromatografía de papel es una técnica de separación que se utiliza para analizar mezclas de compuestos químicos en una muestra. Consiste en cuatro pasos fundamentales:

1. Preparación de la muestra y la fase móvil: Se aplica una pequeña cantidad de la muestra que se quiere analizar en la parte inferior de una tira de papel absorbente, conocida como fase estacionaria. Luego, la fase móvil, que suele ser

- un solvente líquido, se coloca en un recipiente, de modo que la parte inferior de la tira de papel esté sumergida en el solvente sin tocar el punto donde se colocó la muestra.
2. Migración de los componentes: La tira de papel se coloca verticalmente en el recipiente, permitiendo que la fase móvil ascienda por capilaridad a través del papel. A medida que la fase móvil se mueve, arrastra consigo los componentes de la muestra que se han disuelto en ella.
 3. Separación de los componentes: Cada componente de la muestra tiene una afinidad diferente por la fase estacionaria y la fase móvil. Esto hace que los componentes se muevan a diferentes velocidades a través del papel. Los compuestos que tienen una mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven más lentamente, mientras que los que tienen una mayor afinidad por la fase móvil se mueven más rápidamente.
 4. Identificación y análisis: Una vez que la fase móvil ha recorrido una distancia determinada, se retira la tira de papel del recipiente. Se pueden observar diferentes manchas o bandas separadas a lo largo de la tira. Cada mancha corresponde a un componente de la muestra. La distancia recorrida por cada componente se compara con la distancia recorrida por el solvente, lo que permite calcular el factor de retención (R_f), una medida utilizada para identificar y cuantificar los componentes presentes en la muestra.

La teoría que sustenta la cromatografía de papel se basa en las interacciones entre los compuestos de la muestra, el papel y el solvente. Los componentes se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil según su afinidad química y polaridad. Los compuestos que son más solubles en la fase móvil se mueven más rápidamente, mientras que aquellos con una mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven más lentamente. Esta técnica es ampliamente utilizada en la separación y análisis de compuestos orgánicos, tanto en laboratorios de investigación como en aplicaciones prácticas en diversas industrias [72].

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la cromatografía, como un método físico de separación mediante el cual los componentes de una mezcla se separan por distribución entre dos fases: una estacionaria (FE) y otra móvil (FM).[73].

El proceso de separación de cada sustancia es el resultado de un equilibrio entre dos conjuntos de fuerzas contrapuestas: las de propulsión, promovidas por el flujo de la fase móvil y las fuerzas de retención, originadas por la fase estacionaria.[74][75]

De este modo, cada sustancia migra de forma diferencial, conforme a sus propias características físicas y al tipo de fuerzas intermoleculares que pueda establecer con ambas fases. Aunque diferentes criterios son utilizados para clasificar a los métodos cromatográficos en los cuales la fase móvil es un líquido, el basado en el tipo de mecanismo de separación que se establece entre las sustancias a separar y las fases involucradas es ampliamente compartido en la bibliografía. [74][76][77].

En una cromatografía tenemos una mezcla de moléculas que queremos separar en una fase móvil (generalmente líquida, un disolvente) sobre una fase estacionaria (usualmente un papel de filtro). El disolvente se desplaza absorbido mediante capilaridad por esta fase, arrastrando las sustancias disueltas en la mezcla. Cada molécula es arrastrada con distinta fuerza dependiendo de las sustancias de las fases y la propia naturaleza de las sustancias a separar.

En resumen, diferentes pigmentos aparecerán a cierta distancia de su punto inicial porque las moléculas de estos colores tienen diferentes tamaños, formas y solubilidades. Las moléculas que se disuelven mejor se desplazan rápidamente y más lejos.[78]

3.6. Espectroscopía

3.6.1. Espectrofotometría de Reflectancia Difusa

El esparcimiento es el fenómeno óptico clave en la espectroscopia de reflectancia difusa. Cuando se ilumina una muestra vegetal con luz blanca o una fuente de banda ancha, los fotones interactúan con la materia en la muestra. Algunos fotones son absorbidos por componentes de la planta, mientras que otros son dispersados en todas las direcciones debido a las interacciones con las estructuras celulares y los componentes químicos de la muestra como se muestra en la figura 3.27 .

La reflexión es el retorno de la radiación por una superficie, sin un cambio en la longitud de onda como se observa en la figura 3.27. La reflexión puede ser:

- Especular (el ángulo de incidencia es igual al ángulo de reflexión)
- Difusa (el ángulo de incidencia no es igual al ángulo de reflexión)

Cada superficie devuelve tanto reflejos especulares como difusos. Algunas superficies pueden devolver en su mayoría especular reflexión, mientras que otros pueden devolver en su mayoría reflexión difusa. La reflexión especular aumenta proporcionalmente con la cantidad de brillo en una superficie.

La calibración del equipo OceansOptic 4000 se realiza con el Spectralon WS-1, ver figura 4.6, que tiene una reflectividad de 99 % (400-1500 nm), La reflexión se expresa como un porcentaje ($\%R_\lambda$) en relación con la reflexión de una sustancia de referencia estándar, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\%R_\lambda = \frac{S_\lambda - D_\lambda}{R_\lambda - D_\lambda} * 100\% \quad (3.8)$$

Donde:

S_λ = la intensidad de la muestra en la longitud de onda λ

D_λ = la intensidad oscura en la longitud de onda λ

R_λ = la intensidad de referencia en la longitud de onda λ

La figura 3.26 muestra una configuración de reflexión típica. Una fuente de luz envía luz a través de la pata de entrada de una sonda de reflexión sobre una muestra. Un soporte de sonda de reflexión sostiene la sonda en un ángulo de 90 o 45 grados con respecto a la superficie. La pata de salida de la sonda de reflexión lleva la luz de la muestra al espectrómetro, que está conectado a la computadora.

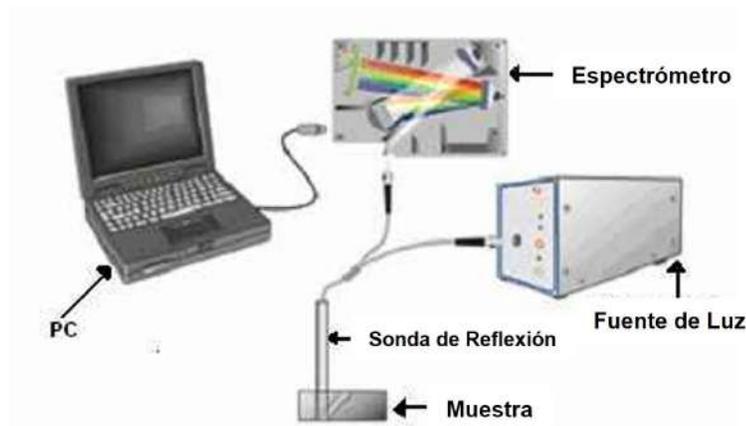


Figura 3.26: Configuración típica de reflexión difusa
Imágen obtenida de [79]

La espectroscopia de reflectancia difusa es una técnica analítica no destructiva que se utiliza para caracterizar la composición química y estructural de materiales sólidos y superficies. En esta técnica, se ilumina la superficie de la muestra con una fuente de luz y se mide la intensidad de la luz reflejada en función de la longitud de onda [80].

La reflectancia difusa se refiere al hecho de que la luz se refleja en muchas direcciones diferentes al interactuar con la superficie de la muestra, como se muestra en la imagen

3.27. La espectroscopia de reflectancia difusa es una técnica de medición integradora que mide la cantidad de luz reflejada en todas las direcciones. A diferencia de otras técnicas de espectroscopia, como la espectroscopia de transmisión o la de emisión, la espectroscopia de reflectancia difusa no requiere que la muestra sea transparente o emisora [81].

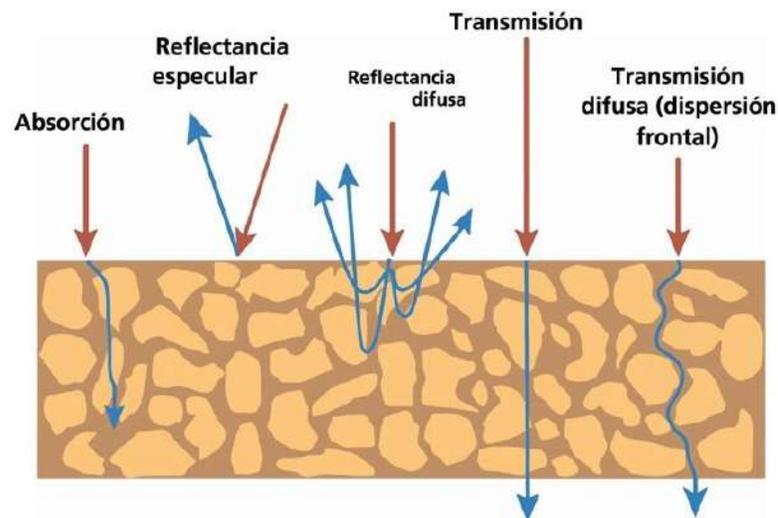


Figura 3.27: Interacción de la luz con la materia, Reflectancia Difusa.
Imagen obtenida de [82]

La espectroscopia de reflectancia difusa se utiliza en una variedad de campos, incluyendo la ciencia de los materiales, la química, la ingeniería, la geología y la biología. Esta técnica se utiliza para determinar la composición química de una muestra, incluyendo la presencia de elementos y compuestos específicos, así como la cantidad relativa de diferentes componentes. La espectroscopia de reflectancia difusa también se utiliza para estudiar la estructura molecular de las superficies de la muestra, incluyendo la presencia de enlaces químicos específicos y grupos funcionales.

El análisis de los datos de espectroscopia de reflectancia difusa implica la comparación de la respuesta espectral de la muestra con la respuesta espectral de un conjunto de muestras de referencia conocidas. La reflectancia difusa se expresa en términos de porcentaje de reflectancia (%R) y se representa gráficamente como una curva de reflectancia versus longitud de onda. La forma y la intensidad de la curva de reflectancia se utilizan para identificar y cuantificar los componentes de la muestra [38].

En resumen, la espectroscopia de reflectancia difusa es una técnica de análisis químico

no destructiva que se utiliza para determinar la composición química y estructural de una muestra sólida o superficie. Esta técnica se utiliza en una amplia variedad de campos y se basa en la medición de la reflectancia difusa de la luz en función de la longitud de onda. La interpretación de los datos implica la comparación de la respuesta espectral de la muestra con la respuesta espectral de un conjunto de muestras de referencia conocidas.

Los picos de intensidad en una curva de espectroscopia de reflectancia difusa pueden estar asociados con la presencia y cantidad de cromóforos en la muestra. Los cromóforos son grupos funcionales de la molécula que absorben la luz en una región específica del espectro electromagnético y que se relacionan con su color. Algunos ejemplos de cromóforos son los grupos carbonilo, los grupos azo y los grupos nitrilo [38].

Cuando un cromóforo está presente en una muestra, absorberá ciertas longitudes de onda de luz y reflejará otras. Esto se traducirá en un pico de intensidad en la curva de espectroscopia de reflectancia difusa que corresponde a la longitud de onda absorbida por el cromóforo. La intensidad del pico estará relacionada con la cantidad o concentración de cromóforo presente en la muestra. Por lo tanto, se puede utilizar la espectroscopia de reflectancia difusa para determinar la cantidad o concentración de cromóforos en una muestra.

Además, la posición y la forma del pico de absorción pueden proporcionar información sobre la estructura química de la molécula que contiene el cromóforo. Por ejemplo, la posición del pico de absorción del grupo carbonilo en la región del infrarrojo cercano (NIR) puede indicar si el grupo carbonilo está presente en una molécula de cetona o aldehído. La presencia de otros grupos funcionales en la molécula también puede afectar la posición y la forma de los picos de absorción [38].

En resumen, los picos de intensidad en una curva de espectroscopia de reflectancia difusa pueden estar asociados con la presencia y cantidad de cromóforos en la muestra, y su posición y forma pueden proporcionar información sobre la estructura química de la molécula. La espectroscopia de reflectancia difusa es una técnica útil para la identificación y cuantificación de cromóforos en una amplia variedad de muestras.

3.6.2. Aplicación de corrección MSC en espectros de reflectancia difusa.

La corrección de dispersión multiplicativa MSC [83], como su nombre lo indica, se usa normalmente para compensar los efectos de dispersión de la luz y los cambios en la longitud del camino. De hecho, la dispersión de la luz de muestras sólidas y emulsiones puede dar lugar a desviaciones multiplicativas que dependen de la

longitud de onda [84]. MSC minimiza estas desviaciones ajustando un modelo lineal entre un espectro de referencia y otros espectros del conjunto de datos utilizando el método de mínimos cuadrados lineales. El espectro de referencia a menudo se elige como el promedio de todos los espectros en el conjunto de datos. Los coeficientes del modelo se utilizan para calcular los espectros ideales (es decir, corregidos por msc). Después de la aplicación de MSC, todos los espectros parecen tener el mismo nivel de absorbancia.

Después de la adquisición de los espectros de reflectancia de la lechuga Italiana y Orejona, Se empleó (MSC), la cual es una técnica muy utilizada para corregir la variación en los datos de espectroscopía debido a factores ambientales [62][85][86][87], como la humedad y la temperatura. La idea detrás de la MSC es que los datos de espectroscopía se pueden representar como una combinación lineal de dos componentes: uno que representa la información espectral deseada (componente esencial) y otro que representa la variación debido a factores ambientales no deseados (componente no esencial).

Esta técnica se basa en la idea de dividir los datos en estos dos componentes mediante un proceso matemático conocido como descomposición en valores singulares (SVD). Luego, se aplica una corrección multiplicativa para eliminar el efecto de la componente no esencial y la precisión de las mediciones.

Para entender mejor la técnica, Imagine que se tiene una fotografía tomada en un día soleado, pero hay un reflejo en la imagen que dificulta ver claramente los detalles. La corrección de dispersión múltiple es como un filtro que se puede aplicar a esa fotografía para eliminar el reflejo y así poder ver mejor los detalles.

En el análisis de datos, a veces nos encontramos con un problema similar. Podemos tener mediciones de diferentes variables, pero hay una especie de ruido en los datos que dificulta identificar los patrones o tendencias reales. La corrección de dispersión múltiple (MSC) es una técnica que nos ayuda a eliminar ese ruido no deseado de los datos.

La MSC funciona de la siguiente manera: en lugar de analizar directamente los valores brutos de las variables, la técnica busca identificar patrones generales en los datos y los usa como referencia. Luego, ajusta los datos originales para que se ajusten a esos patrones de referencia.

Volviendo a la analogía de la fotografía, es como si la corrección de dispersión múltiple encontrara un patrón de cómo deberían lucir las cosas sin el reflejo y luego ajustara la imagen original para que se parezca más a ese patrón.

Al aplicar la MSC, los datos corregidos resultantes nos permiten ver con mayor claridad las relaciones o tendencias reales entre las variables sin la interferencia del ruido no deseado.

En resumen, la corrección de dispersión múltiple (MSC) es una técnica utilizada en espectroscopía NIR y Vis para eliminar los efectos ambientales no deseados en las mediciones y mejorar la precisión de las mismas abstraendo el ruido no deseado de los datos y revelar los patrones o tendencias subyacentes de manera más clara.

3.6.3. Esparcimiento Espectroscopia Raman.

La Espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material ya sea compuesto orgánico o inorgánico permitiendo así su identificación. La espectroscopia Raman está basada en el fenómeno de esparcimiento inelástico.[88]

Esta es una de las técnicas más usadas en química en la identificación de moléculas. En esta técnica se hace incidir luz de una fuente monocromática de radiación para producir esparcimiento elástico e inelástico en una muestra.[89]

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico Hindú Chandrasekhara Venkata Raman en el año 1928, lo que lo llevo a la obtención del premio Nobel de física en 1930. Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de esparcimiento de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares. Sus estudios sobre este fenómeno se inspiraron en los trabajos realizados anteriormente por Rayleigh. A diferencia de Rayleigh que afirmaba que el color azul del mar no es más que el azul del cielo visto en reflexión, Raman realizó un experimento sencillo con el que pudo demostrar que el color azul del agua procedía de un fenómeno propio, posteriormente explicado como esparcimiento de la luz debido a su interacción con las moléculas del agua.[90]

En 1923, mientras estudiaba el esparcimiento de la luz en el agua y en alcoholes purificados, uno de sus alumnos observó un cambio de color en un rayo de luz solar al ser filtrada y atravesada, él y su equipo no fueron capaces de eliminar este efecto y por tanto sospecharon que el fenómeno era una propiedad característica de la sustancia. Tras realizar diversos estudios durante los cinco años siguientes, Raman y su discípulo Krishnan, publicaron el famoso artículo en la revista Nature en 1928, en el que describieron este nuevo tipo de radiación secundaria.[90]

3.6.4. Fundamento de Espectroscopia Raman

La Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar éste ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destructiva.

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio frecuencial, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman.

Las nuevas frecuencias, $+\nu_r$ y $-\nu_r$, son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente. Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular. Un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa por una línea horizontal se muestra en la figura 3.28.

Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$ (donde h es la constante de Plank) mucho mayor a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o

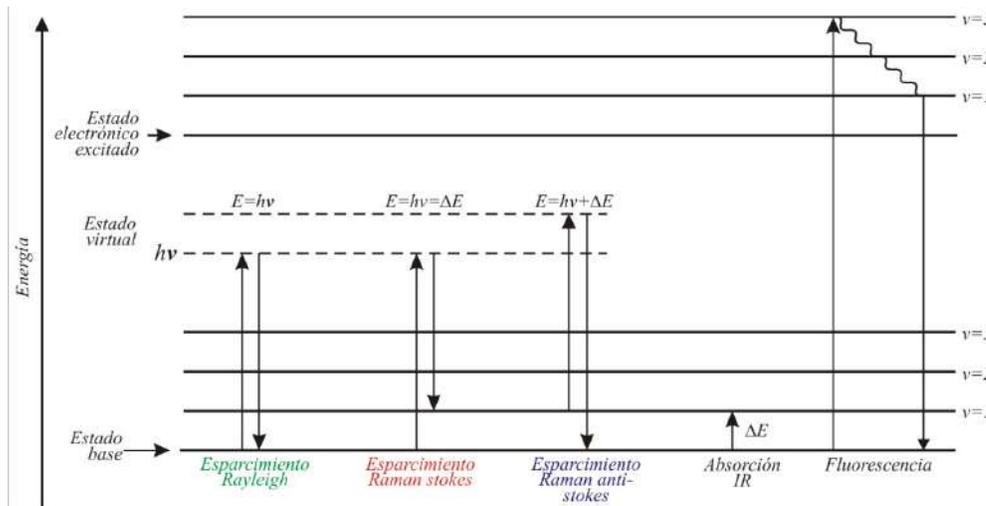


Figura 3.28: Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones Luz-Materia

rotacionales) de la molécula, chocan con ella, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción son dispersados (del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^{11} incidentes). Esta dispersión puede ser interpretada como el proceso siguiente: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula.

Pueden distinguirse los siguientes casos:

- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico ya que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia no que el incidente, dando lugar a la dispersión Rayleigh;
- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta de la incidente, se dice que el choque es inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón); en este caso pueden darse dos fenómenos:
 - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se

produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se produce la dispersión Raman Stokes;

- Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce la dispersión Raman anti-Stokes.

Cada material tendrá un conjunto de valores ν_r característicos de su estructura poli-atómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman. El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado u al que se produce. El número de onda normalizado es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda, que se expresa en cm^{-1} .

$$\nu_r = \frac{v}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (3.9)$$

Como se observa en la figura 3.28, el espectro Raman está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh.

