

Article:

Healthy Plants Simulators Implementation and with Water Stress for the Calibration of the Detection by Multispectral Camera

Aarón Alberto Muñoz Morales^{1,2} * , Naire Duque¹ , Yoel Rafael Cuerva Henríquez³ ¹ Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela² Departamento de Física, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela³ Departamento de Física, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Recibido: marzo, 2021

Aceptado: abril, 2021

Autor para correspondencia: A. Muñoz M. e-mail: aamunozmorales@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4968793>**Abstract**

The goal was develop simulators of healthy plant tissue and with water stress to calibrate a multispectral camera; from an aqueous solution of gelatin and agar, than used glycerin as a dispersing and moisture-preserving agent, formaldehyde as a hardening and bactericidal, in addition to photosynthetic pigments extracted from green and dried leaves of basil plants (*Ocimum basilicum*). To obtain a matrix with adequate consistency, flexibility and sterility, several tests were carried out. Simulators were developed from the resulting material that included the addition of chromophores; for the characterization, the determination of the spectral signature of the set of pigments associated with healthy plant tissue and with water stress was carried out by means of UV-Visible spectroscopy, diffuse reflection spectrophotometry (DRS), and finally the use of multispectral analysis. Achieving simulators with similar optical properties to vegetation in both conditions, being verifiable spectrophotometrically and multispectrally.

Keywords: healthy plant tissue; water stress; simulators; spectral signature; spectrophotometry; multispectral.

Artículo:

Implementación de simuladores de plantas sanas y con estrés hídrico para la calibración de la detección por cámara multiespectral

Resumen

La meta fue desarrollar simuladores de tejido vegetal sano y con estrés hídrico para calibrar una cámara multiespectral; a partir de una solución acuosa de gelatina y agar que empleó glicerina como agente dispersante y preservante de la humedad, formaldehído como endurecedor y bactericida, además de pigmentos fotosintéticos extraídos de hojas verdes y secas de plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*). Para obtener una matriz con consistencia, flexibilidad y esterilidad adecuadas fueron realizados varios ensayos. A partir del material resultante se desarrollaron simuladores que incluyeran la adición de cromóforos; para la caracterización fue realizada la determinación de la firma espectral del conjunto de pigmentos asociados a tejido vegetal sano y con estrés hídrico mediante espectroscopía UV-Visible, espectrofotometría de reflexión difusa (ERD) y por último el empleo de análisis multiespectral. Logrando como resultado simuladores con propiedades ópticas similares a la vegetación en ambas condiciones, siendo verificable espectrofotométricamente y multiespectralmente.

Palabras clave: tejido vegetal sano; estrés hídrico; simuladores; firma espectral; espectrofotometría; multiespectral.

1. Introducción

El estrés está definido como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Como respuesta a dicha desviación se inducen cambios en todos los niveles funcionales del organismo, pudiendo ser dichos cambios reversibles o permanentes. El estrés vegetal constituye una fuerte restricción para el desarrollo de los cultivos, aún si la condición de estrés es temporal, es normal que la vitalidad de la planta se vea disminuida entretanto se realizan los ajustes requeridos para la nueva situación. Si el estrés es demasiado intenso o el periodo de acción es demasiado largo entonces los daños latentes se transforman en daño irreversible que puede afectar la planta entera o partes de la misma [1].

La respuesta espectral de la vegetación está caracterizada por el papel fundamental que desempeñan los pigmentos de la hoja en la absorción de la energía. La absorción está gobernada principalmente por la estructura interna, esto es, composición, concentración y distribución de los pigmentos (la clorofila, el caroteno y la xantofila). De ellos, el más importante es la clorofila y puesto que en condiciones de estrés su cantidad en la planta disminuye, esta variable permite monitorear el estrés vegetal (ver Alonso *et al.* [2]). Los *phantoms* son simuladores de tejido cuya misión es proporcionar propiedades ópticas similares a los tejidos reales y por consiguiente facilitan la realización de análisis no invasivos. Los *phantoms* se diseñan con unas características acordes a su propósito o aplicación específica [3], siendo necesario su estandarización a través de algún proceso de caracterización óptica.

Algunos materiales sólidos pueden ser analizados mediante espectroscopía UV-Visible, disolviendo el sólido en un determinado disolvente, lo cual imposibilita la recuperación para otras medidas. Afortunadamente, hay accesorios que permiten al analista tomar ventaja de la reflexión del haz incidente, en lugar de usar la configuración estándar de absorción UV. La espectroscopía UV-Visible por reflectancia difusa es ideal para la caracterización de propiedades ópticas y electrónicas de diversos materiales, tales como películas, filtros y pigmentos [4], por lo que ésta técnica resulta muy útil para la caracterización del *phantom*.

Las imágenes multiespectrales se captan mediante un sensor digital que mide la radiación reflejada o reflectancia en muchas bandas. Un conjunto de detectores puede medir energía roja reflejada dentro de la parte visible del espectro mientras que otro conjunto mide la energía del infrarrojo cercano. Los distintos valores de reflectancia se combinan para crear imágenes de color (color verdadero o falso color) [5]. Con el fin de poder analizar e interpretar los datos adquiridos por dichos sensores, es necesario realizar medidas radiométricas en el laboratorio o en el campo. A partir de dichas medidas es posible determinar la relación entre esas curvas de referencia (*firmas espectrales*) y las características del objeto observado en la imagen multiespectral [2].

El principio básico de la percepción remota radica en que los diversos objetos de interés (vegetación, suelo, agua, etc.) reflejan, dispersan o emiten cantidades diferenciales de radiación electromagnética, la diferencia en estos niveles de radiaciones registradas por un sensor es lo que permite distinguir las diferencias entre los objetos en las imágenes generadas [6]. Junto a la alta resolución espacial, también hay que valorar el aumento de la resolución espectral, que permite mejorar la estimación de variables biofísicas, como la clorofila y lignina en la vegetación, o la humedad y la presencia de ciertos minerales en el suelo [7].

