

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Evaluación de la correlación entre imágenes espectrales de especies vegetales con su composición en polifenoles

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímico
Farmacéutico

Autoras:

María Eugenia Pacheco Sagbay

eugenia199906_@hotmail.com

CI: 0107688681

Ana Paulina Urgilés Feicán

a.paulinaurgiles26@gmail.com

CI: 0105472856

Tutora:

Silvia Johana Ortiz Ulloa

CI: 0301082897

Cuenca, Ecuador

19-octubre-2022

RESUMEN

En la actualidad existe poca información sobre la relación de imágenes multiespectrales de plantas medicinales con su composición química, en especial en asociación al metabolismo secundario. Es por esto que, el presente estudio se realizó con la finalidad de explorar las posibles asociaciones entre las imágenes multiespectrales de una especie vegetal con los compuestos formados durante su metabolismo secundario, particularmente polifenoles, lo que podría servir como base para el desarrollo de un modelo predictivo. Para esto se utilizaron técnicas bioquímicas y espectrales con el fin de detectar, identificar y cuantificar los polifenoles presentes en la planta *Jungia rugosa*. La obtención del extracto se realizó en fresco por percolación con metanol. Los polifenoles fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para su separación e identificación; y por Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido total. Para la obtención de las imágenes multiespectrales se utilizó una cámara multiespectral Sequoia ® provista por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Las fotos fueron tomadas a nivel de campo, en el lugar de crecimiento de la planta de estudio (Biblián, San José Raranga y El Cajas), la cual estuvo expuesta directamente a la radiación solar para garantizar el correcto funcionamiento de la cámara. Posteriormente, las plantas fueron recolectadas y transportadas al laboratorio para el análisis bioquímico, en donde también se realizó una segunda toma de imágenes. La posible correlación entre la determinación bioquímica e imágenes espectrales se evaluó mediante el análisis de regresión lineal. Los resultados sugieren que existe una correlación directa entre estos dos métodos analizados, siendo más significativo en los lugares de San José de Raranga y El Cajas, siendo menor el grado de correlación en Biblián. En base a los resultados se concluye que existe una relación entre el análisis de imágenes multiespectrales de plantas con su comportamiento fisiológico, pudiendo ser promisorio el desarrollo de un modelo predictivo de la composición de polifenoles en especies vegetales mediante la toma de imágenes multiespectrales.

Palabras claves: (ej.) *Jungia rugosa*. Polifenoles. Imágenes multiespectrales.

ABSTRACT

Currently there is little information about the relationship of multispectral images of medicinal plants with their chemical composition, especially in association with secondary metabolism. For this reason, the present study was carried out with the purpose of exploring the possible associations between multispectral images of a plant species with the compounds formed during its secondary metabolism, particularly polyphenols, which could serve as a basis for the development of a predictive model. For this, biochemical and spectral techniques were used in order to detect, identify and quantify polyphenols in *Jungia rugosa*. The extract was obtained fresh by percolation with methanol. Polyphenols were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) for their separation and identification; and by Folin-Ciocalteu for the determination of the total content. To obtain the multispectral images, a Sequoia ® multispectral camera provided by the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Cuenca was used. The photos were taken at field, in the place of growth of the study plant (Biblián, San José Raranga and El Cajas), which was directly exposed to solar radiation to guarantee the correct functioning of the camera. Subsequently, the plants were collected and transported to the laboratory for biochemical analysis, where a second image was taken. The possible correlation between biochemical determination and spectral images was evaluated by linear regression analysis. The results suggest that there is a direct correlation between these two analyzed methods, being more significant in the places of San José de Raranga and El Cajas. The correlation is lower in Biblián. Based on the results, it is concluded that there is a relationship between the analysis of multispectral images of plants with their physiological behavior, and the development of a predictive model of polyphenol composition in plant species by taking multispectral images may be promising.