También se observó durante la experiencia de la práctica como se ve en la figura 6, la emisión Raman Stokes en la que un haz de luz violeta incide sobre una muestra de agua carbonatada, el haz emerge con una longitud de onda mayor (Cían), como producto de la relación entre la luz incidente y la manera de vibrar y rotar de la moléculas de la sustancia. La absorción se produce cuando la frecuencia de la radiación incidente coincide con la frecuencia de vibración de la molécula y esta se eleva a un estado electrónico excitado.[91]

La fluorescencia es otro fenómeno que ocurre al incidir un haz de luz en un material. Los procesos de esparcimiento Raman y fluorescencia no están relacionados. En la fluorescencia la molécula absorbe completamente al fotón incidente el cual pasa a un estado electrónico excitado. Transcurre un tiempo (vida media) en el que la molécula sufre una nueva transición al estado electrónico inferior, re-emitiendo radiación, nor-



Figura 3.29: Esparcimiento Raman. Un haz incidente violeta y un haz emergente verde, resultado de las vibraciones moleculares de la sustancia iluminada (agua carbonatada y azúcar).

malmente de longitud de onda superior a la que se absorbió. En el efecto Raman, el fotón como un todo, nunca resulta absorbido, sino que perturba a la molécula y le induce a que sufra una transición electrónica.

La diferencia esencial radica en el hecho de que la fluorescencia puede disminuirse agregando especies que, mediante colisiones, disminuyan la energía de la molécula excitada por absorción de radiación antes de que aquella la re-emita, mientras que en el esparcimiento Raman no es posible llevar a cabo este proceso debido a que la molécula excitada nunca alcanza un estado excitado en una situación intermedia y por tanto no es posible que permanezca el tiempo necesario para que pueda tener lugar la colisión que la inhiba. El estado intermedio que alcanza una molécula en un proceso de esparcimiento Raman es un estado virtual, que no necesariamente coincide con ningún estado propio de la molécula. En la Figura 3.28 se muestra el diagrama de Jablonsky donde se representan las transiciones energéticas anteriormente mencionadas.

En resumen, el enfoque principal de esta investigación se centra en el estudio de la lechuga (*Lactuca sativa* L.), un vegetal altamente consumido a nivel mundial debido a su diversidad en formas y colores. La lechuga se cultiva tanto en entornos interiores como exteriores, en regiones de clima templado y subtropical, utilizando sistemas hidropónicos y suelos para su cultivo. Este vegetal posee una historia antigua, remontándose a civilizaciones como las egipcias, griegas y romanas, aunque se cree que sus orígenes se encuentran en el Cercano Oriente. A lo largo del tiempo, se han desarrollado diferentes variedades de lechuga, cada una con características morfológicas distintivas.

El marco teórico abarca aspectos relacionados con la botánica y morfología de la

lechuga, describiendo sus principales características, incluyendo la raíz pivotante, los tallos ramificados, las hojas en forma de roseta y las flores amarillas agrupadas en inflorescencias. Además, se detallan cuatro variedades botánicas diferentes de *Lactuca sativa* L., cada una con atributos específicos.

En términos fisiológicos, el cultivo de lechuga pasa por tres etapas importantes: la formación de rosetas de hojas, la formación de cogollos compactos y la fase reproductiva. La luz y la temperatura juegan un papel crucial en el proceso de acogollado y floración.

El proceso de germinación de las semillas de lechuga se describe como un proceso complejo que involucra varias etapas, como la imbibición, la elongación de la radícula y la aparición de cotiledones. El crecimiento y desarrollo de la planta se puede dividir en cuatro estadios: plántula, roseta, encabezamiento y reproductivo.

Para un cultivo exitoso de lechuga, es esencial tener en cuenta factores ambientales como la temperatura, la humedad, la precipitación, el pH y la altitud, así como asegurar un suelo rico en materia orgánica y con buen drenaje.

La sección sobre fotosíntesis se enfoca en los pigmentos responsables de este proceso, como las clorofilas y los carotenoides, y cómo estos absorben diferentes longitudes de onda de luz. Se explica la Ley de Lambert-Beer, que rige la absorción de luz en la fotosíntesis.

La importancia del color en la interacción visual se destaca, y se explican las magnitudes de luminosidad, tono y saturación en diferentes espacios de color como CIELab y CIELCh.

En la metodología, se detallan los conceptos necesarios para el cálculo de las coordenadas cromáticas ($L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$) a partir de las firmas espectrales de reflectancia difusa de la lechuga.

Este marco teórico proporciona a los siguientes capítulos una base sólida para el estudio detallado de la lechuga y sus aspectos, fisiológicos y botánicos. Con esta información, se pueden planificar y desarrollar adecuadamente la metodología para la medición de parámetros fisiológicos relevantes. Además, la comprensión de los aspectos de colorimetría y las coordenadas cromáticas (Lab^* y LCh^*) permitirá un análisis más preciso de la vegetación y la caracterización de las variedades de lechuga en función de sus propiedades espectrales.

METODOLOGÍA Y MATERIALES

En este capítulo se describirá la metodología utilizada en la investigación, incluyendo la planificación de las mediciones, la muestra biológica estudiada y el montaje experimental con espectroscopía de reflectancia difusa. Además, se detallarán los materiales y equipos utilizados, como el espectrómetro OceanOptic USB 4000 y el espectrómetro QE65000, así como los procedimientos experimentales llevados a cabo.

Este capítulo es crucial para comprender cómo se llevó a cabo el estudio. Describe los pasos y procedimientos utilizados para obtener los espectros de reflectancia difusa y Raman de la muestra biológica. Además, proporciona información detallada sobre los equipos y materiales utilizados, lo que garantiza la reproducibilidad de los resultados. La descripción de la metodología y los materiales contribuye a la validez y confiabilidad de la investigación, respaldando los resultados y conclusiones presentados en la tesis.

4.0.1. Planificación de las mediciones

Las mediciones se llevaron a cabo dentro de un marco de tiempo de 58 días, siendo estas realizadas diariamente en promedio, diferenciándose así de anteriores investigaciones donde solo toman las muestras y mediciones de un conjunto de variedades de lechugas solamente en una sola etapa de crecimiento de la misma, comúnmente en la etapa antes de la reproducción o floración, resultando en 4 experimentos en total, siendo estos en el siguiente orden: obtención de la firma espectral en reflectancia difusa, a lo largo de los 58 días, estudio de detección de azúcares usando espectroscopia Raman para el último día de cultivo, obtención de curvas de la Absorbancia para el último, y realización de cromatografía de papel para observar la separación de pigmentos presentes en la lechuga. Se muestra un esquema general en la figura 4.1

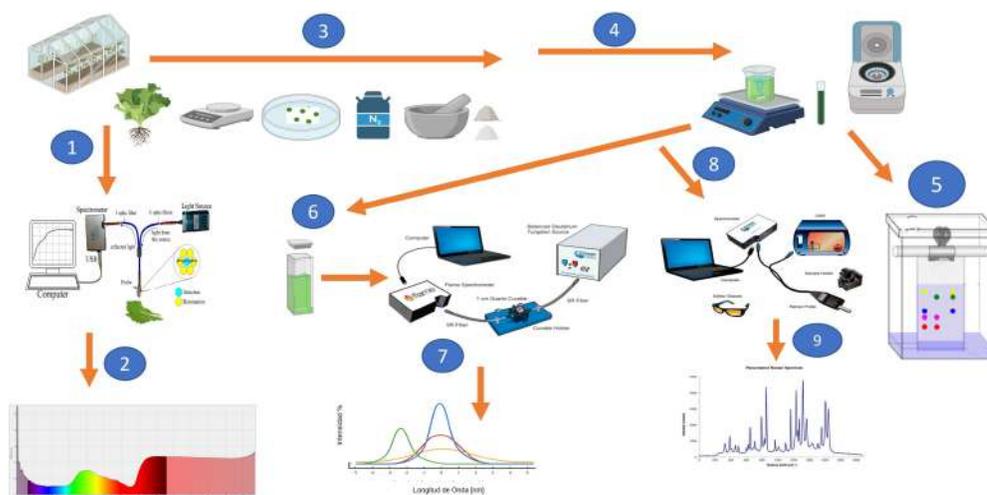


Figura 4.1: Esquema general de los Experimentos Realizados.

4.0.2. Muestra Biológica sujeta a Estudio

Se cultivó dos variedades de lechuga (*Lactuca orejona*, Var: *Parris Island*) y (*Lactuca italiana*, Var: *Parris starfighter*) en un invernadero sin calefacción, ventilado en la localidad antes mencionada.

4.0.3. Montaje experimental con Espectroscopía de Reflectancia Difusa

Para adquirir los datos espectrales de reflectancia difusa de las lechugas italianas y Orejonas respectivamente, se utilizó un espectrómetro Espectrómetro OceanOptic USB 4000 como se observa en la imagen 4.2, la fibra del espectrómetro se colocó encima de cada hoja de lechuga a una distancia de separación de 10mm, previo estudio realizado como se explica en la sección de Obtención de los Espectros de Reflectancia Difusa de lechugas Italianas y Orejonas.

Los especímenes de lechuga estaban en una canasta hidropónica con sustrato de espuma fenólica. Se realizó la respectiva calibración como se explica mas adelante, tomando en cuenta que la iluminación en el laboratorio fue la misma durante todos los experimentos.

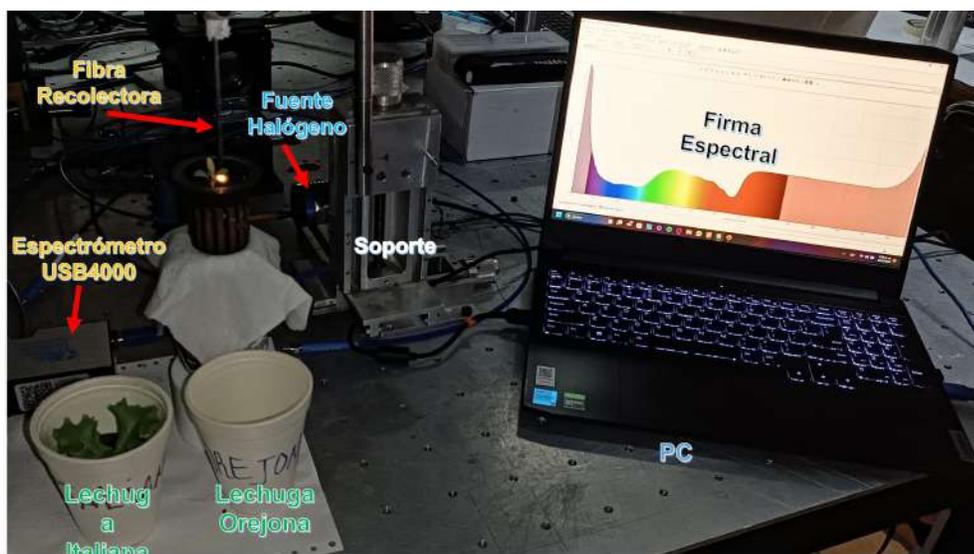


Figura 4.2: Montaje experimental para la realización de la toma de la firma espectral de las variantes de lechugas, donde se observa la dos variantes de lechugas, el espectrómetro Ocean Optics USB4000, la fibra recolectora de luz, fuente de halógeno y laptop.

4.0.4. Procedimiento experimental

El día 0 (primer día de germinación), se tomó la firma espectral de forma aleatoria cada variedad de lechuga. Se utilizaron 29 canastas hidropónicas de forma cilíndrica, se realizó el seguimiento de pH y conductividad eléctrica del agua donde se encuentra la solución nutritiva comercial diseñada para lechugas. Se tomó una muestra de lechuga para realizarle estrés hídrico, tomándose ese espectro para posterior comparación.

Los datos obtenidos, fueron posteriormente usados para realizar las pertinentes gráficas de comportamiento espectral y colorimétrico, este procedimiento se repitió con las lechugas todos los días.

Con el objetivo de poner a prueba el programa de cálculo de coordenadas cromáticas a partir de la reflectancia espectral, se procedió a obtener las coordenadas de la clorofila como se explicó en el marco teórico.

4.0.5. Espectrómetro OceanOptic USB 4000

El espectrómetro Ocean Optics USB4000 es un espectrómetro de fibra óptica en miniatura de alto rendimiento y próxima generación diseñado a partir del modelo USB2000 para incluir un detector avanzado y una potente electrónica de alta velocidad. Las nuevas características consisten en el detector de 3648 elementos con obturador, electrónica

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

de alta velocidad y capacidades de interfaz para los sistemas operativos Linux, Macintosh y Windows. El USB4000 responde de 200 a 1100 nm, pero el rango y la resolución específicos dependen de sus selecciones de rejilla y ranura de entrada.

El espectrómetro USB4000 se conecta a una computadora a través del puerto USB o puerto serie. Cuando se conecta a través de un USB 2.0 ó 1.1, el espectrómetro obtiene energía de la computadora, eliminando la necesidad de una fuente de alimentación externa. El USB4000, como todos los dispositivos USB, puede controlarse con el software SpectraSuite, una plataforma de software de espectroscopia completamente modular basada en Java que funciona en los sistemas operativos Windows, Macintosh y Linux.

4.0.6. Componentes del espectrómetro OceanOptic USB 4000

En la figura 4.3 se observa el espectrómetro OceanOptic USB 4000 con las componentes que a continuación se presentan, cada componente tiene un número que corresponde a su ubicación en la figura 4.3:

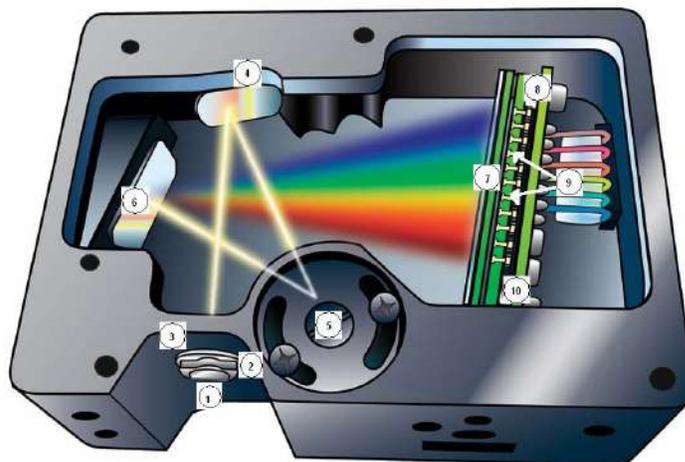


Figura 4.3: Componentes del espectrómetro OceanOptic USB 4000
Imagen Obtenida de [89]

1. Conector SMA 905: Asegura la fibra de entrada al espectrómetro. La luz de la fibra de entrada entra en el banco óptico a través de este conector.
2. Slit: Una pieza oscura de material que contiene una abertura rectangular, que se monta directamente detrás del conector SMA. El tamaño de la apertura (de 5 μm a 200 μm) regula la cantidad de luz que ingresa al banco óptico y controla

la resolución espectral. También puede usar el USB4000 sin ranura. En esta configuración, el diámetro de la fibra conectada al USB4000 determina el tamaño de la apertura de entrada.

3. Filtro: Restringe la radiación óptica a regiones de longitud de onda predeterminadas. La luz pasa a través del Filtro antes de entrar en el banco óptico. Tanto los filtros de paso de banda como los de paso largo están disponibles para restringir la radiación a ciertas regiones de longitud de onda.
4. Espejo colimador: Enfoca la luz que ingresa al banco óptico hacia la rejilla del espectrómetro. Especifique estándar o SAG+. La luz ingresa al espectrómetro, pasa a través del conector SMA, la rendija y el filtro, y luego se refleja en el espejo de colimación hacia la rejilla.
5. Rejilla: Difracta la luz del espejo de colimación y dirige la luz difractada hacia el espejo de enfoque. Las rejillas están disponibles en diferentes densidades de ranuras, lo que le permite especificar la cobertura de longitud de onda y la resolución en el espectrómetro.
6. Espejo de enfoque: Recibe la luz reflejada por la rejilla y enfoca los espectros de primer orden en el plano del detector.
7. Colección de detectores L4: Lente Un componente opcional que se conecta al detector para aumentar la eficiencia de recolección de luz. Enfoca la luz desde una rendija alta hacia los elementos más cortos del detector. La lente de colección del detector L4 se debe usar con ranuras de gran diámetro o en aplicaciones con bajos niveles de luz. También mejora la eficiencia al reducir los efectos de la luz parásita.
8. Detector (UV o VIS): Recoge la luz recibida del espejo de enfoque o de la lente de recogida del detector L4 y convierte la señal óptica en una señal digital. Cada píxel del detector responde a la longitud de onda de la luz que lo incide, creando una respuesta digital. El espectrómetro luego transmite la señal digital a la aplicación SpectraSuite.

4.0.7. Características del espectrómetro OceanOptic USB 4000

- Consumo de energía 250 mA @ 5 VDC
- Detector Conjunto CCD de silicio lineal de 3648 elementos

- Rango del detector 200-1100 nm
- Abertura de entrada: Ranuras de 5, 10, 25, 50, 100 o 200 μm de ancho
- Filtros de clasificación de pedidos Filtros de paso largo y paso de banda instalados
- Entrada de distancia focal de 42mm; Salida de 68mm
- Resolución óptica Depende de la rejilla y el tamaño de la apertura de entrada
- Luz parásita 0,05 % a 600 nm; 0,10 % a 435 nm
- Conector de fibra óptica SMA 905 a fibra óptica mono-filamento (0,22 NA)
- Tasa de transferencia de datos Exploraciones completas en la memoria cada 4 milisegundos con puerto USB 2.0.
- Tiempo de integración De 10 microsegundos a 60 segundos (el límite del detector es de \approx 15 segundos).

4.0.8. Software SPECTRASUITE

Luego de establecer la muestra (Hojas de las lechugas Italianas y Orejonas) con el arreglo experimental, se utiliza este software comercial para adquirir los espectros de Reflectancia Difusa y parámetros de las coordenadas ($L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$) de las lechugas en estudio. Entre las características de dicho software está el rango espectral, el cual se trabajó de 400-1000 nm. y se utilizó el paquete de software SpectraSuite (figura 4.4), el mismo presenta una barra de herramientas en la que es posible variar parámetros como: tiempo de integración, exploraciones.

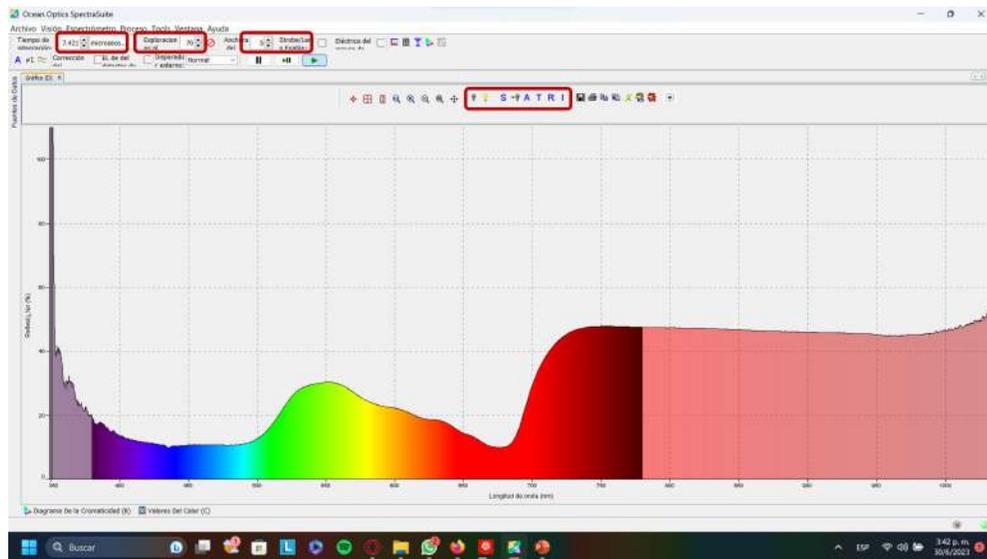


Figura 4.4: Pantalla del Software SpectraSuite, mostrando un espectro de Reflectancia Difusa.

Parámetros del software SpectraSuite

En la figura 4.4 se pueden observar los parámetros encerrado en rectángulos de color rojo los cuales son:

- Tiempo de integración: se refiere al tiempo en el cual el CCD recoge los fotones, se puede considerar como un tiempo de detección.
- Exploraciones promedio: permite promediar los espectros.
- Boxcar: permite reducir el ruido y suavizar el espectro.
- Control y adquisición de espectros se da clic a ambos iconos que tienen la bombilla oscura, este paso lo que hace es almacenar el espectro oscuro de la muestra y luego deja la señal aproximadamente en cero, luego se abre el obturador de la punta de prueba y se empieza el proceso de medición.