Las cámaras multiespectrales permiten monitorear los pequeños cambios en la radiación visible e infrarroja que las plantas reflejan. Los agricultores utilizan estos datos para detectar plantas bajo estrés, controlar su crecimiento o realizar multitud de funciones útiles en el manejo de los cultivos. Las variaciones infrarrojas indican cambios en la vegetación mucho antes de que aparezcan en el espectro visible [6]. En los aspectos generales de los temas tratados en esta investigación, el trabajo de Duque [8] contiene una buena revisión bibliográfica. A continuación son presentadas algunas publicaciones referidas al uso de los *phantoms* en análisis multiespectrales.

Toderas *et al.* [9] emplean imágenes multiespectrales de *Landsat* en el análisis de la vegetación forestal. Farrer *et al.* [10] desarrollaron los *phantoms* empleando una matriz de gelatina en polvo y leche evaporada en diferentes proporciones, analizaron

individualmente sus propiedades acústicas, mecánicas y térmicas.

Atkinson y Urwin [11] afirman que existe una interacción entre el estrés biótico y abiótico de las plantas. En diferentes *phantoms* mostraron aumentos de temperatura repetibles; por lo que los mismos pueden imitar con fiabilidad los tejidos blandos.

La investigación de Hungr *et al.* [12] proporciona una descripción detallada de los diversos materiales examinados para el desarrollo de un *phantom* de próstata deformable, además de las consideraciones experimentales al emplear cada uno de ellos para la preparación de la matriz del *phantom*.

Una revisión de *phantoms* (*simuladores de tejidos*) para espectroscopía óptica, imagen y dosimetría fue realizada por Pogue y Patterson [13], quienes proporcionan una visión general de la composición y propiedades de los *phantoms*, la dispersión y la absorción de los materiales empleados para su realización, ventajas y desventajas de cada categoría.

Otros pigmentos de interés son los carotenos, xantofilas y antocianinas. Los carotenos y las xantofilas están presentes a menudo en las hojas verdes, pero tienen una banda de absorción en la región azul del espectro, que se ve enmascarada por la clorofila. El estrés es el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas y puede ser influenciado por diversos factores afirman Basurto *et al.* [14]. Sin embargo, cuando la planta comienza a agotarse, frecuentemente desaparece la clorofila y la absorción asociada a los otros pigmentos comienza a ser dominante [15].

El uso de la espectroscopía de reflexión difusa se puede presentar como una herramienta para la agricultura de precisión ya que corresponde a aquellas metodologías no destructivas. Se puede establecer una correlación con otras técnicas y de esta forma facilitar que los investigadores puedan utilizarla exitosamente en el monitoreo del suelo o

vegetación como una herramienta de apoyo, evaluación y manejo de la calidad de los cultivos [16].

Para el estudio de imágenes multiespectrales, la *teledetección* es la ciencia y arte de obtener información de un objeto analizando datos adquiridos mediante algún dispositivo que no está en contacto físico con dicho objeto y se basa en la captación mediante un sensor de la radiación electromagnética que procede de la superficie terrestre.

Todo objeto con temperatura superior al cero absoluto radia energía; la cual será proporcional a su calor absoluto. Además, al aumentar la temperatura, esa radiación será más intensa en longitudes de onda más corta. El sensor puede limitarse a captar la energía irradiada por la cubierta, ya sea por reflexión de la energía solar o emisión de esa cubierta, o bien ser capaz de generar un haz energético artificial, que recoja posteriormente, tras su reflexión sobre los objetos estudiados [17].

Existen sensores multiespectrales miniaturizados para embarcar en vehículos aéreos no tripulados. Estos sensores pueden llegar a tomar valores de hasta 6 bandas espectrales, siendo posible seleccionar diferentes bandas mediante el empleo de filtros. Por regla general, estos sensores están diseñados para el estudio de parámetros relativos a la vegetación, por lo que las bandas están seleccionadas en los rangos del verde, rojo e infrarrojo cercano, donde la vegetación presenta su mayor respuesta de absorbancia y reflectancia [18].

Un dispositivo de adquisición de imágenes multiespectrales para fines agropecuarios fue diseñado en el Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológica de la Universidad Carabobo (*CIMBUC*). Las limitaciones para hacer las pruebas que corroboren el adecuado funcionamiento de la cámara plantean la necesidad de recrear el medio agrícola en simuladores ópticos (*phantom*) que permitan la calibración de las cámaras multiespectrales, así como también la evaluación de las variaciones generadas en la firmas espectrales de plantas sometidas a un estrés hídrico producto del déficit de agua.

El presente estudio contribuye a determinar si el método de riego empleado en la plantación es

adecuado. La investigación realizada es de alta pertinencia para el sector agroindustrial.

2. Metodología

2.1. Preparación previa de los simuladores

Para sintetizar simuladores a base de gelatina y agar se empleó una mezcla de ambos sólidos en la proporción adecuada para que la matriz resultante pudiera manipularse con facilidad y se sustituyó el proceso de esterilización en autoclave por la adición de formaldehído, el cual además de ser un agente bactericida, contribuye a la cristalización de la red tridimensional de la gelatina; se adicionó glicerina como agente dispersante.

2.2. Matriz de *phantom*

La metodología empleada para el desarrollo de la matriz fue la siguiente:

- Se pesaron aproximadamente 3 g de gelatina sin sabor y 0,2 g de agar, los valores exactos están en la Tabla 1; posteriormente cada compuesto fue mezclado parcialmente en agua destilada, empleando $30,00 \pm 0,05$ mL y $5,00 \pm 0,05$ mL de agua respectivamente.
- La mezcla gelatina-agua se sometió a calentamiento en una plancha, con agitación constante hasta disolución completa del sólido (evitando la ebullición); la mezcla agar-agua se disolvió en frío.
- Una vez disuelto el sólido, la mezcla se retiró de la plancha y se añadió la solución de agar y $1,50 \pm 0,01$ mL de glicerina.
- Con el fin de inhibir o mitigar el crecimiento bacteriano, se realizó la adición de $1,00 \pm 0,01$ mL de formaldehído a cada medio preparado. Las cantidades exactas de los reactivos empleados está indicada en la Tabla 1.