Keywords: *Jungia rugosa*. Polyphenols. Multispectral imaging.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIA	13
DEDICATORIA	14
AGRADECIMIENTO	15
INTRODUCCIÓN	16
Objetivo general:	17
Objetivos específicos:	17
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. Fundamentos de la técnica multiespectral	18
1.1.1. Radiación electromagnética	18
1.1.2. Espectrómetros de imagen	19
1.1.3. Aplicaciones de los espectrómetros de imagen	19
1.2. Imágenes multiespectrales	20
1.2.1. Ventajas y desventajas de la técnica	21
1.2.2. Índices de vegetación	22
1.3. Relación con la caracterización de metabolitos secundarios	23
1.4. Relación con la fotosíntesis	24
1.5. Rutas metabólicas de las plantas	25
1.5.1. Compuestos fenólicos	26
1.5.1.1. Clasificación de los compuestos fenólicos	27
1.6. <i>Jungia rugosa</i>	29
2. METODOLOGÍA	30
2.1. Tipo de diseño de investigación:	30
2.2. Áreas de estudio y muestreo	30
2.3. Análisis químico	30
2.3.1. Materiales, reactivos y equipos	30
2.3.2. Pretratamiento de muestras	31
2.3.3. Obtención de extractos vegetales	31
2.3.4. Metodología para calcular el rendimiento del extracto	33
2.3.5. Determinación de polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu)	34
2.3.5.1. Fundamento	34

2.3.5.2. Procedimiento	34
2.3.6. Análisis de polifenoles por HPLC-DAD	35
2.3.6.1. Fundamento	35
2.3.6.2. Preparación de la muestra	35
2.3.6.3. Procedimiento	35
2.4. Imágenes multiespectrales	36
2.4.1. Fundamento	36
2.4.2. Procedimiento	37
2.5. Análisis de datos	38
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1. Rendimiento del extracto	40
3.2. Análisis de polifenoles totales	40
3.3. Análisis de polifenoles por HPLC	41
3.4. Imágenes multiespectrales	42
3.5. Análisis de la correlación entre imágenes espectrales y métodos de laboratorio	45
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
4.1. Conclusiones	48
4.2. Recomendaciones	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu	58
Anexo 2. Curvas de calibración para el análisis de polifenoles mediante HPLC	59
Anexo 3. Protocolo de funcionamiento de la cámara	60
Anexo 4. Datos del rendimiento del extracto	62
Anexo 5. Resultados de fenoles totales obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu	63
Anexo 6. Datos de resultados de distintos polifenoles obtenidos por HPLC	64
Anexo 7. Test de correlación de Pearson	65
Anexo 8. Datos obtenidos mediante matrices de comparación y regresiones lineales múltiples	67
Anexo 9. Análisis de residuos: Muestra de El Cajas a nivel del campo	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de índices de vegetación.	22
Tabla 2. Coordenadas de los lugares de recolección de la planta de estudio.	30
Tabla 3. Bandas espectrales obtenidas por la cámara cámara multiespectral Sequoia.	36
Tabla 4. Promedio de contenido de fenoles totales en las muestras analizadas	40
Tabla 5. Contenido de ácido neoclorogénico, clorogénico, criptoclorogénico y ferúlico en las muestras de la planta <i>Jungia rugosa</i> obtenidos por HPLC-DAD.	41
Tabla 6. Resultados de correlación entre imágenes espectrales y métodos de laboratorio.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro electromagnético.	18
Figura 2. Onda electromagnética cuyos campos E y B oscilan perpendicularmente uno respecto del otro.	19
Figura 3. A) Percoladores cargados con la muestra. B) Primera fracción del extracto metanólico	32
Figura 4. Extracción del metanol en el rotavapor	33
Figura 5. Secado del extracto metanólico mediante nitrógeno	33
Figura 6. Tubo con extracto previo a la congelación.	33
Figura 7. Cámara multiespectral Sequoia.	36
Figura 8. Calibración y captura de imágenes. A) Calibración de la cámara. B) Toma de imágenes de las hojas de <i>Jungia rugosa</i> .	37
Figura 9. Análisis de correlación de la reflectancia entre las bandas espectrales RED, REG, GREEN, NIR.	43
Figura 10. Análisis de correlación de la reflectancia según las bandas espectrales b1_RGB, b2_RGB, b3_RGB.	43
Figura 11. Análisis de correlación de la reflectancia en distintos lugares de muestreo.	44
Figura 12. Calibración del equipo	61

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, María Eugenia Pacheco Sagbay en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la correlación entre imágenes espectrales de especies vegetales con su composición en polifenoles", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 19 de octubre de 2022.



María Eugenia Pacheco Sagbay

C.I: 0107688681

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, María Eugenia Pacheco Sagbay autora del trabajo de titulación "Evaluación de la correlación entre imágenes espectrales de especies vegetales con su composición en polifenoles", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 19 de octubre de 2022.