4.0.9. Obtención de los Espectros de Reflectancia Difusa de lechugas Italianas y Orejonas.

Para lograr una buena adquisición de espectros de reflectancia difusa, Primero se realizó la calibración del equipo con el espectralon para el color blanco como se observa en la figura 4.6, y para el color negro se obstaculizaba la fuente de luz que una referencia de color negro, previamente se realizó la elección de la separación óptima entre la muestra y la fibra recolectora del espectrómetro de la siguiente manera, se

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

tomó el colorchecker y se midió el % de reflectancia para cada color y a diferentes separaciones desde 1 mm hasta 10 mm, donde la figura 4.5 muestra un ejemplo de la configuración experimental, se propuso que la separación entre la punta de la fibra recolectora y la muestra fuese fijada en 10 mm de forma tal que se trabajase en un rango de [15 a 60] % de reflectancia, en paralelo vía comunicación privada con la empresa fabricante del espectrómetro, aconseja un rango de trabajo de separación muestra-fibra entre 4 y 8 mm.

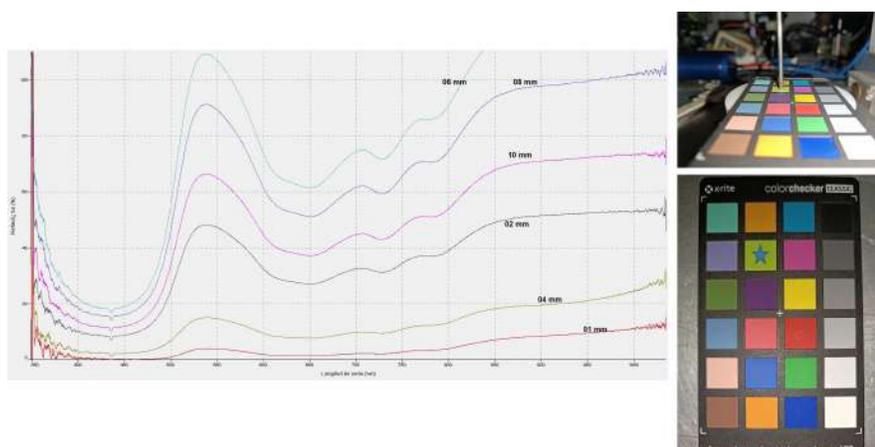


Figura 4.5: Elección de la separación óptima entre la muestra y la fibra recolectora del espectrómetro



Figura 4.6: Estándar de reflectancia difusa

Posteriormente el lugar donde se coloca el espectrómetro debe estar lo más oscuro posible, para que solo interactúe la luz blanca con la muestra (Clorofila, hoja de lechuga), debido a que, la luz al entrar a la muestra se esparce en todas las direcciones, en este fenómeno la luz que es reflejada transporta información de los posibles cromóforos presentes en la muestra bajo estudio, esta luz reflejada especular o de forma difusa pasa por una rejilla de difracción la cual divide la luz en diferentes longitudes de onda que son detectadas por un CCD siendo posible obtener la firma

espectral de reflectancia de la muestra en estudio. Para el proceso de medición de los espectros de la Clorofila y de las hojas directas de la lechuga se consideraron los siguientes equipos y parámetros experimentales:

- Temperatura ambiente promedio 25°C enfriado con nitrógeno líquido y humedad promedio 43 %
- Distancia punta de fibra a la muestra 10 mm.
- Rango de acotado del ruido al iniciar las mediciones 350 nm a 900 nm.
- Unidades de los ejes para las gráficas: eje vertical que representa las intensidades en unidades arbitrarias % Reflectancia y en el eje de las abscisas se representan las longitudes de onda en unidades nm
- Se tomaron 10 espectros para cada muestra de clorofila, hojas de lechuga en diferentes puntos; en cada caso se adquirió una media del espectro, para un rango espectral de 350 - 900 nm.

4.1. Arreglo Experimental Espectroscopia Raman

En esta sesión describiré el espectrómetro y sus partes, láser, puntas de prueba Raman, parámetros experimentales para la obtención de los espectros.

4.1.1. Espectrómetro QE65000

El espectrómetro utilizado fue el espectrómetro QE65000 de Ocean Optics® el cual, incluye un arreglo lineal CCD conectado con todos los circuitos necesarios para la operación, usa un detector enfriado TE (TEC), 1044x64 elementos CCD de Hamamatsu, opera a través de USB (sin funcionamiento del TEC), o de una fuente de alimentación +5 VDC, es controlado por un microcontrolador, por lo tanto, todos los parámetros operativos se ejecutan a través del software de interfaz a la unidad, la resolución óptica es de aproximadamente 0.14 a 7.7 nm FWHM (6 cm⁻¹), sus dimensiones 182mm x 110 mm x 47 mm y su peso 1.18 kg.

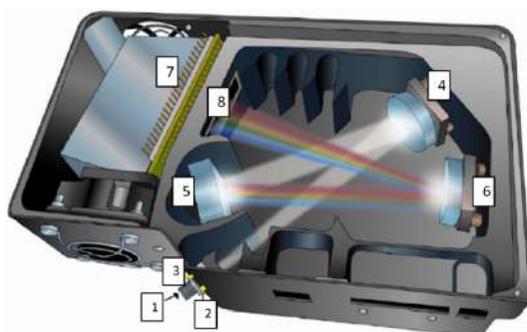


Figura 4.7: Componentes del espectrómetro
Imagen obtenida de [89]

4.1.2. Componentes del espectrómetro QE65000

En la figura 4.7 se observa el espectrómetro con las componentes que a continuación se presentan, cada componente tiene un número que corresponde a su ubicación en la figura 4.7:

1. Conector universal estandarizado (SMA): Asegura la entrada de fibra en el espectrómetro. La luz entra a la fibra de entrada y esta lo conduce al banco óptico desde el conector.
2. Rendija (slit): pieza de material oscuro que contiene una abertura rectangular, la cual va montada directamente detrás del conector SMA. El tamaño de la abertura regula la cantidad de luz que entra al banco óptico y controla la resolución espectral.
3. Filtro: restringe las radiaciones ópticas de comprobar la validez de las regiones de longitud de onda determinada. La luz pasa a través del filtro antes de entrar en el banco óptico. Ambos filtros pasa altas y pasa banda están disponibles para limitar la radiación a determinadas regiones de longitud de onda.
4. Espejo colimador: la luz entra en el espectrómetro, pasa a través del conector SMA, la rendija, y filtro, entonces se refleja en el espejo colimador y se convierte en un haz de luz paralelo, para posteriormente incidir en la rejilla de difracción.
5. Rejilla de difracción: descompone la luz proveniente del espejo colimador en sus distintas longitudes de onda. Las rejillas están disponibles en diferentes densidades de líneas, lo que le permite especificar la longitud de onda de cobertura y resolución en el espectrómetro.

6. Espejo de enfoque: recibe la luz reflejada desde la rejilla y enfoca la luz en el detector CCD.
7. Arreglo lineal del CCD: capta la luz proveniente del espejo de enfoque. Cada pixel del arreglo responde a una zona del espectro y crea una respuesta digital, los datos digitales son enviados a la computadora para ser visualizados. Este arreglo cuenta con un enfriador TE que mantiene la temperatura del detector.
8. Detector con filtro OFLV: Elimina los efectos de segundo orden y se utiliza con una rejilla de HC-1 en un sistema de 200-950 nm de longitud de onda en un QE65000.

4.1.3. Características del espectrómetro QE6500

- El rango espectral de 780 a 1000 nm
- La resolución óptica de 0.14 a 7.7 nm y FWHM ($\approx 6 \text{ cm}^{-1}$).
- Tiempo de integración de 8 ms a 15 min.
- Punta de prueba Raman RIP-RPB: El diseño más simple de una sonda de fibra óptica Raman consta de dos fibras montadas juntas. En esta configuración, una fibra se adjunta a la fuente de excitación láser y se ilumina la zona de muestreo. La otra fibra recoge la luz difusa y transmite la energía al espectrómetro. La luz colectada puede ser amplificada por medio de más fibras de colección o mejorar la superposición entre la excitación y la recaudación mediante la adición de fibras óptica de enfocamiento.

4.1.4. Obtención de los Espectros Raman.

Para lograr una buena adquisición de espectros Raman, el lugar donde se coloca el espectrómetro debe estar lo más oscuro posibles, para que solo interactúe el láser con la muestra (Clorofila, hoja de lechuga), debido a que, la luz al entrar a la muestra se esparce en todas las direcciones, en este fenómeno la luz que es reemitida transporta información de los modos vibracionales de la muestra, por ser de interés de estudio el esparcimiento Raman es necesario el empleo de un filtro Notch el cual dejará pasar solo la luz esparcida (Raman) la misma pasa por una rejilla de difracción la cual divide la luz en diferentes longitudes de onda que son detectadas por un CCD siendo posible obtener la firma espectral de la muestra en estudio. Para el proceso de detección de bandas Raman de la Clorofila y azúcares en las lechugas italianas y orejonas, se consideraron los siguientes equipos y parámetros experimentales:

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

- Temperatura ambiente promedio 4°C enfriado con nitrógeno líquido y humedad promedio 43 %
- Contenedor de aluminio 6065.
- Distancia láser a la muestra 7 mm aproximadamente.
- Rango de acotado del ruido al iniciar las mediciones -5 a 5.
- Unidades de los ejes para las gráficas: eje vertical que representa las intensidades en unidades arbitrarias [U.A] y en el eje de las abscisas se representan los desplazamientos Raman en unidades [cm^{-1}]
- Se midieron 20 espectros para cada muestra de clorofila y de las hojas de lechuga y en cada caso se adquirió una media del espectro, para un rango espectral de 200-1800 cm^{-1} .

RESULTADOS

Este capítulo describirá los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas de análisis, incluyendo la espectroscopia de reflectancia difusa, la absorbancia relativa, la espectroscopia Raman, la colorimetría y la cromatografía de partición. Se presentarán los datos y las interpretaciones correspondientes a cada técnica.

Este capítulo es fundamental para presentar y analizar los resultados obtenidos a través de diversas técnicas de análisis. La descripción detallada de los resultados proporciona evidencia y respaldo a las conclusiones y afirmaciones realizadas en la tesis. Además, al utilizar diferentes técnicas, se amplía la comprensión y la evaluación del objeto de estudio, lo que fortalece la validez y la profundidad de la investigación. Los resultados presentados en este capítulo contribuyen al cumplimiento de los objetivos y la confirmación de la hipótesis de la tesis.

A continuación se muestra los resultados por técnicas y métodos realizados en las lechugas.

1. Resultados obtenidos de Hidroponía.
2. Resultados obtenidos usando Espectroscopia de Reflectancia Difusa.
3. Resultados obtenidos usando Colorimetría.
4. Resultados obtenidos usando Absorbancia relativa.
5. Resultados usando Espectroscopia Raman.
6. Resultados obtenidos cromatografía de partición.

5.0.1. Resultados obtenidos de Hidroponía.



Figura 5.1: a) Autor en proceso de monitoreo , Instalación de invernadero y construcción de sistema NFT, b) Imágenes representativas de los momentos de la obtención de las firmas espectrales diarias en sus periodos de crecimientos.

La figura 5.1, muestra de forma breve, los procesos donde se realizó la construcción del sistema hidrópico NFT, la instalación del invernadero pequeño, también se observa las lechugas en su etapa de plántulas como también maduras, adicionalmente se muestra las medidas realizadas día a día de las lechugas para obtener su firma espectral.

5.0.2. Resultados obtenidos usando Espectroscopia de Reflectancia Difusa.

Estableciendo patrones

La figura 5.2 muestra la reflectancia difusa para 4 etapas de la lechuga, se tomó como ejemplo el caso de la lechuga italiana, dichas etapas fueron: la lechuga en estado de plántula, bajo estrés hídrico (el cual fue realizado retirando el agua por 3 días), etapa madura (lista para cosechar) y la lechuga seca.

En el rango del infrarrojo cercano (700–1000 nm), las reflectancias promedio de las lechugas están por encima del 40 % de reflectancia, probablemente debido a su estructura celular interna [92]. Nótese que en la región del visible [400 a 700 nm] tanto las reflectancias promedios de las lechugas plántula, madura y con estrés hídrico se encuentran aproximadamente al 15 %, siendo el rango del visible donde se presentan las intensidades de clorofilas, carotenoides y por lo tanto se infiere que a mayor % de reflectancia mayor concentración de pigmentos fotosintéticos. En general, la reflectancia promedio de las lechugas fueron inferiores al 35 % entre 500 y 675 nm, región con mayor absorción de radiación electromagnética por parte de los pigmentos vegetales [93], encontrándose un pico en aproximadamente 550 nm (región verde).

Para el caso de la hoja seca, se observa que el % de reflectancia esta por debajo del 10 % en el rango espectral [450 a 700 nm] y por último se observa un punto de inflexión aproximadamente a 700 nm en aproximadamente con 15 % de reflectancia no manteniéndose la morfología de la curva como las demás hojas sanas.

Para la plántula se observa en la región del infrarrojo cercano, zona o región que indica la presencia o ausencia de agua y estructura interna de la planta, el % de reflectancia esta por encima de 45 % de reflectancia. Mientras que para la lechuga madura el % de reflectancia se encuentra por encima del 40 %.

Para la lechuga madura, se observa que el % de reflectancia se encuentra por encima del 40 %, en el rango espectral [700 a 1000 nm].

Para la planta bajo estrés hídrico (Poca o ausencia de agua), se muestra un % de reflectancia de aproximadamente 35 % de reflectancia en el rango espectral [700 a 1000 nm]. Esta gráfica es de gran valor, pues proporciona información que permite establecer rangos de salud de la lechuga.

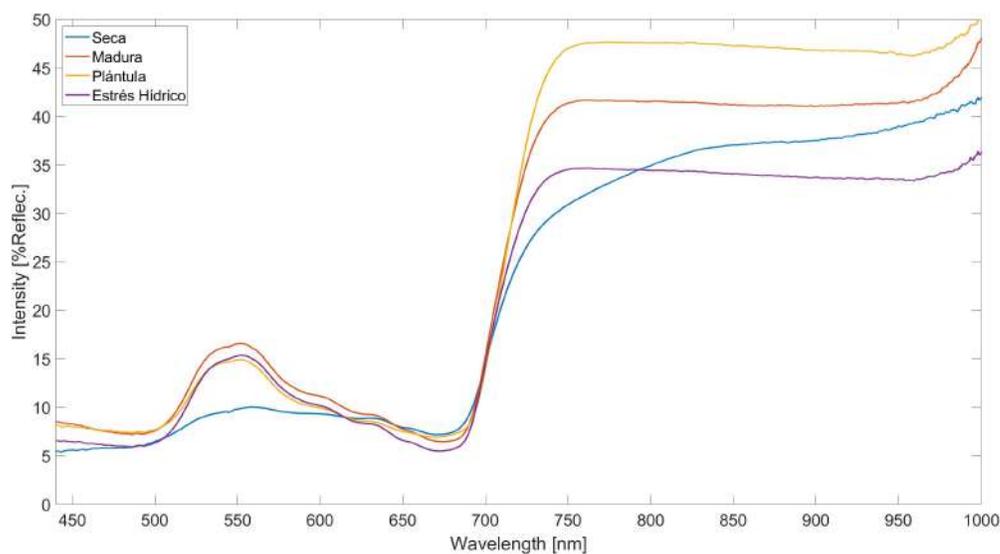


Figura 5.2: Espectro reflectancia difusa para lechuga seca, madura y bajo estrés hídrico.

Es importante destacar en la figura 5.2 la reflectancia en visible e infrarrojo cercano de las hojas en etapa de plántulas, maduras y estrés hídrico, donde se observa una forma de Abrevadero a 950–970 nm, correspondiente a la absorción de agua [63]. En el caso de la hoja seca, no se observa la forma de abrevadero y la morfología de este tramo de la curva no es plana, dicha característica se traduce a la aparición de pigmentos marrones, debido al daño estructural y ausencia de agua. Este resultado obtenido en esta investigación también se obtiene en diferentes estudios de estatus fisiológicos de plantas [63].

Reflectancia Difusa Lechuga Italiana y Orejona por 01 día.

La figura 5.3a y 5.3e muestra la firma espectral sin procesar de una lechuga italiana y orejona, obtenida a partir de 5 tomas de reflectancia difusa en un solo día respectivamente. En esta figura y las que se presentan a partir de este momento, se omite la reflectancia de la zona de la vena principal, ya que en esa parte no se presenta actividad de fotosíntesis. Por otro lado, la figura 5.3b y 5.3f muestra el espectro promedio de los espectros sin procesar obtenida a partir de 5 tomas de reflectancia difusa en un solo día. Esta representación permite visualizar los picos de reflectancia, siendo el más conocido en la longitud de onda de aproximadamente 550 nm, el cual es característico de la clorofila [94][95].

Después de promediar los espectros, se realizó un suavizado utilizando el método de Savitzky-Golay y se aplicó la técnica de corrección multiplicative scatter correction

(MSC) a la data de reflectancia difusa cruda (ver Fig. 5.3a y ver Fig. 5.3e), obteniéndose (ver Fig. 5.3c y 5.3g). Aunque los espectros de reflectancia difusa de lechugas obtenidos no presentan mucho ruido, igualmente se aplicó esta técnica de corrección como medida de seguir esta técnica utilizada [62] y asegurar la precisión de los datos de reflectancia difusa.

Asimismo, se utilizó la transformación logarítmica ($1/R$) para convertirlos en absorbancia aparente (Fig. 5.3d y 5.3h), ya que normaliza los espectros de reflectancia sin procesar (Fig. 5.3a, lo que es útil para comparar y analizar datos de diferentes muestras, eliminando efectos de la geometría de medición, la intensidad de la fuente de luz y otras variaciones experimentales. [96] [62]

En la región del espectro visible, que abarca desde los 400 nm hasta los 700 nm, la absorción de luz por parte de los pigmentos presentes en la lechuga es la responsable de los patrones observados en los espectros de reflectancia (Fig. 5.3d y 5.3h). El color característico de la lechuga es el resultado de la combinación de varios pigmentos, siendo las clorofilas verdes y los carotenoides los más prominentes. Sin embargo, debido a que las clorofilas verdes oscurecen los colores brillantes de los carotenoides, solo se pueden apreciar las clorofilas en los espectros [97] [98].

Estos espectros (Fig. 5.3d y 5.3h) presentan una tendencia decreciente en general, con la presencia de algunos picos superpuestos que son atribuidos a la absorción de los pigmentos de clorofila. Para la fotosíntesis, los pigmentos de clorofila a absorben longitudes de onda azules (400-500 nm), mientras que los pigmentos de clorofila b absorben longitudes de onda rojas (600-700 nm). La absorción se reduce en las longitudes de onda verdes (500-600 nm), lo que da como resultado una disminución distintiva de la absorción y la apariencia verde de las lechugas. En el rango de 700 a 900 nm, hubo poca absorción debido a que los pigmentos de las hojas y la celulosa son transparentes a las longitudes de onda del infrarrojo cercano (Fig. 5.3d y 5.3h) [99]. Estas características espectrales observadas se mantienen consistentes en todas las muestras y coinciden con estudios previos realizados por Gupta et al. [94].