2.3. Firma espectral del tejido vegetal

Para el estudio y evaluación de la firma espectral del tejido vegetal sano y con estrés hídrico, se emplearon hojas de albahaca (*Ocimum basilicum*);

la prueba se realizó *in vitro* puesto que la planta es muy sensible al estrés y al inducir un déficit hídrico en las mismas, estas mueren en menos de 48 horas.



Figura 1: Hojas verdes y secas de albahaca empleadas para la extracción de pigmentos fotosintéticos

Para el *phantom* de tejido vegetal con estrés hídrico fue necesario inducir la condición en las hojas; para ello se retiraron de la planta tomando como tiempo mínimo una semana antes de la extracción de los pigmentos y se dejaron secar al aire libre. Para el *phantom* de tejido vegetal sano, las hojas se retiraron de la planta el mismo día en que se realizaría la extracción y separación de los pigmentos fotosintéticos, a partir de hojas de albahaca [19] (el proceso está dado en la Figura 1).



Figura 2: Extracción de pigmentos fotosintéticos a partir de hojas de albahaca

Se pesaron $3,0125 \pm 0,0001$ g de hojas de albahaca (secas o verdes sin tallo) cortadas en trozos pequeños y se colocaron en un mortero, como presenta la Figura 2. Seguidamente se añadió etanol al 99,8 % de pureza en tres porciones de $10,00 \pm 0,05$ mL cada una y se homogeneizó el tejido.

La Figura 3 señala que el tejido fue filtrado por gravedad empleando gasa y el extracto se transfirió a tubos de ensayo como indica la Figura 4. Los tubos se introdujeron en una centrífuga a 3000 rpm

Tabla 1: Proporciones de las sustancias empleadas para desarrollar el simulador final.

	Simulador de tejido vegetal sano	Simulador de tejido vegetal con estrés hídrico
Hojas de albahaca (m ± 0,0001)g	3,0207	3,0125
Etanol 99,8 % (V ± 0,05) mL	30,00	30,00
Gelatina sin sabor (m ± 0,0001) g	3,0065	3,0442
Agar (m ± 0,0001) g	0,2004	0,2087
Agua destilada (V ± 0,05) mL	35,00	35,00
Glicerina (V ± 0,01) mL	1,50	1,50
Formaldehído 34 % (V ± 0,01) mL	1,00	1,00



Figura 3: Filtrado del extracto

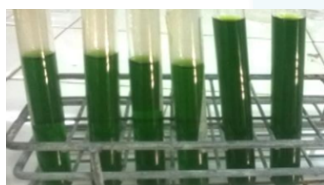


Figura 4: Transferencia a tubos de ensayo para su posterior centrifugación

durante 5 min para separar cualquier residuo del extracto de pigmentos. El procedimiento se realizó por duplicado para obtener así los conjuntos de pigmentos del tejido vegetal sano y con estrés hídrico. Posteriormente, se sometieron a un análisis de espectroscopía UV-Visible, con el fin de obtener la firma espectral asociada.

Previo a la adición del formaldehído y posterior refrigeración, se realizó la inserción de los pigmentos

fotosintéticos correspondientes para recrear en el simulador el comportamiento espectral del tejido vegetal sano y con estrés hídrico. Para ello se añadió el extracto de los pigmentos a la solución de gelatina y agar agitando constantemente para obtener así un medio homogéneo, todo esto se realizó a temperatura y presión ambiental.



Figura 5: Simuladores de tejido vegetal sano y con estrés hídrico

Seguidamente se esterilizaron mediante la adición de formaldehído al 34 % de pureza y refrigeraron en una nevera para que solidificaran como muestra la Figura 5. Por último, los simuladores desarrollados fueron caracterizados mediante espectroscopía de reflectancia difusa para verificar la similitud en las firmas espectrales con respecto al conjunto de pigmentos extraídos.

2.4. Cámara multispectral

Para la presente investigación en el *CIMBUC* fue construida una cámara digital con sensor CMOS de 2 megapíxeles con sistema de iluminación multispectral, compuesta por 8 LED tricromáticos de alto brillo que permiten tener 7 bandas en el rango visible del espectro electromagnético (cian, azul, amarillo, verde, magenta, naranja y rojo) [20]. Con el fin de verificar su adecuado funcionamiento, se realizó el análisis multispectral de los simuladores; lo que corroboraría lo obtenido mediante espectroscopía UV-Visible y espectrofotometría de reflexión difusa (*ERD*).

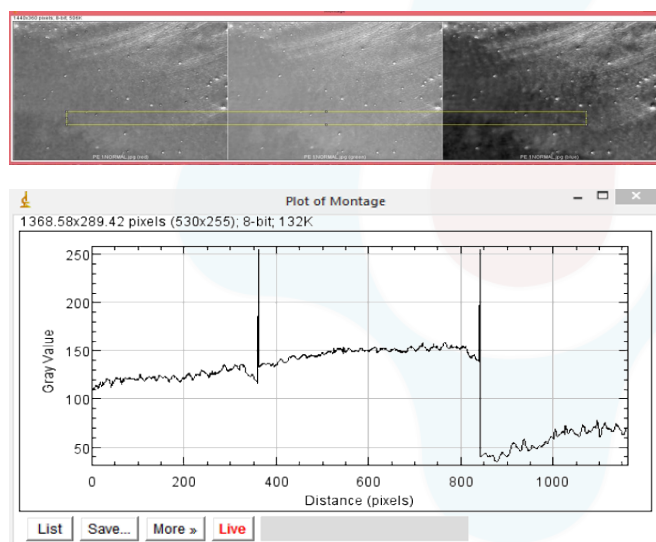


Figura 6: Perfil de intensidades RGB obtenido para una imagen mediante el empleo de ImageJ