María Eugenia Pacheco Sagbay

C.I: 0107688681

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Ana Paulina Urgilés Feicán, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Evaluación de la correlación entre imágenes espectrales de especies vegetales con su composición en polifenoles**" de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 19 de octubre de 2022.



Ana Paulina Urgilés Feicán

C.I: 0105472856

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Ana Paulina Urgilés Feicán autora del trabajo de titulación "**Evaluación de la correlación entre imágenes espectrales de especies vegetales con su composición en polifenoles**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 19 de octubre de 2022.



Ana Paulina Urgilés Feicán

C.I: 0105472856

DEDICATORIA

A Dios, por darme fortaleza y valentía a lo largo de esta etapa.

A mi madre, por todo el esfuerzo y apoyo brindado durante toda mi vida.

A mi tío, Santiago, por ser como un padre para mí, y por su apoyo incondicional.

María Eugenia Pacheco Sagbay

DEDICATORIA

A Dios por guiar mi camino

Con amor y gratitud a mis padres, por su apoyo incondicional

Ana Paulina Urgilés Feicán

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la Dra. Johana Ortiz, directora de este trabajo de titulación,
por guiarnos y brindarnos su conocimiento.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias con su unidad de Geomática, de manera
especial a: Ing. Eduardo Tacuri, Ing. Mateo López, Ing. Luis Medina, por su
colaboración.

Al departamento de Biociencias, por orientarnos en el proceso de obtención de datos de
nuestro estudio.

A nuestros asesores, al Ing. Aleksandr Khachatryan por ayudarnos con el análisis
estadístico y al Dr. Fabián León por dirigirnos en el proceso experimental.

María Eugenia y Paulina

INTRODUCCIÓN

La investigación sobre la composición de extractos de especies vegetales resulta muy útil para desarrollar conocimiento sobre los beneficios que diversas plantas ofrecen como potenciales fármacos, nutraceuticos y bioproductos con diversas aplicaciones (Kiani, van Ruth, Minaei, & Ghasemi, 2018). Desde la antigüedad, las plantas han sido ampliamente utilizadas a pequeña y gran escala con el fin de desarrollar nuevos productos en base a su bioactividad. Explorar nuevas técnicas para caracterizar de una manera rápida la composición química de distintas especies medicinales es muy importante porque permitiría optimizar recursos y seleccionar mejor las muestras vegetales. Aunque en la última década, la literatura científica sobre la aplicación de la técnica de imágenes multiespectrales ha aumentado principalmente en países desarrollados, la información sobre el estudio de las vías del metabolismo secundario de plantas medicinales con esta técnica es escasa (Camacho, et, al., 2015).

El análisis de imágenes multiespectrales es considerado como una técnica que permite una evaluación rápida de la calidad de las plantas, no destructiva y sin contacto que combina imágenes y espectroscopía proveyendo información espectral y física de las plantas a analizar. Además, dicha técnica presenta varias ventajas frente a otros métodos tales como la facilidad de proporcionar información espectral detallada sobre toda la planta o de una parte específica, por lo que es posible realizar un análisis sofisticado y un seguimiento general (Choi, Heo, Bae, Kim, y Moon, 2020). También cuenta con un menor grado de complejidad para el analista, por ejemplo, en la toma y preparación de las muestras, análisis, costos y otros recursos necesarios para llevar a cabo esta técnica (Kiani et al., 2018).

El presente estudio se realizó con la finalidad de explorar la relación entre la técnica de imágenes multiespectrales y los metabolitos secundarios producidos por especies vegetales, específicamente polifenoles en planta *Jungia rugosa*.

Los objetivos de este trabajo de titulación fueron:

Objetivo general:

- Establecer una relación entre el análisis de imágenes multiespectrales de plantas con su comportamiento fisiológico, y de esta manera predecir su composición química.

Objetivos específicos:

- Determinar el contenido de polifenoles de la planta de estudio *Jungia rugosa*.
- Evaluar la asociación entre los resultados obtenidos mediante el uso de imágenes multiespectrales con el contenido de polifenoles en la planta de estudio.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Fundamentos de la técnica multispectral

1.1.1. Radiación electromagnética

La radiación electromagnética es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes perpendiculares entre sí, que se propaga a través del espacio transportando energía de un lugar a otro. El espectro electromagnético (Figura 1) se extiende desde la radiación de menor longitud de onda como los rayos gamma y los rayos X, pasando por la luz ultravioleta, la luz visible y los rayos infrarrojos hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud tales como las ondas de radio (Ivorra-Martínez, 2015).