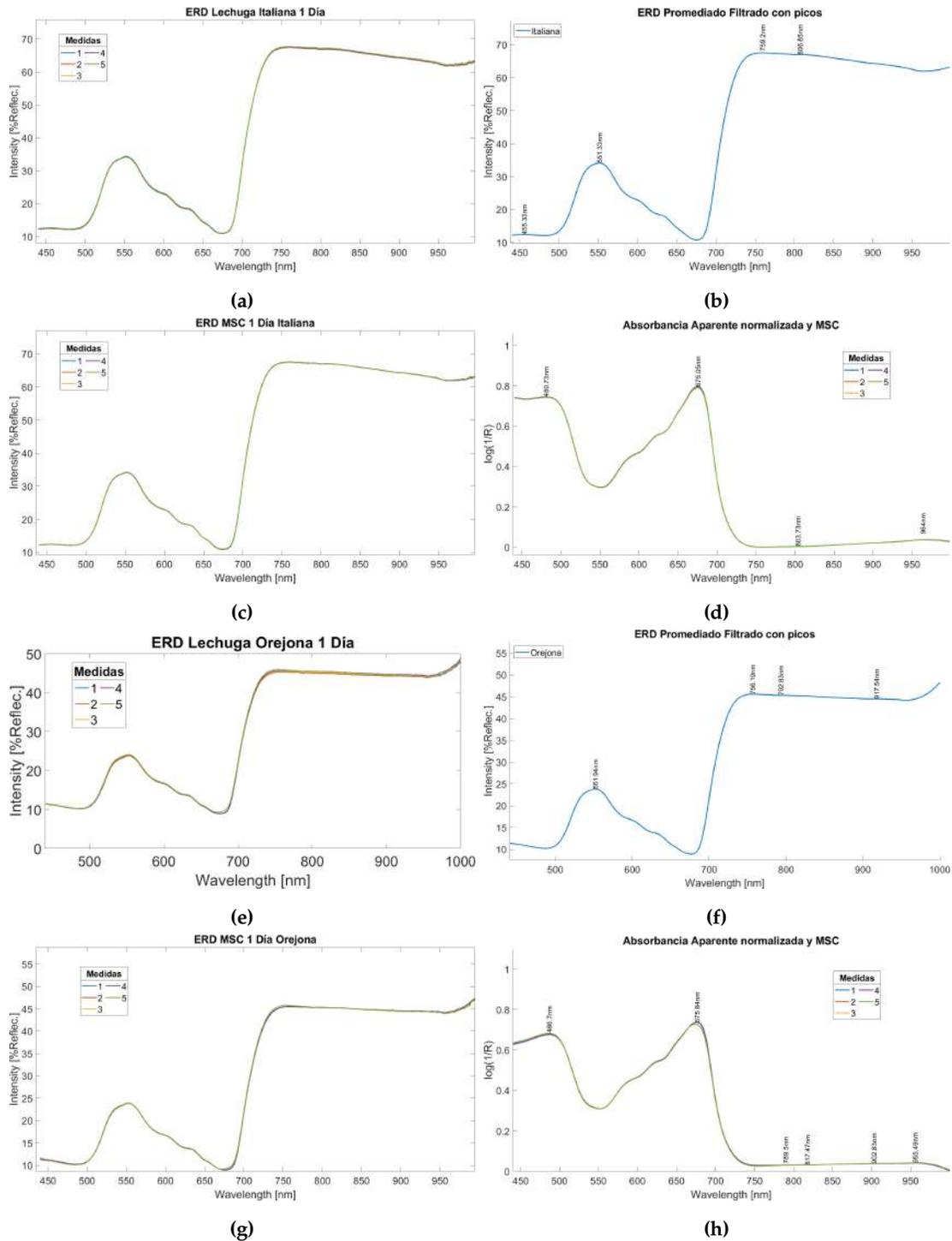


Figura 5.3: Espectros de reflexión difusa de la lechuga *Italiana* y *Orejona*: a) y e) Espectros ERD sin procesar, b) y f) Espectros ERD promedio con picos y filtrado, c) y g) Espectro corregido y filtrado, d) y h) Espectros suavizados por Savitzky-Golay y tratados con MSC después de la conversión a absorbancia aparente usando $\log(1/R)$.

Reflectancia Difusa por mes para Lechuga Italiana y Orejona.

Ahora se muestran los espectros de reflectancia difusa de las lechugas por cada mes, donde cada curva representa la curva promedio (corregida con MSC) tomada en un día.

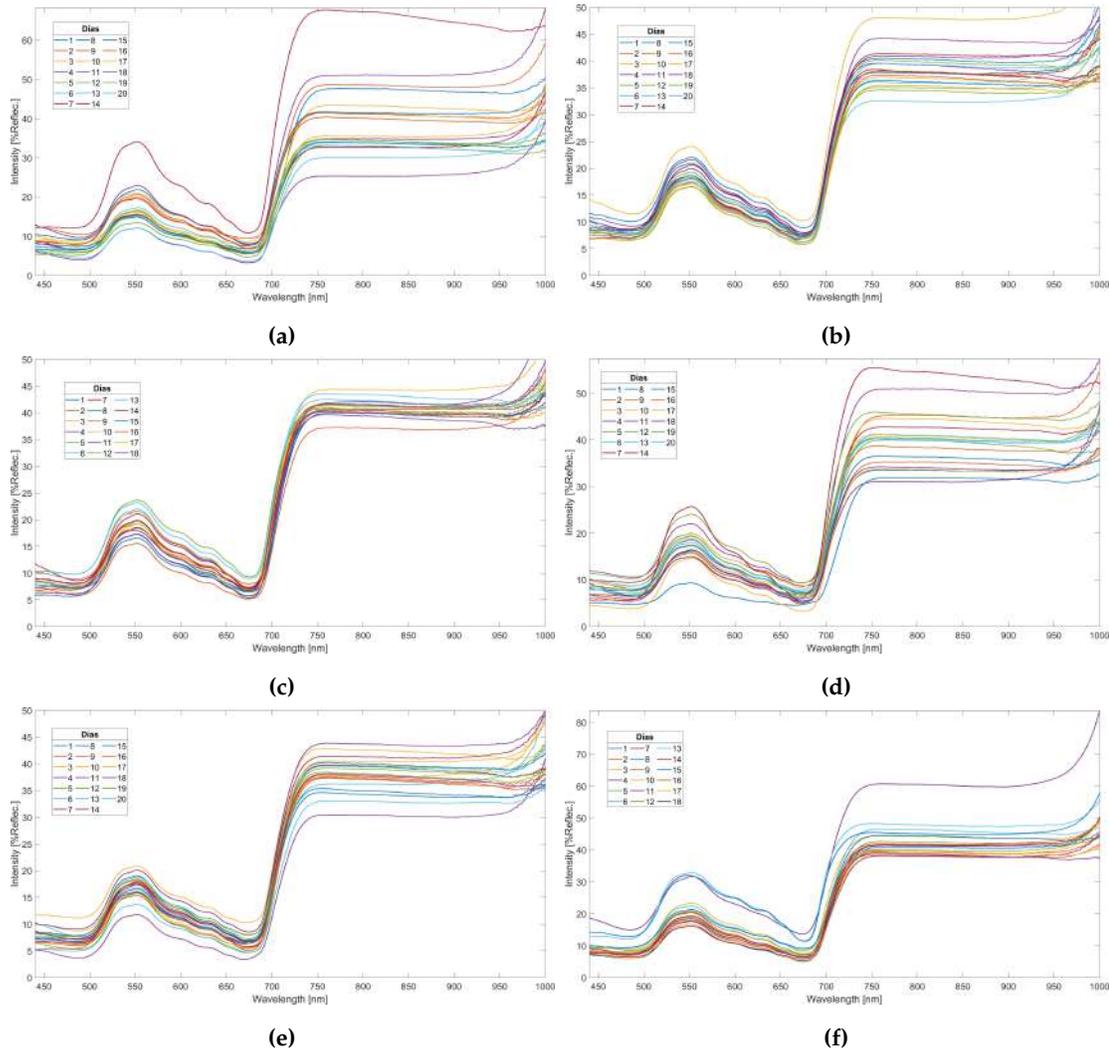


Figura 5.4: Espectros de reflexión difusa de la lechuga *Italiana*: a) Enero, b) Febrero y c) Marzo, Espectros de reflexión difusa de la lechuga *Orejona*: d) Enero, e) Febrero y f) Marzo

La Figura 5.4 presenta las firmas espectrales por mes de las dos variantes de lechugas estudiadas bajo el sistema de cultivo NFT. Se encontró que las reflectancias de las lechugas exhibieron patrones similares, concordando con los obtenidos por otros autores [100][101][61][62][63][11]. Estas firmas espectrales muestran pequeñas variaciones en % de reflectancia, probablemente se debieron a los diferentes tipos de cobertura

del sistema de cultivo, lo que resultó en diferentes intensidades de radiación durante el cultivo y afectó la síntesis del pigmento de la lechuga. Este mismo fenómeno ha sido verificado por otros autores, donde han relacionado la radiación con el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, influyendo en el color de los cultivares de lechuga roja [102]. Cabe destacar que lo explicado para la figura 5.2 y 5.3 también aplica a la gráfica 5.4, salvo que en este caso, cada curva es una firma espectral promedio diaria a lo largo del ciclo de crecimiento de las lechugas en este cultivo.

Reflectancia espectral y primera derivada de la reflectancia para hojas sanas

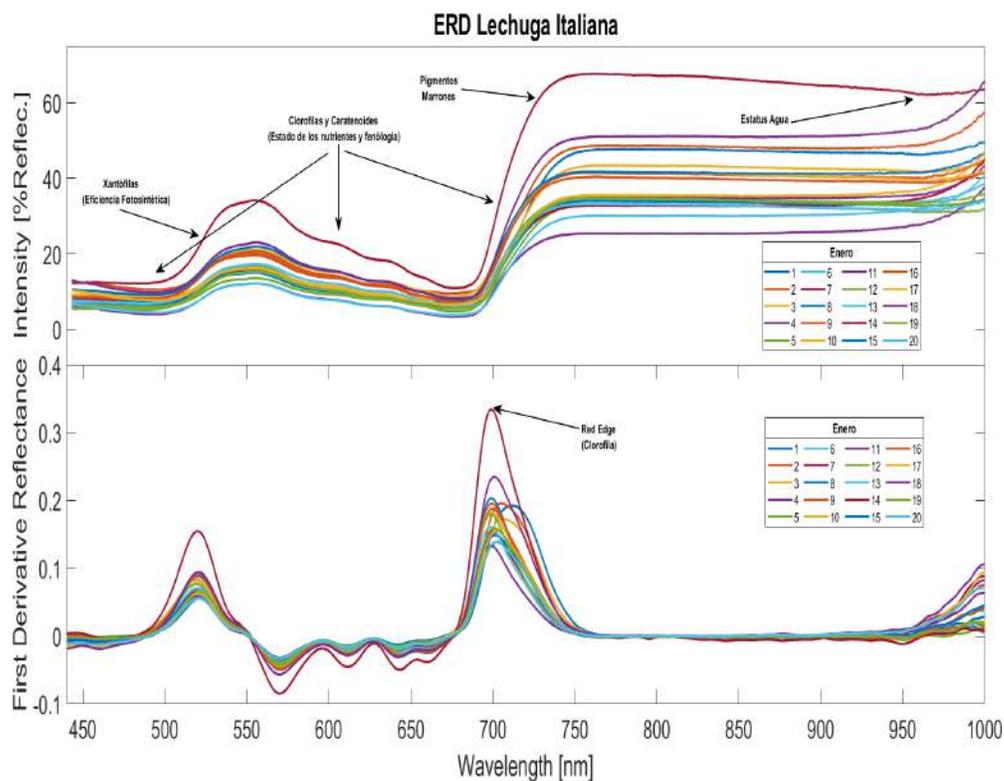


Figura 5.5: Reflectancia espectral (Superior) y primera derivada de la reflectancia (Inferior) para hojas sanas. Se indican las principales longitudes de onda utilizadas en los índices de reflectancia fisiológica: 430 y 445 nm para carotenoides; 531 y 570 nm para xantófilas; 550-680 nm y posición de Red Edge para la clorofila; 700-800 nm para pigmentos marrones; 800 y 900 nm como longitudes de onda de referencia estructural; 970 nm para agua.

La figura 5.5 muestra la reflectancia difusa y la primera deriva de la reflectancia espectral de ambas variedades de lechuga, para determinar el índice de vegetación (Red-Edge) y el estatus del agua (5.5 Inferior), la figura (5.5 Superior), establece los ran-

gos de reflectancias de los pigmentos fotosintéticos. En el espectro visible (400–700 nm), la reflectancia de la hoja es baja debido a la absorción por parte de los pigmentos fotosintéticos (principalmente clorofilas y carotenoides) (Fig. 5.5 Superior). En el dominio del infrarrojo cercano (700–1300 nm), donde no hay fuertes características de absorción (Fig. 5.5 Superior), la magnitud de la reflectancia se rige por las discontinuidades estructurales que se encuentran en la hoja y el contenido de agua.

La primera derivada de la reflectancia difusa determina cómo cambia la reflectancia en función de las diferentes longitudes de onda. Esta derivada proporciona información adicional sobre la composición y las propiedades físicas de las plantas. Algunas aplicaciones importantes de este cálculo son las siguientes: Identificación de pigmentos, metabolitos (Red Edge) y estrés hídrico, manifestándose en cambios en la derivada de reflectancia en longitudes de onda entre 950 y 1200 nm [63][103].

A continuación la figura 5.6 muestra un proceso de estrés hídrico detectado por la 1ra derivada de la reflectancia difusa durante 03 días del mes de enero para la lechuga italiana. Nótese que para el día 27 de enero ver 5.6a) (día en que comienza el retiro del agua) la primera derivada de la reflectancia era de 0.10737 %, el día 30 de enero ver 5.6b) (cuando se recupera el riego o hidratación), la intensidad estaba en 0.0259038 % de primera derivada de la reflectancia, ya para el día 31 de enero 5.6c), el % de la primera derivada de la reflectancia había subido a 0.0756848 %.

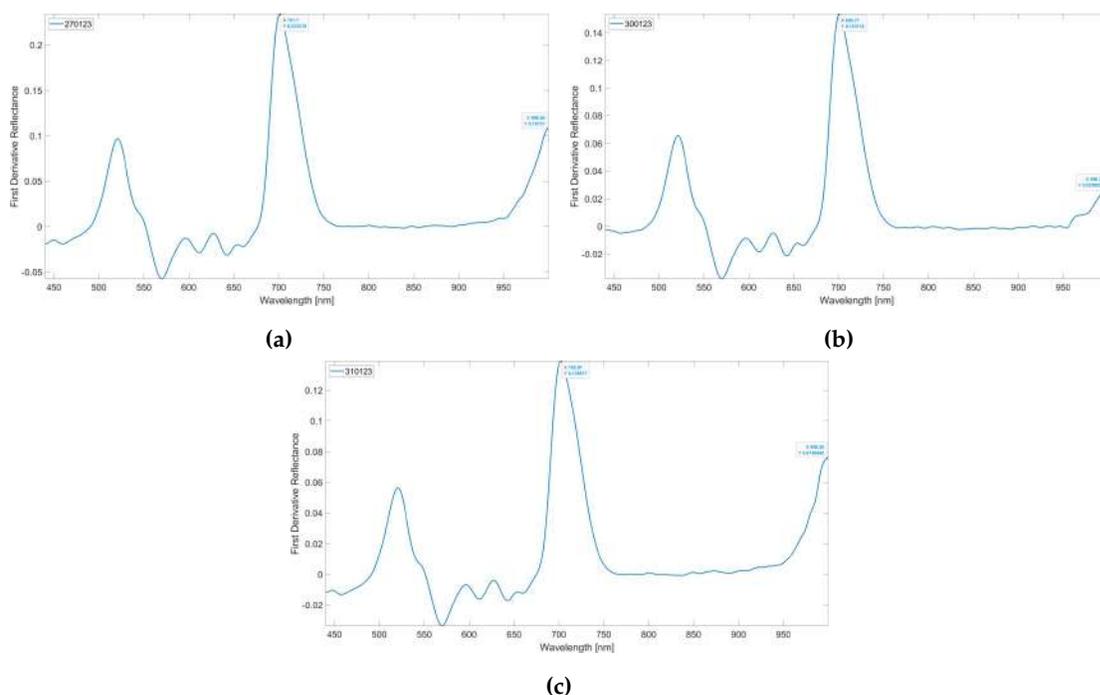


Figura 5.6: 1ra derivada de la reflectancia difusa de la lechuga *Italiana*: a) 27 de Enero, b) 30 de Enero y c) 31 de Enero.

Para obtener la primera derivada de la reflectancia difusa de las lechugas como se muestra en la figura 5.5 y 5.6, se procedió con la sección del código mostrado en el apéndice 6.2, en este caso se utilizó el comando `deriv()` [104] del software comercial MATLAB[®] 2023a para realizar la primera derivada.

En la figura 5.6 se observan los picos de estrés hídrico entre (950 y 1200 nm), para el los días 27, 30 y 31 de enero respectivamente, durante esos días se sometieron las plantas al estrés hídrico, se observa de forma notable, el cambio en disminución de la curva de la primera derivada el día 30 de enero en relación al día anterior cuando se sometió a estrés hídrico, observándose su recuperación hídrica a partir del día 31 de enero. Comportamiento espectral de estrés hídrico, validado por varios autores [63][61].

5.0.3. Resultados obtenidos usando Colorimetría.

Partiendo de la hipótesis que ya han establecido y validado muchos autores, dicha hipótesis es que la composición del pigmento fotosintético se puede utilizar como indicador del estado fisiológico de una planta. Sin embargo, con la ayuda de la reflectancia podría proporcionar un medio alternativo rápido y fácil de evaluar la composición del

pigmento para determinar el estado de los nutrientes (mediante la evaluación de la clorofila); fenología y estrés general (por valoración de carotenoides y clorofila a); o eficiencia fotosintética (por evaluación de xantófilas).

Según algunos autores[105], la concentración de clorofila se puede determinar usando los valores de reflectancia a 675 nm y a 550 nm. Para concentraciones muy bajas, la sensibilidad de reflectancia es mayor en la absorción máxima situada alrededor de 675 nm y, para concentraciones de clorofila medias a altas, la sensibilidad de reflectancia es mayor en 550 nm [105]. Adicionalmente se ha descubierto que el 'RED EDGE', la longitud de onda de máxima pendiente en el aumento de la reflectancia del rojo al infrarrojo cercano (Fig. 5.5 Inferior), es un buen indicador del contenido de clorofila a nivel de la hoja.

Después de obtener las reflectancias espectrales, se determinaron los colores instrumentales de las lechugas, en términos de los valores del espacio de color CIELAB (L^* , a^* y b^*), mediante el espectrómetro USB4000.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, de las coordenadas (L^* , a^* y b^*), Hue, Luminosidad, parámetro a^* y b^* , Croma con sus respectivas líneas de tendencias en función de los días, para las lechugas Italianas y Orejonas.

En las siguientes gráficas se utilizó el comando `trenddecomp()` en MATLAB®, que se basa en el algoritmo singular spectrum analysis (SSA), el cual es un método de estimación espectral no paramétrico, que asume una descomposición aditiva de los datos tal que $A = LT + ST + R$. En esta descomposición, LT es la tendencia a largo plazo de los datos, ST es la tendencia (o tendencias) estacional u oscilatoria y R es el resto. LT es un vector con la misma longitud que A, siendo A la señal de entrada o el espectro completo que va analizar. Dicho comando hace dos cosas:

1. Encuentra la tendencia: Intenta descubrir si los números están aumentando o disminuyendo de manera general a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si la temperatura está subiendo o bajando en promedio. Esto se llama tendencia. El comando `trenddecomp()` encuentra esa tendencia y la muestra por separado.
2. Encuentra la estacionalidad: A veces, hay patrones que se repiten a lo largo del tiempo. Por ejemplo, puede haber un patrón estacional si cada año la temperatura sube en verano y baja en invierno. El comando `trenddecomp()` trata de encontrar esos patrones repetitivos y los muestra por separado.