Se fotografiaron los simuladores empleando diversos tipos de luz correspondientes a las distintas regiones del espectro electromagnético. Dichas imágenes se sometieron a un análisis de intensidad de color tricromático (RGB) y escala de grises empleando ImageJ (Image Processing and Analysis in Java NIH). Por último, mediante un análisis de perfil de puntos, se obtuvieron las intensidades de color para las bandas del rojo, verde y azul asociadas a cada imagen, según el tipo de luz empleada como indica la Figura 6.

3. Discusión de resultados

3.1. Matriz de *phantom* y simuladores de tejido vegetal

La Figura 7 muestra la matriz de *phantom* obtenida a partir de agar y gelatina. El agar está en menor proporción para favorecer la consistencia y estabilidad del *phantom* a temperatura ambiente; la red tridimensional de la gelatina preparada bajo el procedimiento empleado se traduce en un grado de endurecimiento necesario para que sea resistente al agua y a la temperatura [3].

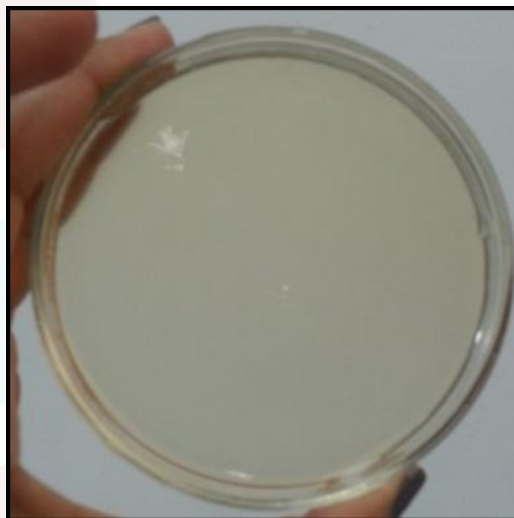


Figura 7: Matriz de *phantom*

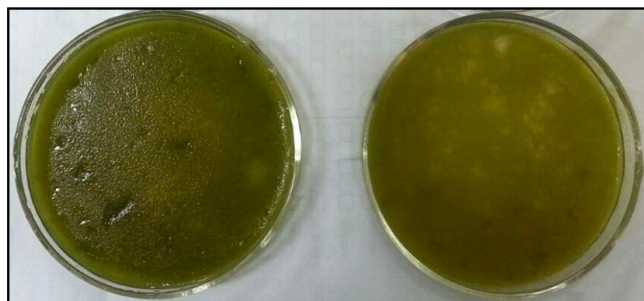


Figura 8: Simulador de tejido vegetal sano (der.) y con estrés hídrico (izq.)

Para inducir la condición de estrés hídrico, las hojas se tomaron de la planta un día antes de efectuar la extracción de pigmentos; las hojas para

el simulador de tejido vegetal sano fueron tomadas el mismo día. La disolución del mismo resultó complicada; ya que, al estar el medio base caliente y el extracto a temperatura ambiente hubo un choque térmico que generó grumos, por lo que los simuladores aunque tenían mejor coloración no eran homogéneos como ilustra la Figura 8.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, la disolución de los pigmentos se llevó a cabo en caliente, lo cual hace inevitable la pérdida de humedad en el medio por lo que los simuladores resultantes tras el proceso de refrigeración presentaron una textura rugosa en su parte superior, la Figura 9 evidencia esta condición.



Figura 9: Simulador de tejido vegetal sano (der.) y con estrés hídrico (izq.), disolución en caliente

Con toda la información recopilada mediante experimentación y tras ajustar las condiciones de trabajo varias veces; se desarrollaron los simuladores finales donde la condición de estrés inducido se prolongó a una semana de exposición y la disolución de los pigmentos se llevó a cabo a temperatura ambiente; para reducir al mínimo la formación de burbujas y tener así un medio lo más homogéneo posible. Lo cual se traduce en simuladores con mejor funcionalidad y que transcurridos más de 15 días luego de la preparación conservarán su estructura física y química.

La Tabla 2 muestra que ambos simuladores representan medios físicos homogéneos, consistentes y flexibles, lo que permite que puedan manipularse sin quebrarse y permanezcan fuera de refrigeración por largos períodos de tiempo sin modificar sus propiedades físicas.

A partir de dichos simuladores y sus respectivos pigmentos se realizó el análisis espectrofotométrico y multispectral correspondiente para evaluar su funcionalidad.

3.2. Análisis multispectral

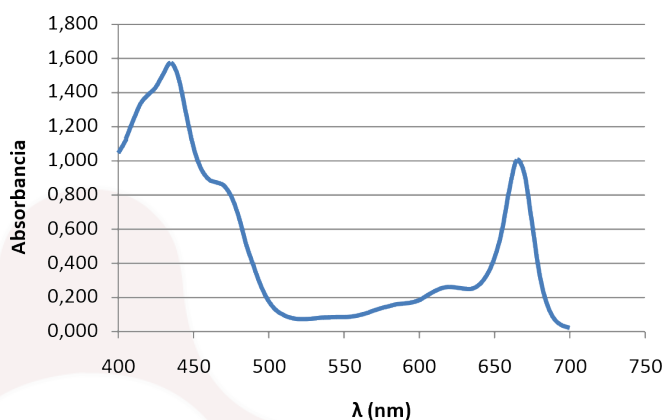


Figura 10: Absorbancia vs. longitud de onda asociada a los pigmentos extraídos del tejido vegetal sano

El primer paso para un análisis multispectral es conocer con exactitud la firma espectral del objeto de estudio [21], para fines de este trabajo se empleó tejido vegetal sano y con estrés hídrico. Puesto que teóricamente se conocen los espectros de absorción UV-Visible de los cromóforos dados en la Figura 10, también llamados pigmentos fotosintéticos de manera individual; se empleó una porción del extracto de pigmentos asociado a cada condición y se determinó su patrón de absorción empleando espectroscopía UV-Visible.

Para el tejido vegetal sano se tienen máximos de absorción en 450 nm (azul) y en 665 nm (rojo), como muestra la Figura 10; si bien todos los cromóforos presentes contribuyen a la absorción total reflejada en el espectro, la misma está determinada por la absorción asociada a las clorofilas, ya que en una planta en estado sano éstas se encuentran en mayor proporción, siendo la clorofila la más abundante [2].

La Figura 11 expone que el tejido con estrés hídrico presenta máximos de absorción en 435 nm (azul) y 665 nm (rojo), al entrar en una condición de estrés la producción de clorofila disminuye y los

Tabla 2: Propiedades físicas de los simuladores desarrollados

Simulador	Características
Tejido vegetal sano	Medio físico de color verde claro, textura lisa, flexible, estable a temperatura ambiente, 9 cm de diámetro y 0,71 mm de espesor.
Tejido vegetal con estrés hídrico	Medio físico de color verde oscuro, textura lisa, flexible, estable a temperatura ambiente, 9 cm de diámetro y 0,76 mm de espesor.

pigmentos que antes se encontraban enmascarados por ésta son los que determinan la absorción [2]; por ello existe un incremento en la absorción en el azul debido a la contribución de la clorofila y la de los carotenos, mientras que en el rojo hay una disminución de la absorción debido al menor contenido de clorofila de la planta.

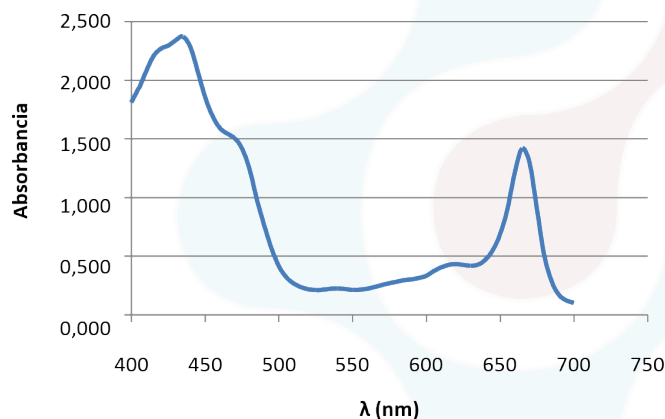


Figura 11: Absorbancia vs. longitud de onda asociada a los pigmentos extraídos del tejido vegetal con estrés hídrico

Posteriormente, los simuladores desarrollados fueron evaluados mediante espectrofotometría de reflexión difusa, como punto de partida para comprobar su funcionalidad.

El tejido vegetal sano muestra mínimos de reflectancia que corresponden a los máximos de absorbancia obtenidos mediante espectroscopía UV-Visible. La Figura 12 revela una baja absorción en las longitudes de onda correspondientes al verde, lo cual según Hernández y Montaner [21] determina un máximo de reflectancia en dichas longitudes de onda lo que hace que percibamos visualmente la vegetación sana de color verde.

De igual forma para el tejido vegetal estresado los mínimos de reflectancia corresponden a los máximos

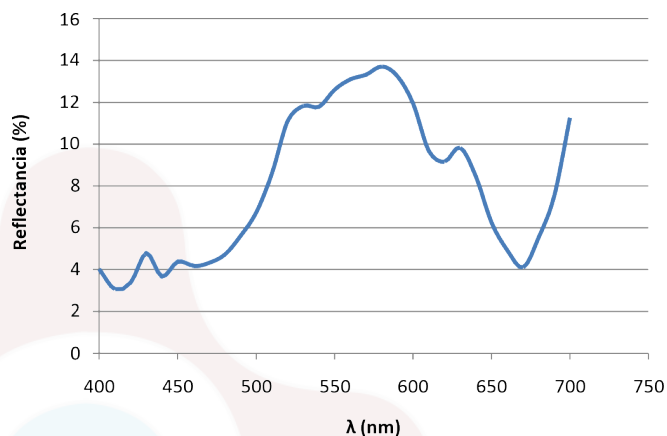


Figura 12: Reflectancia vs. longitud de onda asociada al simulador de tejido vegetal sano

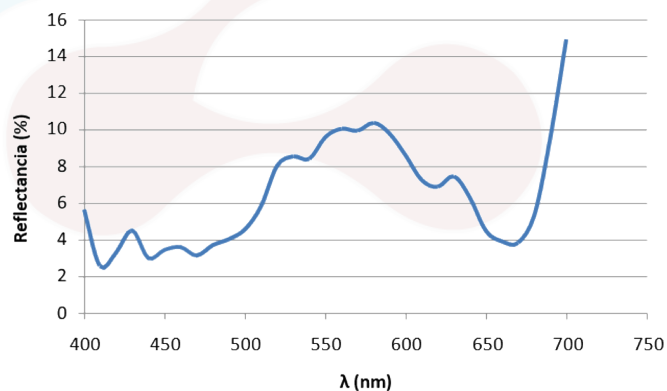


Figura 13: Reflectancia vs. longitud de onda asociada al simulador de tejido vegetal estresado

de absorción UV-Visible en la Figura 13, la baja reflectancia en las longitudes de onda del verde se atribuye a la disminución del contenido de clorofila en la planta producto de la condición de estrés inducido [21].