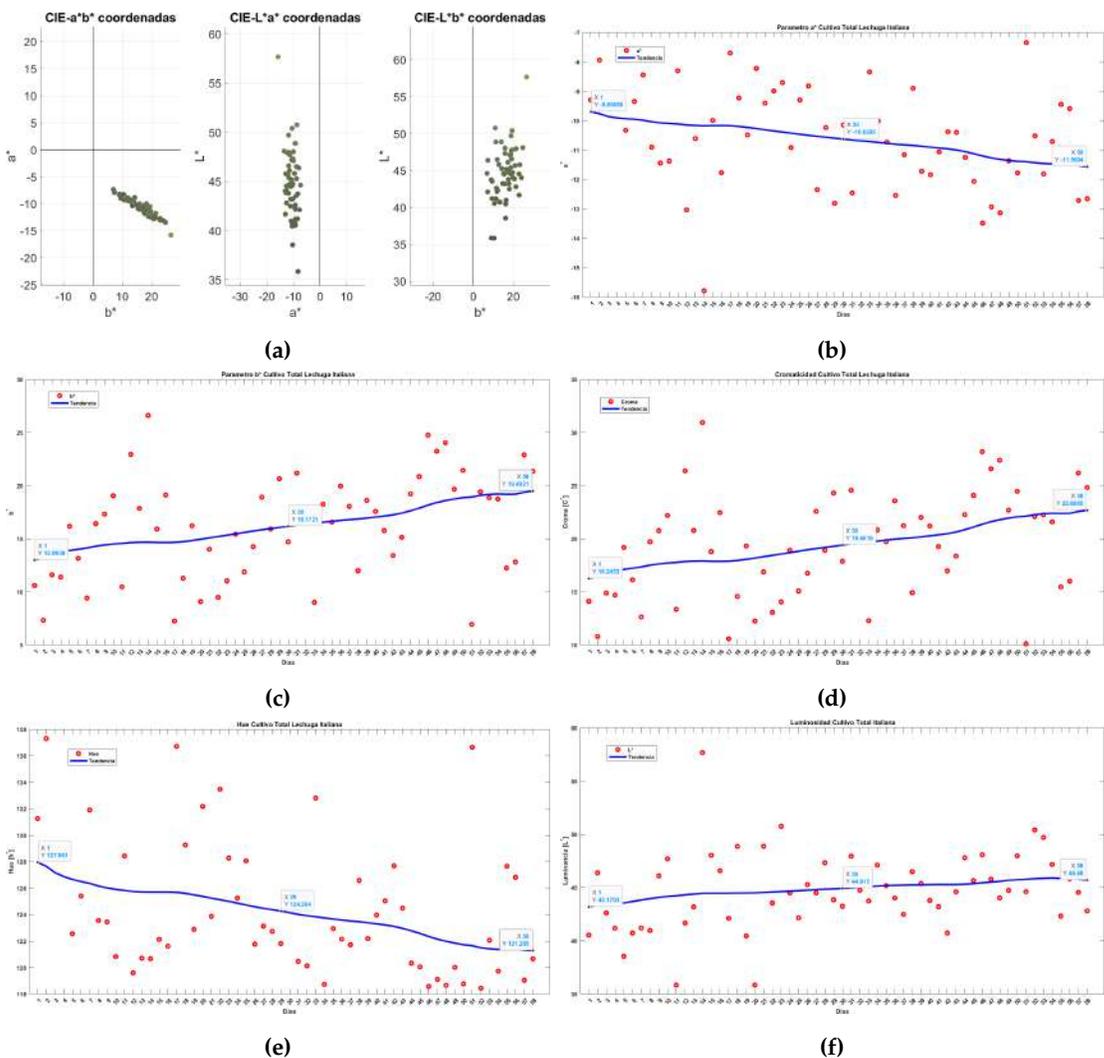


Figura 5.7: a) Coordenadas (L^* , a^* y b^*) 2D, b) Parámetro a^* , c) Parámetro b^* , d) Cromo (Saturación), e) Hue (Color) y f) Luminosidad, Mes Enero a Marzo para las lechugas Italianas.

En la figura 5.7, se muestra la evolución de los parámetros de las coordenadas ($L^*a^*b^*$) de las lechugas Italianas durante el tiempo total de cultivo, presentaron un color verde con tendencia al amarillo según sus parámetros a^* y b^* , ya que uno era negativo y el otro era positivo respectivamente, las gráficas 5.7 b) y c) demuestran que las hojas estuvieron variando las tendencias tanto en el verde como en el amarillo a lo largo de los 58 días, dicha tendencia verde-amarillo, también lo confirma la gráfica 5.7 e) en el cual podemos observar que la variación del Hue (color) se mantuvo en el segundo cuadrante, entre los ángulos 90 y 180, adicionalmente las gráficas en las Fig.5.7 d) y f) muestran variación o cambios en la cromaticidad de la hoja y la luminosidad, comenzando con baja

cromaticidad [16.2453] y finalizando con alta cromaticidad [22.6885], su luminosidad al menos en tendencia se mantuvo aproximadamente constante, es decir, nacen verdes opacas no tan luminosas, pasando por varios verdes con cierta tendencia al amarillo, y para finales del cultivo se observan con hojas verdes con mayor tendencia al amarillo, siendo un poco mas luminosas de forma aproximada en comparación con las lechugas Orejona.

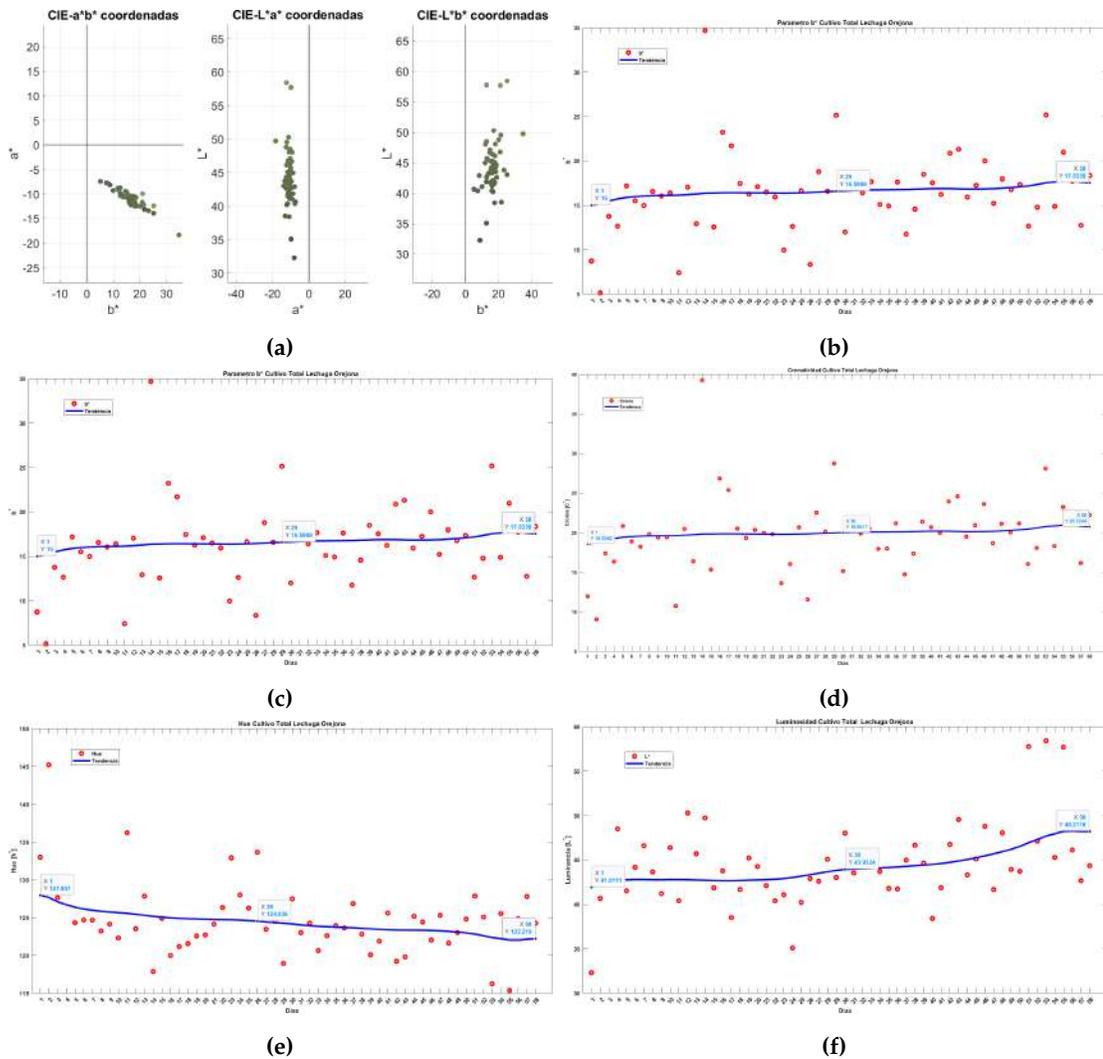


Figura 5.8: a) Coordenadas (L^* , a^* y b^*) 2D, b) Parámetro a^* , c) Parámetro b^* , d) Cromo (Saturación), e) Hue (Color) y f) Luminosidad, Mes Enero a Marzo para las lechugas Orejona.

Las variaciones en los parámetros durante el tiempo se debe a los diferentes tipos de cobertura que afectaron la síntesis de antocianinas de la lechuga ya que este pigmento

es producido por el metabolismo secundario de las plantas, y su concentración puede verse influenciada por varios factores, entre ellos la radiación ultravioleta [106] y la intensidad de la luz [107]. Además, las plantas de lechuga presentan una mayor concentración de flavonoides, de los cuales forman parte las antocianinas, cuando se cultivan bajo invernadero debido a la distinta intensidad de radiación solar que llega a las plantas [108] [109]. Esto ocurre teniendo en cuenta que los flavonoides y los ácidos fenólicos se sintetizan a través del fenilpropanoide, donde la enzima fenilalanina amoniaco liasa es dependiente de la luz [110].

Entonces, según lo mencionado, la figura 5.8, nos muestra la evolución de los parámetros de las coordenadas ($L^*a^*b^*$) de las lechugas Italianas durante el tiempo total de cultivo, presentaron un color verde con tendencia al amarillo según sus parámetros a^* y b^* , ya que uno era negativo y el otro era positivo respectivamente, las gráficas 5.8 b) y c) demuestran que las hojas estuvieron variando las tendencias tanto en el verde como en el amarillo en las mismas proporciones aproximadamente a lo largo de los 58 días, dicha tendencia verde-amarillo, también lo confirma la gráfica 5.8 e) en el cual podemos observar que la variación del Hue (color) se mantuvo en el segundo cuadrante, entre los ángulos 90 y 180, adicionalmente la gráfica 5.8 d) y f) muestran variación o cambios en la cromaticidad de la hoja y la luminosidad, comenzando con baja cromaticidad [18.5362] y finalizando con alta cromaticidad [20.7244], su luminosidad al menos en tendencia se mantuvo aproximadamente constante, es decir, nacen verdes opacas no tan luminosas, pasando por varios verdes con cierta tendencia al amarillo, y para finales del cultivo se observan con hojas verdes con poca tendencia al amarillo y mas oscuras comparadas con las lechugas Italianas.

Cultivo	L^*	a^*	b^*
Italiana	44.5174	-9.8836	15.8846
STD	3.6553	0.8351	4.3679
Orejona	44.2658	-10.1638	16.0517
STD	4.6345	1.1377	4.313

Tabla 5.1: Coordenadas CIELAB (L^* , a^* , b^*) Promedio total del cultivo, Espacio de Color Lechuga Italiana y Orejona.

Ahora observando la tabla 5.1, vemos que las lechugas Orejonas siempre fueron más verdes con tendencia al amarillo, es decir presentaron mayores valores para los parámetros a^* y b^* y menores valores para el parámetro L^* que las Italianas. Por otro lado, las Italianas aparecieron menos verdes con tendencia al amarillo o presentando

valores menores para los parámetros a^* y b^* y mayores valores para el parámetro L^* . La tabla 5.2, vemos que las lechugas Orejonas siempre fueron más verdes y cromáticas, es decir presentaron mayores valores para los parámetros h^* y C^* y menores valores para el parámetro L^* que las Italianas. Por otro lado, las Italianas aparecieron menos cromáticas o presentando valores menores para los parámetros h^* y C^* y mayores valores para el parámetro L^* .

Cultivo	L^*	h^*	C^*
Italiana	44.5174	123.1693	18.8218
STD	3.6553	6.9344	3.9302
Orejona	44.2658	123.3864	19.0941
STD	4.6345	6.3669	4.0257

Tabla 5.2: Coordenadas LCh Promedio total del cultivo, Espacio de Color Lechuga Italiana y Orejona.

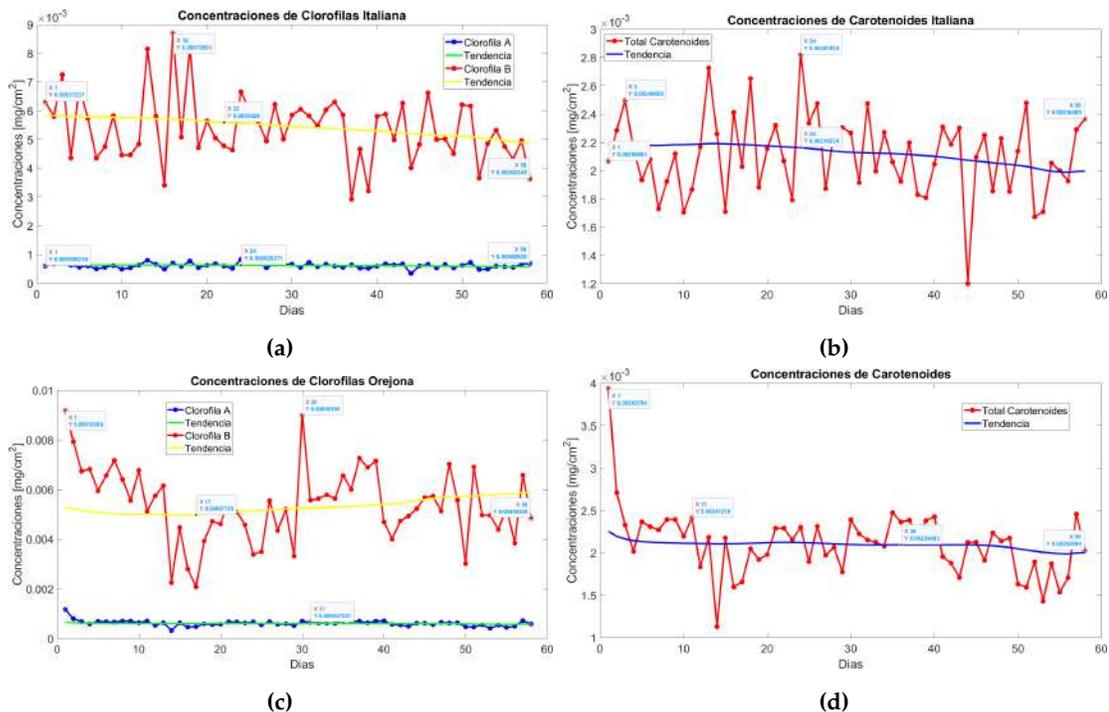


Figura 5.9: Variación de Concentraciones en $[mg/cm^2]$ de Clorofilas a y b durante los 58 días de cultivo para: a) Lechuga Italiana, c) Lechuga Orejona; Variación de Concentraciones de Carotenoides en $[mg/cm^2]$ durante los 58 días de cultivo para: b) Lechuga Italiana, d) Lechuga Orejona.

La figura 5.9 muestra la variación diaria de Concentración calculada en unidades $[\text{mg}/\text{cm}^2]$ de Clorofilas a y b, y de Caratenoides durante los 58 días de cultivo para la lechuga italiana y orejona. Observándose que en tanto las lechugas Italianas como en las Orejonas hubo mayor cantidad de concentración de clorofila b que clorofila a. Estas estimaciones fueron calculadas con las siguientes ecuaciones 5.1. Adicionalmente, se utilizo el comando `trenddecomp()` en MATLAB® para graficar las tendencias.

El conjunto de ecuaciones 5.1 permite estimar concentraciones de clorofila a, b y caratenoides a partir de los datos de la curva de reflectancia difusa de las lechugas, donde R_{672} , R_{550} y R_{708} son la valores de reflectancia a esas respectivas longitudes de onda en nanómetros en unidades de mg/cm^2 [111].

$$\begin{aligned} \text{Clorofila a (mg/cm}^2\text{)} &= 0.0161 \times \left[\frac{R_{672}}{(R_{550} \times R_{708})} \right]^{0.7784} \\ \text{Clorofila b (mg/cm}^2\text{)} &= 0.0337 \times \left[\frac{R_{672}}{R_{550}} \right]^{1.8695} \\ \text{Total Carotenoides (mg/cm}^2\text{)} &= 0.0049 \times \left[\frac{R_{672}}{(R_{550} \times R_{708})} \right]^{0.7488} \end{aligned} \quad (5.1)$$

La tabla 5.3, muestran las estimaciones promedio de clorofila a, clorofila b y caratenoides, calculadas con las siguientes ecuaciones 5.1 validadas por varios autores [111][112] a través de la data de la reflectancia difusa. Nótese que hubo mayor cantidad de concentración de clorofila b en ambas variedades de lechugas que concentración de clorofila a, sin embargo, los caratenoides se mantuvieron en la misma concentración, todo esto es de forma promediada, y es ajustado a la observación pues, a medida que aparecen mayor cantidad de concentración de carotenoides en este tipo de hortalizas, estaría indicando que la hoja se secó o esta sometida a algún estrés, bien sea hídrico, nutritivo, temperatura, etc.

Cultivo	Clorofila a	Clorofila b	Caratenoides
Italiana	3.83E-05	7.30E-03	2.10E-03
STD	1.11E-05	3.80E-03	2.89E-04
Orejona	6.14E-04	5.40E-03	2.10E-03
STD	1.17E-04	1.50E-03	3.88E-04

Tabla 5.3: Concentraciones Promedio de Clorofila a, b y Caratenoides $[\text{mg}/\text{cm}^2]$

La figura 5.10, muestra una relación lineal entre la luminosidad y la intensidad de los picos en reflectancia de la clorofila a y b en ambas variedades de lechugas, es

un hallazgo interesante hasta ahora no reportado, que podría tener implicaciones importantes en el estudio de la fotosíntesis y el comportamiento de las plantas en relación con la luz. Esta correlación lineal sugiere que a medida que aumenta la luminosidad, también lo hace la intensidad de los picos de reflectancia asociados con la clorofila a y b. Para entender mejor su significado, podemos considerar los siguientes puntos:

- **Relación con la fotosíntesis:** La relación lineal con el parámetro L^* para ambas clorofilas (a y b) sugiere que la luminosidad está influenciando de manera proporcional la intensidad de los picos de reflectancia para ambos tipos de clorofilas en las hojas de las plantas. La clorofila a y b juegan un papel complementario en la fotosíntesis. Ambas clorofilas trabajan en conjunto para capturar la luz y convertirla en energía química para la planta. Si la intensidad de los picos de reflectancia de la clorofila A y B aumenta con la luminosidad, esto podría indicar que la planta está respondiendo a una mayor disponibilidad de luz y que está maximizando su capacidad fotosintética para aprovecharla al máximo.
- **Respuestas adaptativas:** La correlación lineal entre el parámetro L^* y las clorofilas a y b podría estar relacionada con respuestas adaptativas de la planta a diferentes condiciones de luz. Las plantas pueden ajustar su composición de clorofilas para optimizar la captura de luz y ajustar su tasa fotosintética en función de la disponibilidad de luz y las condiciones ambientales cambiantes.
- **Influencia en la coloración de las hojas:** El parámetro L^* en las coordenadas $L^*a^*b^*$ está relacionado con la luminosidad o el brillo percibido en la imagen. Si la luminosidad se correlaciona linealmente con las clorofilas a y b, esto podría tener implicaciones en la coloración de las hojas. Cambios en la concentración de clorofilas a y b pueden afectar la absorción y reflexión de diferentes longitudes de onda de luz, lo que influiría en el color verde de las hojas.
- **Potencial aplicado a la agricultura:** Si se puede establecer una relación confiable entre la luminosidad y la intensidad de los picos de reflectancia de la clorofila b, esta información podría ser utilizada para optimizar prácticas agrícolas, como la gestión de la luz en invernaderos o la programación de riegos, con el fin de mejorar el rendimiento y la salud de los cultivos.