Una estimación de la absorción en cada simulador a partir de su patrón de reflectancia, haciendo uso de

la densidad óptica fue realizada para constatar que sus componentes y su estructura física no alteran significativamente la absorción UV-Visible.

Las Figuras 12 y 13 muestran en ambos casos que el máximo de absorción correspondiente al rojo es el más definido y concuerda con lo obtenido para los pigmentos de manera individual, la absorción en la banda del azul no está bien definida, puesto que las medidas de reflectancia son sensibles a la estructura del simulador y a la textura del mismo, por lo que al tener ruido instrumental en las medidas de reflectancia, se arrastra ese error a las medidas de absorbancia que se derivan de ésta. Sin embargo, es posible notar un incremento en la absorción en esta región del espectro, de acuerdo a las Figuras 14 y 15. Ambos espectros de absorción tienen un comportamiento similar al de los pigmentos fotosintéticos y la absorción para el tejido vegetal sano sigue estando determinada por las clorofilas, mientras que para el tejido vegetal estresado predomina la absorción por carotenos [2].

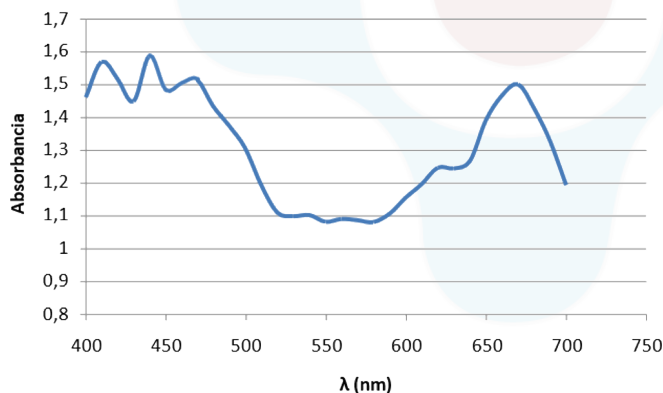


Figura 14: Absorbancia vs. longitud de onda asociada al simulador de tejido vegetal sano

La intensidad de color está directamente relacionada con la reflectancia que presenta el objeto de estudio, tanto para el tejido vegetal sano como para el que presenta estrés hídrico, es apreciable que para todos los tipos de luz empleados las intensidades aumentan considerablemente en las bandas donde la reflectancia es mayor según el color o la combinación de colores empleados; afirmación que puede ser comprobada en el análisis tricromático dado en la Figura 16.

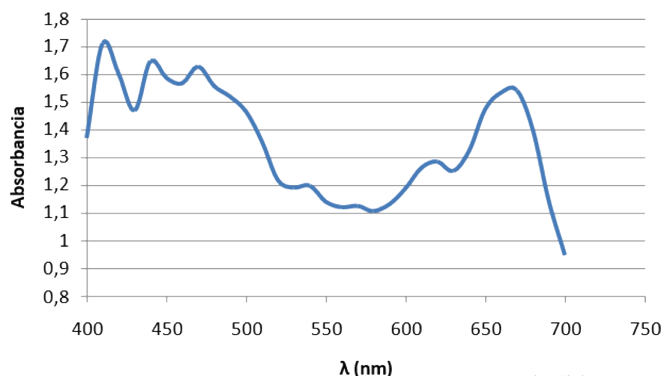


Figura 15: Absorbancia vs. longitud de onda asociada al simulador de tejido vegetal con estrés hídrico

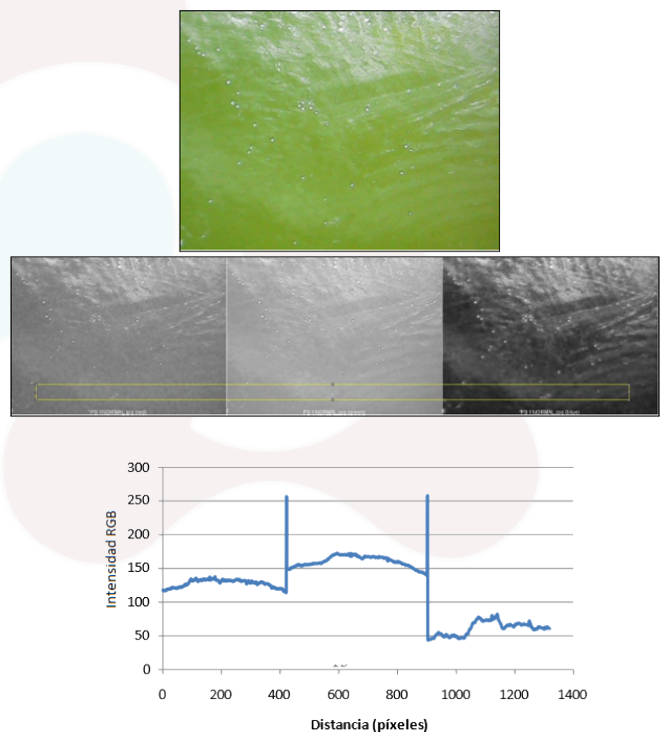


Figura 16: Análisis tricromático en escala de grises para la imagen del simulador de tejido vegetal sano empleando luz blanca

3.3. Firma espectral

Al tomar como punto de partida que el análisis multispectral de imágenes requiere contar con firmas espectrales de referencia [21] y puesto que la vegetación constituye en sí una variable compleja,

porque tiene un comportamiento dinámico debido a los cambios fenológicos que ocurren estacionalmente, lo que significa que su firma espectral cambia durante el año [21], los *phantoms* fueron desarrollados para que permitieran simular ópticamente las propiedades del tejido vegetal sano y con estrés hídrico para calibrar una cámara multispectral.

Todo esto teniendo en cuenta que los *phantoms* son diseñados con unas características acordes a su propósito o aplicación específica [3]. En este caso el requerimiento es contar con medios homogéneos, maleables, estables a temperatura ambiente y cuya durabilidad se prolongara a más de 15 días, lo que facilitará su estudio y análisis empleando diversas técnicas.

El comportamiento distintivo de cada tipo de material es aprovechado en procesos de clasificación de imágenes, siendo común referirse a dicho comportamiento como *firma espectral* [21]. La respuesta espectral de la vegetación está caracterizada por el papel fundamental que desempeñan los pigmentos de la hoja en la absorción de la energía. De ellos, el pigmento más importante es la clorofila y puesto que en condiciones de estrés su cantidad en la planta disminuye, esta variable permite monitorear el estrés vegetal [2].

Las Figuras 10 y 11 confirmaron que al determinar la firma espectral del tejido vegetal sano y con estrés hídrico, los máximos de absorción corresponden a las longitudes de onda del azul (400–500) nm y el rojo (600–700) nm, en el caso de la vegetación sana la absorción está determinada por las clorofilas ya que se encuentran en mayor proporción. Las mismas absorben energía luminosa debido a su estructura, la cual consta de un anillo tetrapirrólico con centro metálico de magnesio [22], provisto de una conjugación de enlaces sencillos y dobles que le permiten la deslocalización de carga electrónica mediante estructuras de resonancia.

Al entrar en una condición de estrés hídrico la producción de clorofila en la planta disminuye y los pigmentos llamados carotenoides son los que determinan la absorción debido a que ya no son enmascarados por las clorofilas [23]. Por ello, la absorción aumenta en la banda del azul y disminuye en la banda del rojo, ya que la absorción resultante es producto de la contribución de los carotenos y la baja concentración de clorofila presente en la planta.

Una vez desarrollados los simuladores fueron evaluados mediante ERD, debido a que contar con patrones de reflectancia espectral de referencia es fundamental para lograr resultados confiables cuando se trabaja con imágenes multispectrales [21]. El resultado obtenido para ambos simuladores es que los máximos de absorción UV-Visible generan mínimos de reflectancia y viceversa; para el simulador de tejido vegetal sano el máximo de reflectancia en la longitud de onda del verde dado en la Figura 12 es mayor al obtenido para el simulador de tejido vegetal estresado presentado en la Figura 13 como consecuencia de que la reflectancia está relacionada con la clorofila contenida en la planta y además depende del estado hídrico de la misma [21].

La Figura 13 confirma que cuando una planta está sometida a una tensión hídrica, disminuye la producción de clorofila y la planta absorbe menos energía en las regiones típicas de absorción por clorofila, aumentando la energía reflejada especialmente en la región del rojo, lo que les proporciona una apariencia amarillenta o clorótica. Esto representa un buen indicativo de la disminución del contenido de agua en la planta, pese a no contar con métodos de análisis infrarrojo que permitirían evaluar de manera más eficaz, dicha respuesta.

Los espectros de absorción de ambos simuladores con respecto a los pigmentos mostrados en las Figuras 14 y 15 difieren en los máximos de absorción en las longitudes de onda del azul. Puesto que dichos espectros se obtienen mediante una estimación realizada a partir de los valores de reflectancia obtenidos para cada simulador, empleando la densidad óptica del material.

Puesto que los espectros de reflectancia presentan ruido, debido a que el método de análisis es sensible a la textura y estructura del simulador, por lo que cualquier burbuja generará errores en las mediciones; en la metodología empleada se redujo al mínimo la cantidad de burbujas contenidas en los simuladores pero no fue posible mitigar por completo su formación. Adicionalmente dicha estimación depende del espesor del medio y los simuladores resultantes poseen espesores diferentes, ya que la cantidad de extracto obtenido a partir de hojas verdes es diferente al de las hojas que se sometieron a una tensión hídrica.

Por último, para completar la evaluación de la funcionalidad de los simuladores, se realizó el análisis tricromático (RGB) y en escala de grises para las imágenes tomadas a partir de la incidencia sobre los simuladores de 8 tipos de luz diferentes (blanca, roja, verde, azul, naranja, amarilla, cian y magenta); con la finalidad de evaluar los perfiles de intensidad de color para cada uno.

La interacción con la radiación electromagnética ocurre distintamente para cada longitud de onda del espectro [6]; debido a los pigmentos presentes en la misma y las proporciones de éstos. Es por ello que al comparar los perfiles de intensidades con los espectros de absorbancia y reflectancia es notable que la intensidad del color es inversamente proporcional a la absorción, por ende directamente proporcional a la reflectancia del objeto en estudio.

Es fácilmente apreciable que para ambos simuladores se cumple que la intensidad del color aumenta conforme aumenta la reflectancia de las bandas características de cada simulador, según la luz empleada. Puesto que para los colores primarios rojo, verde y azul, sus perfiles de intensidad presentan valores máximos en las bandas que cada uno de ellos refleja; mientras que para los colores secundarios, como provienen de combinaciones, en el caso del magenta que se compone de rojo y azul, tiene valores máximos de intensidad en ambas bandas.

Todo esto tiene consonancia con lo observado mediante espectrofotometría, ya que como se mencionó, un tejido vegetal sano presenta mayor reflectancia en las longitudes de onda de verde por su elevado contenido de clorofila y al entrar en una condición de estrés hídrico el contenido de ésta disminuye, lo que se traduce en un aumento significativo de la reflectancia en la banda asociada al color rojo; para el color azul el incremento es menor debido a que la reflectancia no varía significativamente de un tejido a otro en este punto.

Los simuladores desarrollados constituyen una alternativa al análisis *in vivo* en plantas y un medio homogéneo que funciona para calibrar equipos empleados en teledetección y mapeo de vegetación. De esta forma se llegó a la solución del problema planteado en esta investigación, puesto se corroboró el adecuado funcionamiento de la cámara multispectral construida en el *CIMBUC* y por lo tanto

puede validarse su funcionalidad en la calibración de este tipo de equipos.