Comúnmente en trabajos experimentales, se suele buscar un ajuste de la tendencia de los datos a una función que mejor la represente, estas funciones pueden ser lineales,

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

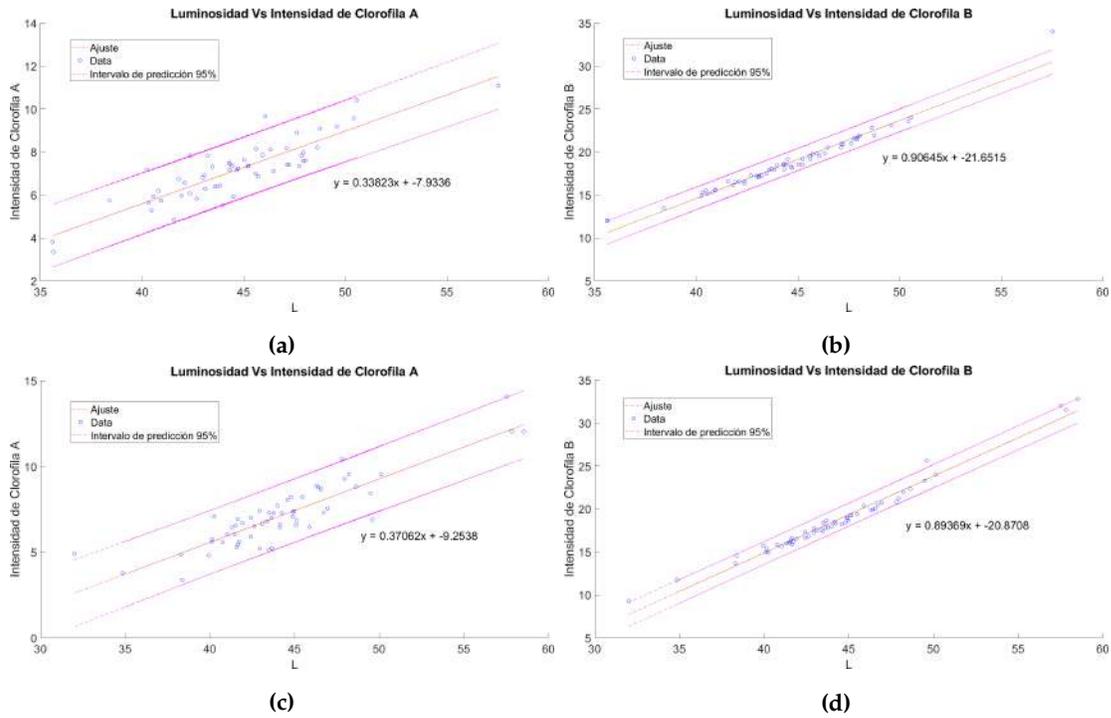


Figura 5.10: a) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a Lechuga Italiana, b) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b Lechuga Italiana, c) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a Lechuga Orejona, d) Correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b Lechuga Orejona

cuadráticas, cúbicas, etc, la importancia de encontrar este ajuste a una función, es permitir modelar o predecir el comportamiento de los datos experimentales, para este caso particular se propone un ajuste lineal dado la tendencia de los datos.

Un ajuste lineal es encontrar la recta que mejor prediga Y a partir de X. El ajuste lineal hace esto encontrando la recta que minimiza la suma de los cuadrados de las distancias verticales de los puntos desde la recta.

Por lo general, un intervalo de $y \pm \Delta$ se corresponde con un intervalo de predicción de aproximadamente el 68 % para observaciones futuras de muestras grandes, y $y \pm 2\Delta$ con un intervalo de predicción de aproximadamente el 95 %. Donde Δ corresponde al error estándar de la estimación, el cual es una forma de medir la precisión de las predicciones realizadas por un modelo de regresión.

En la gráfica (5.10), la recta en naranja representa el ajuste de los datos (círculos azules) de la luminosidad respecto a los picos de intensidad de la clorofila a. La separación entre las líneas rojas viene dado por error estándar de la predicción.

Concentración	Correlaciones				
	L*	a*	b*	C*	h*
[a]	-0.69709	0.66176	-0.67767	-0.68153	0.55694
[b]	0.097286	0.49601	-0.50909	-0.51023	0.4381

Tabla 5.4: Correlación entre parámetros ópticos y concentración de clorofila a y clorofila b

En la gráfica (5.10a) que corresponde a la correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a de la lechuga Italiana, su $\Delta = 0.7007$ y suponiendo para una predicción del 95 %, su $\Delta = 1.4014$.

En la gráfica (5.10b) que corresponde a la correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b de la lechuga Italiana, su $\Delta = 0.6450$ y suponiendo para una predicción del 95 %, su $\Delta = 1.2900$.

En la gráfica (5.10c) que corresponde a la correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a de la lechuga Italiana, su $\Delta = 0.9267$ y suponiendo para una predicción del 95 %, su $\Delta = 1.8534$.

En la gráfica (5.10d) que corresponde a la correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b de la lechuga Italiana, su $\Delta = 0.6671$ y suponiendo para una predicción del 95 %, su $\Delta = 1.3342$.

Ya que el Δ esta relacionado al error estándar de predicción y cuanto menor sea el valor, mejor será el ajuste y cuanto mayor sea el valor, peor será el ajuste. Vemos que el mejor ajuste a una recta se da para (5.10b) y (5.10d) que corresponden a la correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila b de la lechuga Italiana y Orejona respectivamente, ya que los Δ fueron menores en relación a los Δ de (5.10a) y (5.10c) que corresponden a la correlación Luminosidad-Intensidad de Clorofila a de la lechuga Italiana y Orejona respectivamente.

La tabla 5.4 muestra la correlación entre los parámetros de las coordenadas ($L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$), donde se puede observar una correlación negativa entre la clorofila a y L^* , igualmente entre la clorofila b y el parámetro C^* , aunque se observan correlaciones centradas a ± 0.5 , para estas áreas de estudios son bastantes aceptables para poder para estimar el contenido de clorofila [113][114].

5.0.4. Resultados obtenidos usando Absorbancia Relativa.

En el pasado, se propusieron varias ecuaciones para medir el contenido de clorofilas por métodos espectrofotométricos, en particular las ecuaciones de Arnon [115], todavía en uso pero no recomendadas [116, 117], las ecuaciones de Lichtenthaler [118] y las ecuaciones de Porra, son ampliamente utilizadas y más precisas [117, 119]. Las ecuaciones simultáneas se derivan resolviendo un sistema de ecuaciones donde la absorción se mide en una solución de pigmento después de su extracción de una muestra (hojas, membranas, complejos purificados) con solventes orgánicos, generalmente 80 % de acetona o metanol y haciendo uso de la ley de Lambert-Beer.

$$\begin{aligned}
 \text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{M}) &= 13.63 \times A_{663.6} - 2.64 \times A_{646.6} \\
 \text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{M}) &= 22.25 \times A_{646.6} - 5.06 \times A_{663.6} \\
 \text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 12.18 \times A_{646.6} - 2.36 \times A_{663.6} \\
 \text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 20.19 \times A_{646.6} - 4.59 \times A_{663.6}
 \end{aligned}
 \tag{5.2}$$

El conjunto de ecuaciones 5.2 son las mas actualizadas propuestas, que mejoran la estimación de clorofilas. Permitiendo determinar concentraciones de clorofila a y b, a partir de los datos de la curva de absorbancia relativa de las lechugas, donde $A_{663.6}$ y $A_{646.6}$ son la valores de absorbancia relativa a esas respectivas longitud de onda en nanómetros en unidades de mg/cm^2 [111, 57]

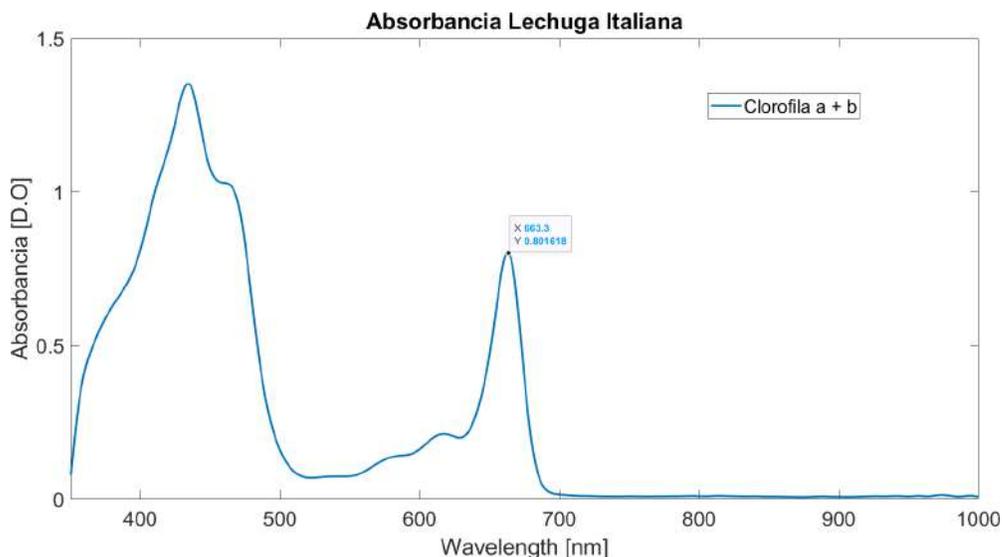


Figura 5.11: Espectros de absorción específicos de clorofila total.

La gráfica 5.11 muestra el resultado de la absorbancia relativa obtenida después de la extracción de clorofila de la hoja de lechugas italianas, siguiendo la metodología de

Maria, et al [57, 120], vale la pena, destacar, que el resultado en esta gráfica obtenida en laboratorio, muestra la suma de las clorofilas, por lo tanto, esto sería la resultante de la combinación lineal de pigmentos puros.

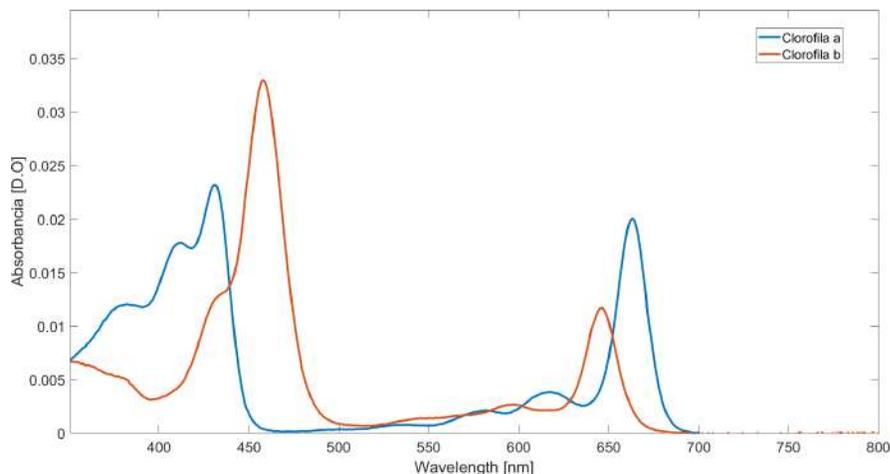


Figura 5.12: Espectros de absorción específicos de clorofila a y clorofila b.

La gráfica 5.12 [58] muestra los espectros de absorción específicos de clorofila a y clorofila b, por separados, cabe destacar que estas mediciones se realizaron estudiando pigmentos puros, a diferencia que en nuestro caso, no se realizaron estudios de pigmentos puros debido a la no disponibilidad de los mismos, adicionalmente se expone esta gráfica como una forma de justificar y comparar con la figura 5.11 para así establecer un criterio de comparación que permite al lector establecer puntos de referencias.

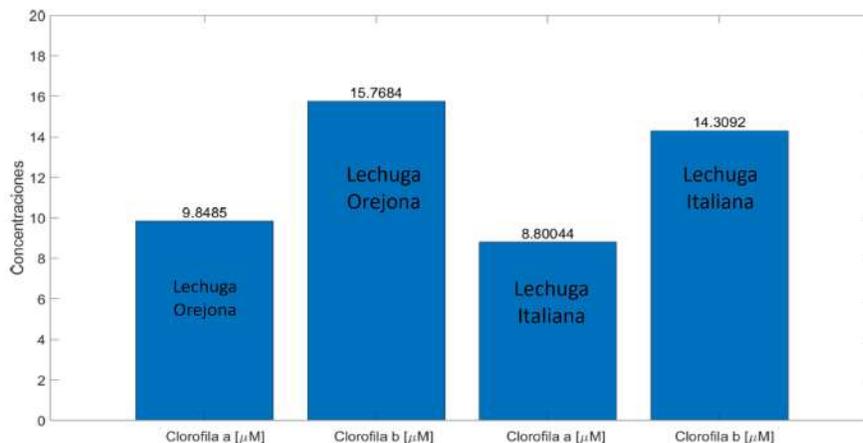


Figura 5.13: Concentraciones de Clorofila a y b para lechuga Italiana y Orejona. Calculadas del conjunto de ecuaciones 5.2

La figura 5.13 muestran las concentraciones de clorofila a y b para lechuga Italiana y Orejona en unidades de (μM), calculadas usando el conjunto de las nuevas ecuaciones 5.2, donde al igual que las concentraciones estimadas para reflectancia difusa 5.3, aquí usando absorbancia relativa, se evidencia que hay mayor cantidad de concentración de clorofila b que clorofila a.

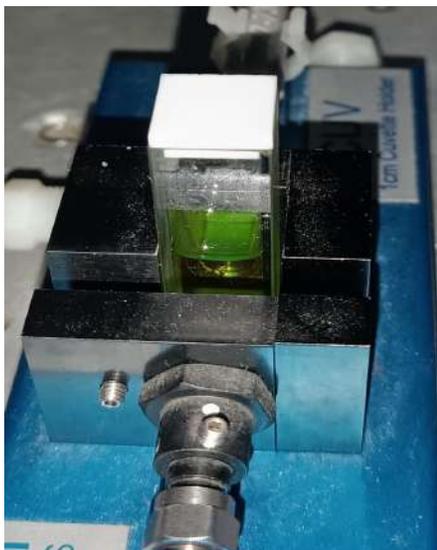


Figura 5.14: Cubeta con la solución de Clorofila, extraída de lechuga Italiana y Orejona.

El proceso experimental implica la extracción de las clorofilas ver figura 5.14 de las muestras de hojas utilizando solventes orgánicos como acetona o metanol, seguido de la medición de la absorción en soluciones de pigmentos utilizando la ley de Lambert-Beer.

Los resultados se presentan en forma de gráficos y tablas. Se muestra la absorbancia relativa de las clorofilas extraídas de las hojas de lechuga italiana y Orejona, lo que permite estimar la concentración de clorofila a y b. También se comparan los espectros de absorción específicos de clorofila a y clorofila b, obtenidos de pigmentos puros.

5.0.5. Resultados usando Espectroscopia Raman.

Se propuso un protocolo para detectar azúcares en hortalizas, particularmente en algunas variedades de lechugas disponibles hasta entonces.

El conjunto de gráficas 5.15. Muestran los espectros Raman de: a) Chlorella Vulgaris, b) Fructosa, c) Glucosa, d) Sacarosa, e) Chlorella Vulgaris + Fructosa. Se realizó caracterización de la Chlorella Vulgaris y las azúcares debido a que son componente

No	RamanShift (cm^{-1})	Muestra
1	625.51518	Fructosa
2	1105.1837	Glucosa
3	843.3711	Sacarosa

Tabla 5.5: Picos Prominentes Raman de las Azúcares.

hoja macerada, de esos 05 gramos de hojas macerada se procedió a centrifugar 02 g, del cual se uso 0.05 ml para medirlo (Fase Liquida), y fase restante (masa) también se midieron con Raman.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada lechuga, con el fin de detectar azúcar:

Para la gráfica 5.16, lechuga Orgánica Romana en 4 fases, Hoja directa, macerada, liquido y masa centrifugado Vs Chlorella. Se observa que el pico de la Fructosa se conserva o está presente en la hoja de la lechuga sin macerar, en la lechuga macerada y en el liquido centrifugado, pero no está presente en la masa restante de la centrifugación, ni en la Chlorella porque esta no tiene fructosa, por lo que esto sugiere que por efecto de la fuerza centrifuga la azúcar se quedó en el líquido.

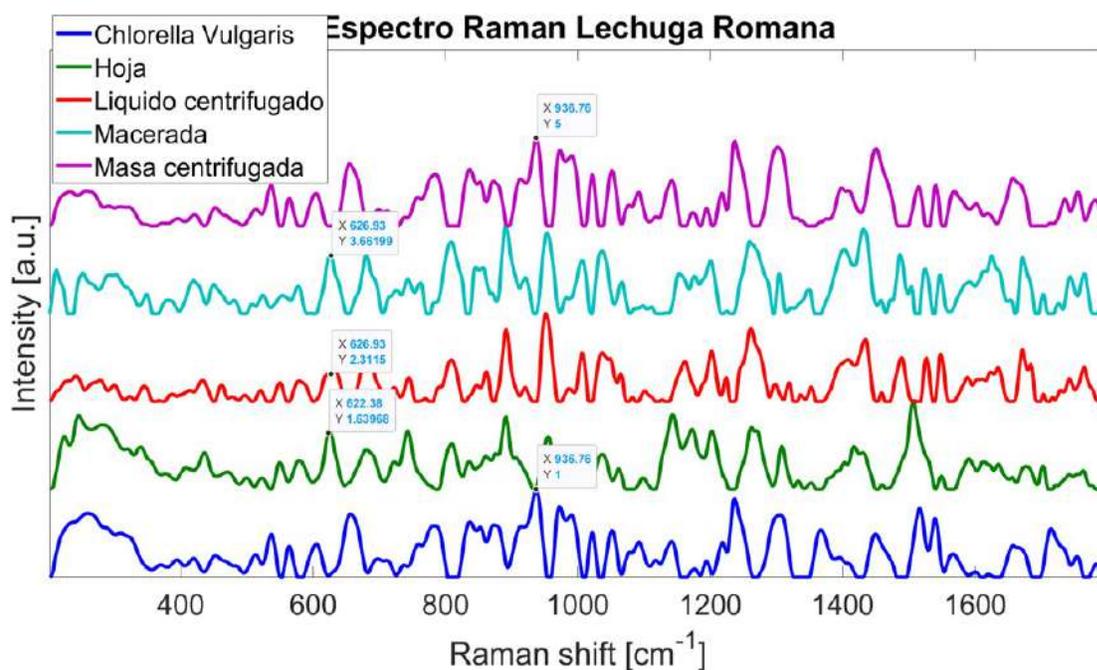


Figura 5.16: Espectro Raman Lechuga Orgánica diferentes fases + Chlorella, se señalan con etiquetas algunos picos de Fructosa y caratenoides.

Para la gráfica 5.17, lechuga Orgánica Iceberg Sin Azúcar en 4 fases, Hoja directa, macerada, Chlorella, liquido y masa centrifugado. Se observa que el pico de la Fructosa no se conserva ni está presente en la hoja de la lechuga sin macerar, ni en la lechuga macerada ni en el liquido centrifugado, ni está presente en la masa restante de la centrifugación, ni en la Chlorella porque esta no tiene fructosa, por lo que esto sugiere que por efecto de la fuerza centrifuga la azúcar se quedó en el líquido.

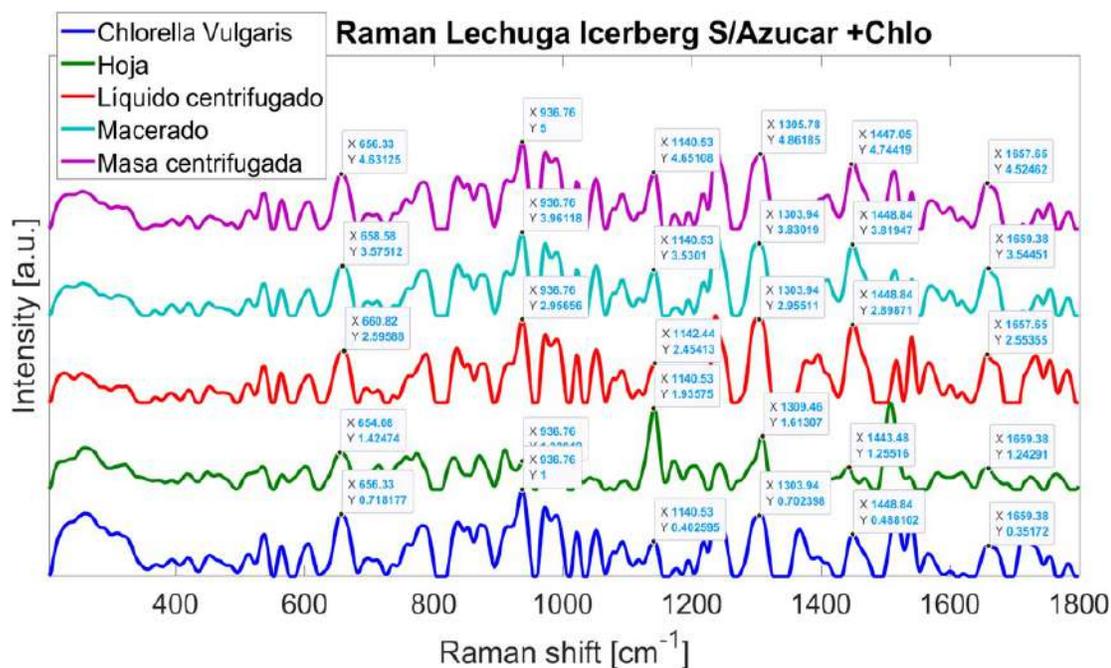


Figura 5.17: Espectro Raman Lechuga Icerberg + Chlorella, se señalan con etiquetas algunos picos de Chlorella y caratenoides.

Para la gráfica 5.18, Lechuga Italiana Hidropónica en 4 fases, Hoja directa, macerada, liquido y masa centrifugado Vs Chlorella. Se observa que el pico de la Fructosa se conserva o está presente en la hoja de la lechuga sin macerar, en la lechuga macerada y en el liquido centrifugado, pero no está presente en la masa restante de la centrifugación, ni en la Chlorella porque esta no tiene fructosa, por lo que esto sugiere que por efecto de la fuerza centrifuga la azúcar se quedó en el líquido.

Habiendo realizado la caracterización Raman de la Fructosa, Glucosa y Sacarosa y obteniendo los picos prominentes para los mismos, se puede observar de las gráficas, que se detecta Fructosa solo en las Lechugas Romana Orgánica y Lechuga Italiana Hidropónica, mientras que en la lechuga Iceberg sin Azúcar Orgánica, no se detecta en ninguna de sus fases.

Cabe destacar y recordar de la tabla 5.5, que el pico de la fructosa se encuentra en

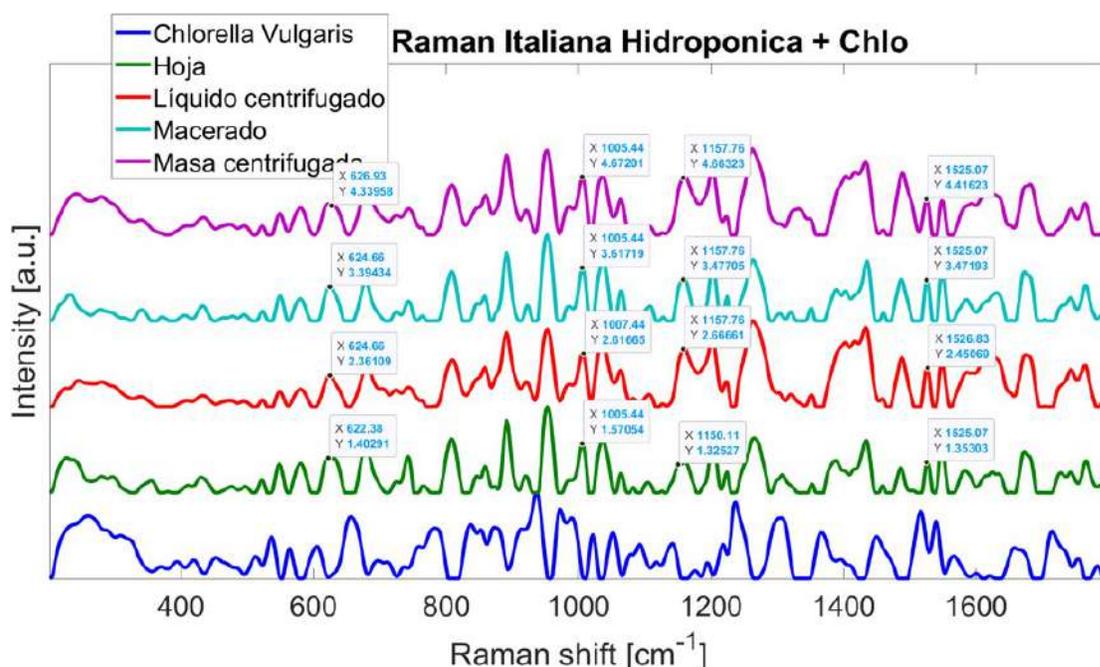


Figura 5.18: Espectro Raman Lechuga Italiana Hidropónica + Chlorella, se señalan con etiquetas algunos picos de Fructosa y caratenoides.

625.515 cm^{-1} , apareciendo este pico en las lechugas, salvo en la lechuga Iceberg sin Azúcar Orgánica. Los demás picos fuera de la chlorella y azúcares detectados, corresponden a los diferentes carotenoides reportados en la literatura.[6]

Se hace hincapié en la propuesta de esta metodología debido a que detectar azúcares con espectroscopía Raman se hizo complejo, teniendo que trabajar en oscuridad y bajar la temperatura con nitrógeno líquido, para evitar la acidificación de la clorofila. En resumen, el estudio se centró en el desarrollo de un protocolo para detectar azúcares en lechugas. Se utilizó la Espectroscopia Raman para analizar muestras de Chlorella Vulgaris, Fructosa, Glucosa y Sacarosa, ya que estos componentes son importantes y comunes en la composición química de las plantas y hortalizas.

Se presentaron gráficas de los espectros Raman de las muestras mencionadas, y se destacan los picos de mayor intensidad correspondientes a cada azúcar. Se realizó una caracterización de la Chlorella Vulgaris y las azúcares para establecer puntos de referencia.

Se estudiaron tres variedades de lechugas de origen comercial: Lechuga Romana Orgánica, Lechuga Iceberg sin Azúcar Orgánica y Lechuga Italiana Hidropónica. Se realizaron mediciones en diferentes fases de cada lechuga, incluyendo hoja directa, hojas maceradas, líquido y masa centrifugada.

Se observó que el pico de la Fructosa estaba presente en las lechugas Romana Orgánica e Italiana Hidropónica, pero no en la lechuga Iceberg sin Azúcar Orgánica.

Para finalizar, el análisis experimental mediante Espectroscopia Raman permitió detectar la presencia de fructosa en ciertas variedades de lechugas y brinda una propuesta metodológica para futuras investigaciones en la detección de azúcares en hortalizas utilizando esta técnica.

5.0.6. Resultados obtenidos usando Cromatografía de Partición.

Se realizó cromatografía de papel a extracto de clorofila de lechuga italiana de forma cualitativa para la separación de pigmentos, con el objetivo de comprobar de forma cualitativa la existencia de pigmentos fotosintéticos, tales como clorofilas y caratenoides.



Figura 5.19: Preparación de Separación de Pigmentos.

Se procedió para efectos comparativos usar acetona al 99 % y etanol al 99 % como se muestra en la figura 5.19, se tomaron hojas de lechugas italianas, las cuales fueron maceradas con los químicos anteriormente mencionados de diferentes polaridades como solución disolvente. Recordando que entre mas polar sea un disolvente, mas rápido es el movimiento de los compuestos y menos efectiva será la separación de los pigmentos. En este caso el etanol es mas polar que la acetona. Nótese en la figura

EVALUACIÓN ESPECTRAL DIFUSA Y RAMAN DE LA LECHUGA (*Parris Island, Parris starfighter*),

PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y DETECCIÓN DE AZÚCAR.

5.21 la efectividad de la acetona para separar pigmentos debido a su baja polaridad en comparación con el etanol.

La figura 5.20, se observa la separación de pigmentos fotosintéticos presentes en lechugas italianas, tales como caratenoides, Xantófilas, Clorofila a y b [71, 121].

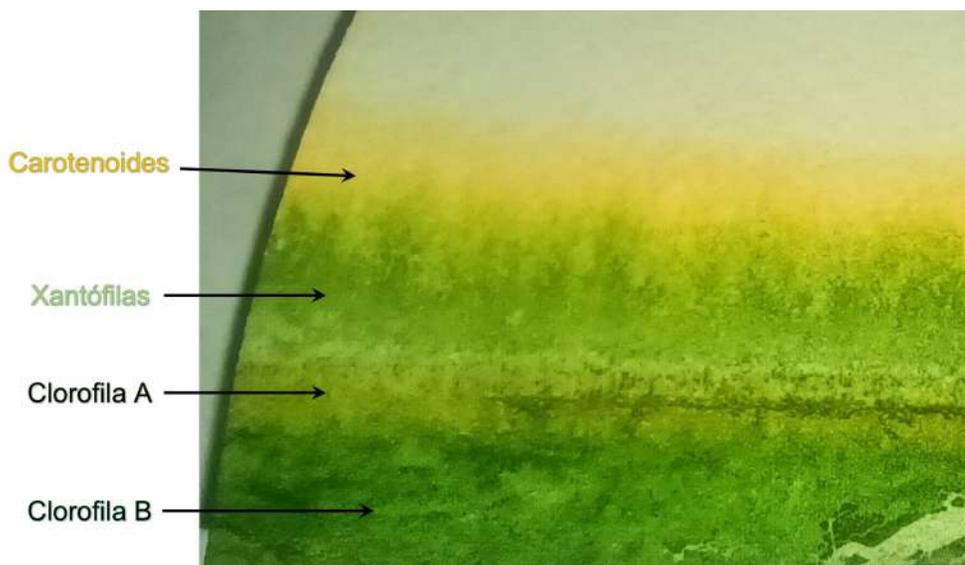


Figura 5.20: Separación de Pigmentos fotosintéticos en lechuga Italiana.

El estudio se enfocó en la separación cualitativa de pigmentos fotosintéticos, como clorofilas y carotenoides, presentes en extractos de clorofila de lechuga italiana. Se utilizó cromatografía de papel para lograr una separación visual de estos pigmentos y confirmar su existencia.

En resumen, el análisis experimental mediante cromatografía de papel permitió visualizar y comprobar de manera cualitativa la presencia de pigmentos fotosintéticos en extractos de clorofila de lechuga italiana. La técnica demostró ser efectiva para separar y distinguir los diferentes pigmentos presentes en la muestra, y se destacó la influencia de la polaridad del disolvente en la eficacia de la separación.

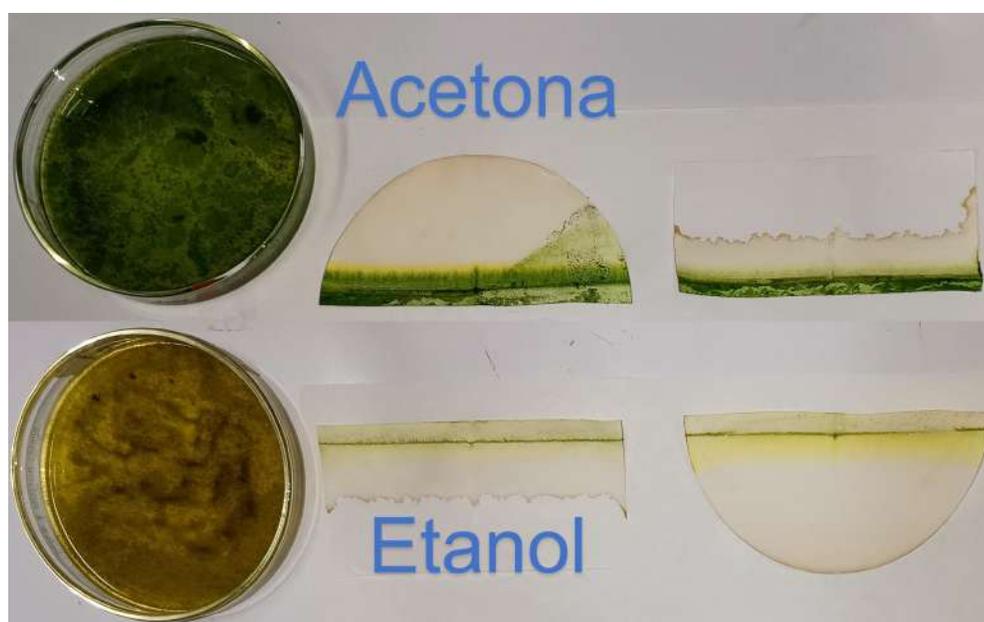


Figura 5.21: Comparación de Separación de Pigmentos fotosintéticos en lechuga Italiana.

CONCLUSIONES

6.1. Conclusiones

Dando respuesta a los objetivos y preguntas de la investigación 1, se pueden dar algunas conclusiones:

Un invernadero presenta ventajas variadas, por ejemplo, éstos se utilizan para cultivar o almacenar plantas y debido a los cambios climáticos, en los meses con más calor permite controlar las altas temperaturas en los cultivos, y sobre todo los que están cubiertos por plástico bajo cualquier otro tipo de cubierta. Mediante un buen monitoreo, no sólo aumenta la seguridad del agricultor, también se incrementa la calidad y la producción, y con ello la rentabilidad.

La hidroponía es una técnica que permite el cultivo de plantas sin suelo, utilizando una solución nutritiva disuelta en agua para alimentar a las plantas a través de sus raíces.

El cultivo hidropónico no solo ofrece ventajas agronómicas, sino que también representa una oportunidad para la agricultura en áreas urbanas y espacios reducidos. Gracias a su capacidad para ser implementado en pequeñas áreas, como zotehuelas o invernaderos, la hidroponía permite el desarrollo de una producción comercial o de auto-consumo, incluso en entornos urbanos.

Se observó claramente el comportamiento de la firma espectral para diferentes estados de salud de la hojas de lechuga, pudiéndose establecer un patrón entre plantas, secas, estresadas hidricamente y maduras saludables.

La reflectancia espectral tiene potencial para utilizar los modelos matemáticos propuestos con el fin de estimar el contenido y concentración de pigmentos de la lechuga y hasta discriminar cultivos de lechugas con diferentes colores, debido a que los

parámetros de las coordenadas CIELAB, permiten determinar las tendencias de color de las hojas de las lechugas.

El tipo de variedad de lechugas mostró similitud en la morfología de las curvas espectrales, sin embargo, tuvo variaciones en los valores de parámetros ópticos y en los valores de concentraciones de los pigmentos.

Observando los comportamientos de las firmas espectrales de las lechugas, a través de la 1ra derivada de la reflectancia difusa, se puede determinar la presencia de agua y/o estrés hídrico.

Usando la espectroscopia de absorción, se pudo observar los picos de absorción de la clorofila total de las lechugas, las cuales fueron comparadas con publicaciones recientes en la estimación de clorofilas, logrando de alguna manera, la reproducibilidad de estos experimentos. Adicionalmente usando actualizadas ecuaciones propuestas por autores de las recientes publicaciones, se calculó también por este método concentraciones de clorofila A y B.

Haciendo uso de la espectroscopía Raman en varios tipos de lechugas comerciales, se logró la detección de fructosa en dos variedades de lechuga, la tercera variedad la cual en su empaque comercial decía claramente que era sin azúcar, efectivamente, no se detectó ninguna clase de azúcar.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la aplicabilidad del uso de las coordenadas CIELAB para el análisis no destructivo de Clorofilas, carotenoides, entre otros en diferentes cultivos y tipos de lechuga cultivados bajo sistemas agrícolas orgánicos, hidropónicos y alternativos.

6.2. Trabajos Futuros

Se prevé realizar Espectroscopia Raman de superficie mejorada para la detección de azúcares y carotenoides en Variedades de Lechuga.

Se estima realizar siguientes cultivos hidropónicos y aplicar la espectroscopia de absorción combinada con técnicas de análisis de componentes principales para mejorar la estimación de concentraciones de pigmentos fotosintéticos. Así como el diseño de un sistema que permita mantener fija la distancia de la fibra del espectrómetro sobre la superficie de las hojas y de esta forma disminuir los errores instrumentales al momento de registrar la respuesta espectral las muestras de lechuga en sus diferentes etapas de desarrollo

BIBLIOGRAFÍA

- [1] *Análisis de la producción y consumo de hortalizas.*, 2020. http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-annolisis_-n-de_la_-n-produccinin_-n-y_-n-consumo_-n-de_-n-hortalizas_-n.htm, Consultado: 26 de Julio 2023.
- [2] Furlanetto, Renato Herrig, Thaise Moriwaki, Renan Falcioni, Mariana Pattaro, Alessandra Vollmann, Antonio Carlos Sturion Junior, Werner Camargos Antunes y Marcos Rafael Nanni: *Hyperspectral reflectance imaging to classify lettuce varieties by optimum selected wavelengths and linear discriminant analysis*. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 20:100400, 2020.
- [3] Mo, Changyeun, Giyoung Kim, Jongguk Lim, Moon S Kim, Hyunjeong Cho y Byoung Kwan Cho: *Detection of lettuce discoloration using hyperspectral reflectance imaging*. *Sensors*, 15(11):29511–29534, 2015.
- [4] Lu, Fan, Zhaojun Bu y Shan Lu: *Estimating chlorophyll content of leafy green vegetables from adaxial and abaxial reflectance*. *Sensors*, 19(19):4059, 2019.
- [5] Payne, William Z y Dmitry Kurouski: *Raman spectroscopy enables phenotyping and assessment of nutrition values of plants: a review*. *Plant Methods*, 17(1):1–20, 2021.
- [6] Gupta, Shilpi, Chung Hao Huang, Gajendra Pratap Singh, Bong Soo Park, Nam Hai Chua y Rajeev J Ram: *Portable Raman leaf-clip sensor for rapid detection of plant stress*. *Scientific Reports*, 10(1):20206, 2020.
- [7] *Información General y de Cultivo*, 2001. <http://www.faxsa.com.mx/semhort1/c601e001.htm>, Consultada diciembre 2022.
- [8] León, Adrián P, Sonia Z Viña, Diana Frezza, Alicia Chaves y Angel Chiesa: *Estimation of chlorophyll contents by correlations between SPAD-502 meter and chroma meter in butterhead lettuce*. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(19-20):2877–2885, 2007.

-
- [9] Kojima, Shumpei, Pradipta Mukherjee, Ibrahim Abd El-Sadek, Shuichi Makita, Yoshiaki Yasuno y Yiheng Lim: *Dynamics Imaging of Plant Maturity by Optical Coherence Tomography*. En *Optical Coherence Tomography*, páginas CTu2E–3. Optica Publishing Group, 2022.
- [10] Masahiko, Takeuchi, K Miyamoto, I Hiroaki, T Nishimatu y T Eiji: *Near infrared spectral imaging for the field server of lettuce growth*. En *Proceedings of the 41st SICE Annual Conference. SICE 2002.*, volumen 1, páginas 380–381. IEEE, 2002.
- [11] Oliveira Moura, Lorena de, Daniela de Carvalho Lopes, Antonio José Steidle Neto, Leila de Castro Louback Ferraz, Lanamar de Almeida Carlos y Luma Moreira Martins: *Evaluation of techniques for automatic classification of lettuce based on spectral reflectance*. *Food Analytical Methods*, 9:1799–1806, 2016.
- [12] Sanmartín, P, F Villa, B Silva, F Cappitelli y B Prieto: *Color measurements as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments*. *Biodegradation*, 22:763–771, 2011.
- [13] Peñuelas, J, J Pinol, R Ogaya y I Filella: *Estimation of plant water concentration by the reflectance water index WI (R900/R970)*. *International journal of remote sensing*, 18(13):2869–2875, 1997.
- [14] Kasmire, RF y M Cantwell: *Postharvest handling systems: Fruit vegetables*. 1992.
- [15] Kays, Stanley J: *Preharvest factors affecting appearance*. *Postharvest biology and technology*, 15(3):233–247, 1999.
- [16] Newman, JM, HW Hilton, SC Clifford y AC Smith: *The mechanical properties of lettuce: A comparison of some agronomic and postharvest effects*. *Journal of Materials Science*, 40:1101–1104, 2005.
- [17] Reid, MICHAEL S: *Maturation and maturity indices*. 1992.
- [18] Aquino, Margarita Araceli Zárate: *MANUAL DE HIDROPONIA*, Abril 20. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/232367/Manual_de_hidroponia.pdf, Último acceso marzo 2023.
- [19] Ross, Nancy: *Hidroponía: La Guía Completa de Hidroponía Para Principiantes*. Babelcube Inc., 2017.
- [20] Pérez Guadarrama, Nancy Itzel y Alberto Solórzano Salazar: *EFICIENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE LECHUGA HIDROPONICA CASO FRESCO CULTIVOS HIDROPONICOS*.