4. Conclusiones

En este trabajo, un simulador base fue desarrollado con las características físicas, químicas y microbiológicas necesarias para ser empleado en diversos métodos de análisis. Las propiedades ópticas de la albahaca (*Ocimum basilicum*) fueron evaluadas mediante espectroscopía UV-Visible, empleando los pigmentos extraídos de hojas sanas y con estrés hídrico. Los resultados evidencian que existe un aumento notable de la reflectancia en la banda del rojo para el tejido vegetal estresado, pese a que no se disponía de técnicas de caracterización infrarroja, esto es un buen indicativo de que el estrés inducido generó pérdidas del contenido de agua de las hojas. Mediante análisis de intensidades RGB en escala de grises fue posible verificar los resultados obtenidos espectrofotométricamente, así como establecer diferencias entre los tejidos en estudio.

Referencias

- [1] A. Benavides M., editor. *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buena Vista, Saltillo, COAH, México, 2002.
- [2] C. Alonso, V. Moreno y E. Rodríguez. Determinación experimental de la firma espectral de la vegetación. Una sencilla práctica de introducción a la teledetección. En S. Castaño F. y A. Quintanilla R., editores, *Teledetección. Avances y aplicaciones. VIII Congreso nacional de teledetección*, páginas 429–432, Albacete, España, 1999.
- [3] M.A. Santander C. *Desarrollo y caracterización de simuladores de tejidos biológicos para la calibración de equipos OCT*. Universidad de Cantabria, España, 2015.
- [4] C.F. Rivas y O. Nuñez. Evaluación de la degradación fotocatalítica del p-nitrofenol sobre la superficie modificada del TiO₂ con

- benzaldehídos disustituidos. *Catálisis*, 1:31–41, 2012.
- [5] CIMA. Parque Nacional Cordillera Azul, diagnóstico del proceso de actualización. Plan maestro 2011-2016, Centro de Conservación, Investigación y Manejo de Áreas Naturales (CIMA), Lima, Perú, 2011.
- [6] J. Lira C. *Tratamiento digital de imágenes multiespectrales*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, 2012.
- [7] E. Chuvieco. Mirar desde el espacio o mirar hacia otro lado: Tendencias en teledetección y su situación en la geografía española. *Documents d'Anàlisi Geogràfica*, 50:75–85, 2007.
- [8] N. Duque. Desarrollo y caracterización de simuladores de tejido vegetal sano y con estrés hídrico para la calibración de una cámara multiespectral. Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciado en Química. Tutor A. Muñoz Morales, Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela, abril 2018.
- [9] T. Toderas, T. Crăcea, and A. Negoescu. Landsat Multispectral Images in Analysing Forest Vegetation. *Revista Academiei Fohelor Terrestre NR.2*, 78:243–250, 2015.
- [10] A.I. Farrer, H. Odéen, J. de Bever, B. Coats, D.L. Parker, A. Payne, and D.A. Christensen. Characterization and Evaluation of Tissue Mimicking Phantoms of Gelatin for Use with MRgFUS. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, 3(9):1–11, 2015.
- [11] N. Atkinson and P. Urwin. The Interaction of Plant Biotic and Abiotic Stresses: From Genes to the Field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10):3532–3543, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>.
- [12] N. Hungr, J-A. Long, V. Beix, and J. Troccaz. A Realistic Deformable Prostate Phantom for Multi-Modal Imaging and Needle-Insertion Procedures. *Medical Physics*, 39(4):2031–2041, 2012.
- [13] B.W. Pogue and M.S. Patterson. Review of Tissue Simulating Phantoms for Optical Spectroscopy, Imaging and Dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*, 11(4):041102(1–16), 2006. <https://doi.org/10.1117/1.2335429>.
- [14] M. Basurto S., A. Nuñez B., R. Pérez L.R. y O.A. Hernández R. Fisiología del estrés ambiental en plantas. *Synthesis*, 48:1–5, 2008.
- [15] J. Meliá M. *La teledetección en el seguimiento de los fenómenos naturales. Recursos renovables: Agricultura*. Curso de Postgrado. Unidad de Teledetección, Departamento de Termodinámica, Estudios Generales, Universidad de Valencia, Valencia, España, 1991.
- [16] C. Chang, D. Laird, M. Mausbach, and C. Hurburgh. Near Infrared Reflectance Spectroscopy-Principal Components Regression Analyses of Soil Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 65:480–490, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2136/soilaj2001.652480x>.
- [17] I. Basterra. Teledetección–imágenes satelitales, procesamiento digital de imágenes. Manual de cátedra. Módulo 3. Cátedra de Fotointerpretación, Departamento de Geociencias, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Nordeste, Chaco, Argentina, 2011.
- [18] J.J. Díaz G.-C. Estudio de índices de vegetación a partir de imágenes aéreas tomadas desde UAS/RPAS y aplicaciones de estos a la agricultura de precisión. Trabajo fin de Máster, Facultad de Geografía e Historia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, junio 2015.
- [19] A. Armado. *Bioquímica, guía de prácticas*. Práctica 2. Determinación de los componentes celulares en hojas de espinaca. Departamento de Química, FACYT, Valencia, Venezuela, 2008.
- [20] A. Muñoz M. y S. Vivas T. Implementación de sistema de captura de imágenes multiespectra-

les para el análisis de la piel humana. *Faraute*, 9(1):1–2, 2014.

- [21] J. Hernández P. y D. Montaner, F. *Laboratorio de geomántica y ecología de paisajes*. Capítulo: Patrones de respuesta espectral. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 2009.
- [22] H. Torres, H. Carminatti y C. Cardini. *Bioquímica general*. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1983.
- [23] H. Curtis, N. Sue B., A. Schnek y A. Massarini. *Biología*. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 7ma edición, 2007.