- [21] Pérez, G y A Luque: *Cultivo hidropónico de lechugas*, 1974.
- [22] Aquino, Margarita Araceli Zárate: *Manual de hidroponía*, 2015.
- [23] MARTINEZ, JUAN CARLOS GILSANZ: *HIDROPONIA*, Agosto 2019. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/520/1/11788121007155745.pdf>, Último acceso marzo 2023.
- [24] Beltrano, J y D Gimenez: *Cultivo en hidroponía. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)*, 2015. <http://bit.ly/2Cvu7cg>, Último Acceso: abril 2023.
- [25] Samperio Ruiz, Gloria: *Hidroponia comercial*. Editorial Diana, México, 1999.
- [26] D'Urso, Guido, Christophe El-Nakhel, Youssel Roupheal y Stefania De Pascale: *NUTRIENT DELIVERY AND WATER MANAGEMENT FOR PRODUCING LETTUCE (Lactuca sativa L.) FOR BIOREGENERATIVE LIFE SUPPORT SYSTEMS*.
- [27] Lee, YB y MH Park: *Effects of CO₂ concentration, light intensity and nutrient level on growth of leaf lettuce in a plant factory*. En *International Symposium on Growing Media and Hydroponics 548*, páginas 377–384, 1999.
- [28] Samperio, G: *Un paso más en la hidroponía: hidroponía básica y hidroponía comercial*. México. p, 327, 2004.
- [29] Reyes, C: *Evaluación de híbridos de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en hidroponía aplicando bioestimulante Jisamar en el cantón La Libertad*. Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Ecuador, 2009.
- [30] Resh, HM: *Cultivos hidropónicos*. 5ta. Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, 2001.
- [31] Samperio Ruiz, Gloria: *Hidroponia básica: el cultivo fácil y rentable de plantas sin tierra*. 1997.
- [32] Tito, Boris: *Tipos de cultivos hidropónicos: NFT, características y más.*, Mayo 2022. <https://ingenieriaambiental.net/tipos-de-cultivos-hidroponicos/>, Último acceso marzo 2023.
- [33] Martinez, Miguel: *Diseño y Construcción de Invernaderos, Curso de introducción a la hidroponía*. Informe técnico, Tlaxcala, México, 2023.
- [34] R., Gabriel (ed.) Saavedra del: *Manual de producción de Lechuga [en línea]*. páginas 2–153, Enero 2017. <https://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/>

- 20.500.13082/29500/INIA_Libro_0051.pdf?sequence=1, (Consultado: 11 junio 2023)., Santiago, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 374. Última Consulta 26 julio 2023.
- [35] Jackson, LE: *Root architecture in cultivated and wild lettuce (Lactuca spp.)*. *Plant, Cell & Environment*, 18(8):885–894, 1995.
- [36] Fernández, Germán: *Espectroscopía visible-Ultravioleta, Ecuación de Lambert-Beer*. <https://www.quimicaorganica.org/espectroscopia-visible-ultravioleta/733-ecuacion-delambert-beer.html>, Último acceso marzo 2023.
- [37] Clark, Jim: *THE BEER-LAMBERT LAW*. <https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html>, Último acceso marzo 2023.
- [38] Ball, David Warren: *The basics of spectroscopy*, volumen 49. Spie press, 2001.
- [39] Sensing, Konica Minolta: *Precise color communication: color control from perception to instrumentation*. Manual notes, páginas 16–44, 2007.
- [40] Technology, Rochester Institute of: *Munsell Color Science Lab Educational Resources*, Último acceso marzo 2023. <https://www.rit.edu/science/munsell-color-science-lab-educational-resources>.
- [41] Munsell, Albert H: *A color notation, 1ra*, 1905.
- [42] Adobe Color. 2023. <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entiendiendo-el-espacio-de-color-cie-lch/>, Último acceso marzo 2023.
- [43] *Entendiendo El Espacio de Color CIE L*C*h**. 2023. <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entiendiendo-el-espacio-de-color-cie-lch/>, Último acceso marzo 2023.
- [44] *Percepción del Color*, 2023. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/vision/colper.html#c2>, Último acceso marzo 2023.
- [45] Sharma, Abhay: *Understanding color management*. John Wiley & Sons, 2018.
- [46] Ford, Adrian y Alan Roberts: *Colour space conversions*. Westminster University, London, 1998:1–31, 1998.

- [47] Judd, DB y G Wyszecki: *Color in business, science, and industry*. John Wiley & Sons. Inc, New York, páginas 5–90, 1975.
- [48] Wyszecki, Günther y Walter Stanley Stiles: *Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae*, volumen 40. John Wiley & Sons, 2000.
- [49] Representación gráfica del espacio de color $L^*a^*b^*$, 2023. https://www.mdpi.com/sensors/sensors-14-11943/article_deploy/html/images/sensors-14-11943f2-1024.png, Último acceso junio 2023.
- [50] Representación gráfica del espacio de color $L^*C^*h^*$, 2023. <https://www.mathworks.com/help/images/hsvcone.gif>, Último acceso marzo 2023.
- [51] Diagrama bidimensional de color Lab y LCh., 2023. <https://www.quantotec.com/sp/Colorimetria.htm>, Último acceso junio 2023.
- [52] Berns, Roy S: *Billmeyer and Saltzman's principles of color technology*. John Wiley & Sons, 2019.
- [53] Capilla, Pascual, José María Artigas y Jaume Pujol: *Fundamentos de colorimetría*, volumen 55. Universitat de València, 2002.
- [54] Sánchez, Gustavo: *Qué es el observador estándar CIE*. Último acceso Marzo 2023. http://www.gusgsm.com/que_es_el_observador_estandar_cie.
- [55] ILLUMINATION, CIE INTERNATIONAL COMMISSION ON: *technical Report Colorimetry*. Último acceso: Marzo 2023. <https://cielab.xyz/pdf/cie.15.2004%20colorimetry.pdf>.
- [56] Beatty, J Thomas, Howard Gest y John F Allen: *Discoveries in photosynthesis*. Springer, 2005.
- [57] Chazaux, Marie, Christo Schiphorst, Gioele Lazzari y Stefano Caffarri: *Precise estimation of chlorophyll a, b and carotenoid content by deconvolution of the absorption spectrum and new simultaneous equations for Chl determination*. The Plant Journal, 109(6):1630–1648, 2022.
- [58] Clementson, Lesley A y Bozena Wojtasiewicz: *Dataset on the absorption characteristics of extracted phytoplankton pigments*. Data in brief, 24:103875, 2019.
- [59] Goldberg, Deborah T: *Barron's AP biology*. Simon and Schuster, 2017.

- [60] García, A: *Estudio de la reflectancia espectral y modelos de predicción de color en mosaicos vítreos*. Tesis de Doctorado, Tesis de grado). Universidad de Cantabria, España, 2016.
- [61] Lopes, Daniela de Carvalho, Lorena de Oliveira Moura, Antonio José Steidle Neto, Leila de Castro Louback Ferraz, Lanamar de Almeida Carlos y Luma Moreira Martins: *Spectral indices for non-destructive determination of lettuce pigments*. *Food Analytical Methods*, 10:2807–2814, 2017.
- [62] Ndung'u, CN, MI Kaniu y JM Wanjohi: *Optimization of diffuse reflectance spectroscopy measurements for direct and rapid screening of pesticides: A case study of spinach*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 280:121556, 2022.
- [63] Peñuelas, Josep y Iolanda Filella: *Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status*. *Trends in plant science*, 3(4):151–156, 1998.
- [64] Christensen, Lene Krøl: *NPK deficiencies discrimination by use of spectral and spatial response*. Trabajo de gradopresentadocomorequisito para optar al Título de Doctor en Filosofía. Dinamarca: THE Royal Veterinary and Agricultural University, Department of agricultural Sciences AgroTehonology, 2004.
- [65] Caldentey Aventín, Pedro: *Utilización de sensores multiespectrales e hiperespectrales embarcados en RPAS con el objetivo de dosificar abonos en cultivos*. B.S. thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, 2017.
- [66] McKinnon, Tom: *Agricultural drones: What farmers need to know*. Boulder, Colorado, 2016.
- [67] Lorca, Manuel Peinado y Luis Monje: *Pigmentos y fotones: la ciencia detrás de los colores otoñales del bosque*. <https://theconversation.com/pigmentos-y-fotones-la-ciencia-detras-de-los-colores-otonales-del-bosque-148828>, Último acceso marzo 2023.
- [68] Reol, E Manrique: *Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis*. *Ecosistemas*, 12(1), 2003.
- [69] Campbell, Neil A, Jane B Reece, LA Urry, ML Cain, SA Wasserman, PV Minorsky y RB Jackson: *Chapter 10 Photosynthesis*. *Biology*, B. Cummins, ed.(San Francisco, USA: Pearson Education), páginas 185–205, 2011.

- [70] Moore, R, WD Clark, RS Kingsley y D Vodopich: *Plant physiology and growth*. Botany; Wm. C. Brown Pub: Dubuque, IA, USA, 1995.
- [71] Baudino, Fabio Daniel Torossi: *Una experiencia sencilla con fundamentos complejos: la separación de pigmentos fotosintéticos mediante cromatografía sobre papel*. Anales de Química de la RSEQ, 103(4):45-45, 2007.
- [72] Skoog, Douglas A, F James Holler y Stanley R Crouch: *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning, 2017.
- [73] Smith, Roger M y Aurél Marton: *Classification and characterization of stationary phases for liquid chromatography: Part I. Descriptive terminology (IUPAC Recommendations 1997)*. Pure and applied chemistry, 69(7):1475-1480, 1997.
- [74] Zweig, Gunter y Joseph Sherma: *Handbook of chromatography*. Informe técnico, Crc Press, 1972.
- [75] Smith, I y JG Feinberg: *Cromatografía sobre papel y capa fina*. Electroforesis. Editorial Alambra. Madrid, páginas 65-66, 1979.
- [76] Braithwaite, Alan y JF Smith: *Chromatographic methods*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [77] Skoog, Holler: *Nieman. Principios de análisis instrumental, Quinta edición, McGrawHill, HarcourtBrace&Company*. 2003.
- [78] Strain, Harold H y Joseph Sherma: *Modifications of solution chromatography illustrated with chloroplast pigments*. Journal of chemical education, 46(8):476, 1969.
- [79] Ocean Optics, Inc.: *USB2000 manual and operating instructions*. https://exact-sciences.tau.ac.il/sites,/exactsci.tau.ac.il/files/media_server/Exact_Science/Chemistry/laboratories/USB2000%20operating%20Instructions.pdf, Última consulta marzo 2023.
- [80] Campíns-Falcó, Pilar y FM Querol Piñón: *Aplicaciones del uso de la técnica de espectroscopía de reflectancia difusa en química forense para la caracterización de autenticidad de los sellos de correos de España*. Gaceta internacional de ciencias forenses, (5):48-75, 2012.
- [81] Valero Ubierna, Constantino: *Aplicación de la espectroscopia de reflectancia difusa (ERDT) a la detección de parámetros de calidad en fruta*. Tesis de Doctorado, Agronomos, 2001.

-
- [82] Rendón Ramírez, Julián Mauricio: *Diseño de fases cristalinas tipo perovskita con potenciales aplicaciones fotovoltaicas*. Departamento de Química, 2017.
- [83] Geladi, P., D. MacDougall y H. Martens: *Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat*. *Appl. Spectrosc.*, 39(3):491–500, May 1985. <https://opg.optica.org/as/abstract.cfm?URI=as-39-3-491>.
- [84] Heise, H. M. y R. Winzen: *Chemometrics in Near-Infrared Spectroscopy*, capítulo 7, páginas 125–162. John Wiley Sons, Ltd, 2001, ISBN 9783527612666. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527612666.ch07>.
- [85] Isaksson, Tomas y Tormod Næs: *The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy*. *Applied Spectroscopy*, 42(7):1273–1284, 1988.
- [86] Rinnan, Åsmund, Frans Van Den Berg y Søren Balling Engelsen: *Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(10):1201–1222, 2009.
- [87] Windig, Willem, Jeremy Shaver y Rasmus Bro: *Loopy MSC: a simple way to improve multiplicative scatter correction*. *Applied spectroscopy*, 62(10):1153–1159, 2008.
- [88] Smith, Ewen y Geoffrey Dent: *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2019.
- [89] Roa, Rebeca Maria Bruzual: *Identificación de estrés a través de biomarcadores salivales mediante Espectroscopía Raman y su asociación con el inventario de estrés académico*. 2022.
- [90] Raman, CV y P Nilakantan: *Nature*, 1928.
- [91] Ramos, Jorge Castro: *Espectroscopia Raman y sus aplicaciones*. Óptica pura y aplicada, ISSN-e 2171-8814, Vol. 46, N°. 1, 2013 (Ejemplar dedicado a: Mexican Optics and Photonics Meeting 2012 - MOPM), págs. 83-95.
- [92] Knipling, Edward B: *Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation*. *Remote sensing of environment*, 1(3):155–159, 1970.
- [93] Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger: *Fisiología vegetal*, volumen 10. Universitat Jaume I, 2007.

- [94] Gupta, Otkrist, Anshuman J Das, Joshua Hellerstein y Ramesh Raskar: *Machine learning approaches for large scale classification of produce*. Scientific reports, 8(1):5226, 2018.
- [95] Guggisberg, D y JO Bosset: *Colour in food (Improving quality)*. LWT-Food Science and Technology, 3(36):375–376, 2003.
- [96] RAHMAWATI, Laila, Aryanis Mutia ZAHRA, Riana LISTANTI, Rudiati Evi MASITHOH, Hari HARIADI, Merynda Indriyani SYAFUTRI, Eka LIDIASARI, Rima Zuriah AMDANI, Sri AGUSTINI, Laela NURAINI y cols.: *Necessity of Log (1/R) and Kubelka-Munk transformation in chemometrics analysis to predict white rice flour adulteration in brown rice flour using visible-near-infrared spectroscopy*. Food Science and Technology, 43, 2023.
- [97] MacDougall, Douglas: *Colour in food: improving quality*. Woodhead Publishing, 2002.
- [98] Kidmose, Ulla, Merete Edelenbos, Lars P Christensen y Erling Hegelund: *Chromatographic determination of changes in pigments in spinach (Spinacia oleracea L.) during processing*. Journal of chromatographic science, 43(9):466–472, 2005.
- [99] Van Wittenberghe, Shari, Luis Alonso, Zbyněk Malenovský y José Moreno: *In vivo photoprotection mechanisms observed from leaf spectral absorbance changes showing VIS–NIR slow-induced conformational pigment bed changes*. Photosynthesis Research, 142(3):283–305, 2019.
- [100] Xue, Lihong y Linzhang Yang: *Deriving leaf chlorophyll content of green-leafy vegetables from hyperspectral reflectance*. ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing, 64(1):97–106, 2009.
- [101] Jacobs, Bert AJG, Bert E Verlinden, Els Bobelyn, An Decombel, Peter Bleyaert, Joris Van Lommel, Isabel Vandevelde, Wouter Saeys y Bart M Nicolai: *Estimation of the prior storage period of lamb's lettuce based on visible/near infrared reflectance spectroscopy*. Postharvest Biology and Technology, 113:95–105, 2016.
- [102] Marin, Alicia, Federico Ferreres, Gonzalo G Barbera y María I Gil: *Weather variability influences color and phenolic content of pigmented baby leaf lettuces throughout the season*. Journal of agricultural and food chemistry, 63(6):1673–1681, 2015.
- [103] Peñuelas, J, JA Gamon, AL Fredeen, J Merino y CB Field: *Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen-and water-limited sunflower leaves*. Remote sensing of Environment, 48(2):135–146, 1994.

- [104] Yun, Yonghuan: *Data processing for modeling with the NIR data*, 2014. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/48493-data-processing-for-modeling-with-the-nir-data>.
- [105] Jacquemoud, Stéphane y Frédéric Baret: *PROSPECT: A model of leaf optical properties spectra*. *Remote sensing of environment*, 34(2):75–91, 1990.
- [106] Zhang, Huaibi, Monica Jordheim, David H Lewis, Steve Arathoon, Øyvind M Andersen y Kevin M Davies: *Anthocyanins and their differential accumulation in the floral and vegetative tissues of a shrub species (Rhabdothamnus solandri A. Cunn)*. *Scientia Horticulturae*, 165:29–35, 2014.
- [107] Zhong, Jian jiang, Tatsuji Seki, Shin ichi Kinoshita y Toshiomi Yoshida: *Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of Perilla frutescens*. *Biotechnology and bioengineering*, 38(6):653–658, 1991.
- [108] Romani, Annalisa, Patrizia Pinelli, Carlotta Galardi, Graziano Sani, Antonio Cimato y Daniela Heimler: *Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce*. *Food Chemistry*, 79(3):337–342, 2002.
- [109] Hohl, Ursula, Barb Neubert, Holger Pforte, Ilona Schonhof y Hartmut Böhm: *Flavonoid concentrations in the inner leaves of head lettuce genotypes*. *European food research and technology*, 213:205–211, 2001.
- [110] Leyva, Antonio, José Antonio Jarillo, Julio Salinas y José Miguel Martínez-Zapater: *Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of Arabidopsis thaliana in a light-dependent manner*. *Plant physiology*, 108(1):39–46, 1995.
- [111] Datt, Bisun: *Remote sensing of chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+ b, and total carotenoid content in eucalyptus leaves*. *Remote Sensing of Environment*, 66(2):111–121, 1998.
- [112] Lichtenthaler, Hartmut K, Anatoly Gitelson y Michael Lang: *Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements*. *Journal of Plant Physiology*, 148(3-4):483–493, 1996.
- [113] Ramos García, Carlos Arturo: *Método para estimar el contenido de Nitrógeno en cultivos de maíz (Zea mays L.) con base en espectrometría. Caso de estudio Puerto Gaitán, Meta*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, 2015.

- [114] SOLIS-PINO, ANDRÉS FELIPE, DAVID ARMANDO REVELO-LUNA, DIEGO ANDRÉS CAMPO-CEBALLOS y CARLOS ALBERTO GAVIRIA-LÓPEZ: *Correlación del contenido de clorofila foliar de la especie Coffea arabica con índices espectrales en imágenes*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(2):57–68, 2021.
- [115] Arnon, Daniel I: *Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1):1, 1949.
- [116] Esteban, Raquel, Jose I. García-Plazaola, Antonio Hernández y Beatriz Fernández-Marín: *On the recalcitrant use of Arnon's method for chlorophyll determination*. *New Phytologist*, 217(2):474–476, 2018. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.14932>, Última consulta marzo 2023.
- [117] Porra, Robert J: *The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b*. *Photosynthesis research*, 73:149–156, 2002.
- [118] Lichtenthaler, Hartmut K: [34] *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*. En *Methods in enzymology*, volumen 148, páginas 350–382. Elsevier, 1987.
- [119] Porra, RJ, WAA Thompson y PE Kriedemann: *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975(3):384–394, 1989.
- [120] Lichtenthaler, Hartmut K y Claus Buschmann: *Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy*. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1):F4–3, 2001.
- [121] Mancilla, C, C Castrejon, T Rosas, E Blanco y S Perez: *Extracción y separación de pigmentos vegetales*. Chapultepec: Universidad del Valle de México, QFB, 2013.

APÉNDICE

```
1  %%% 1er Derivada de la Reflectancia%%  
2  figure  
3  [dxr] = deriv(yfiltardo',1,5,2);  
4  plot(x,dxr,'LineWidth',2)  
5  axis([min(x) max(x) min(dxr) max(dxr)])  
6  legend('Location','northwest')  
7  title('1ra Derivada Espectros Promedios')  
8  xlabel('Wavelength [nm]')  
9  ylabel('First Derivative Reflectance')  
10 set(gca,'FontSize',20)
```

Programa creado para calcular la Primera Derivada de la reflectancia difusa de las lechugas.