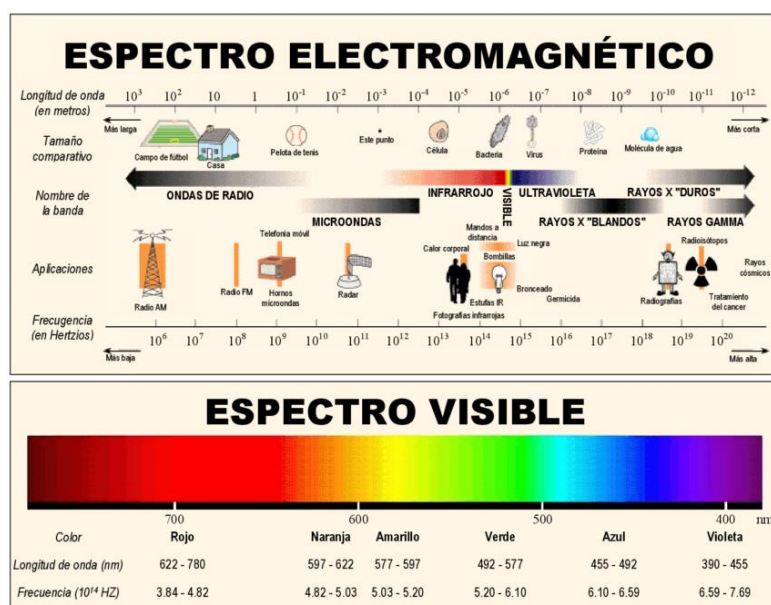


Figura 1. Espectro electromagnético. Fuente (Ivorra-Martínez, 2015).

La radiación electromagnética se comporta como una onda de energía compuesta por un campo eléctrico E y otro magnético B (Figura 2), ambos oscilando en direcciones perpendiculares (Valdiviezo-Navarro, 2007).

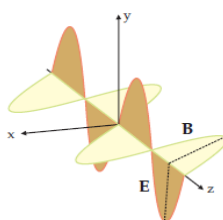


Figura 2. Onda electromagnética cuyos campos E y B oscilan perpendicularmente uno respecto del otro. Fuente: (Valdiviezo-Navarro, 2007).

1.1.2. Espectrómetros de imagen

Los espectrómetros de imagen son equipos que permiten la formación de la imagen según las características espectrales de un objeto en cada elemento de la imagen (pixel). Este tipo de instrumentos poseen un mecanismo de barrido para captar la luz sobre el campo de visión en una escena determinada (Valdiviezo-Navarro, 2007).

La resolución espectral es la capacidad que posee un sensor para diferenciar múltiples rangos espectrales (bandas) o porciones del espectro electromagnético. Esta capacidad está relacionada con las características del sensor y está restringida por las zonas de absorción de la atmósfera y hace referencia al número de bandas espectrales que puede diferenciar el sensor, así como al ancho que éstas poseen. A mayor resolución espectral, más provechosa será la información que pueda ser inferida (Kharuf, 2018). Es posible diferenciar entre imágenes multispectrales e hiperespectrales según el ancho de cada banda y del número de bandas colectadas. De esta manera, si el espectro colectado consiste en múltiples bandas espectralmente anchas y separadas, los datos se denominan multispectrales. Por otra parte, si el espectro consiste en bandas estrechas y continuas, entonces los datos son hiperespectrales (Valdiviezo-Navarro, 2007).

La reflectancia espectral es la relación entre la energía electromagnética reflejada y el incidente según la longitud de onda. Los materiales de la superficie terrestre poseen características variables de reflectancia espectral. Según la reflectancia espectral, será el color o tono de la imagen de un cuerpo determinado dentro de la gama visible, a lo que se adiciona su reflectancia a otras longitudes de onda fuera del espectro visible (Kharuf, 2018).

1.1.3. Aplicaciones de los espectrómetros de imagen

El interés creciente en las tecnologías de detección óptica para plantas inicia debido a que las características de reflectancia de la luz brindan una visión profunda de la composición y estructura de cada objeto del planeta. La materia refleja o absorbe la luz según su longitud de onda. En consecuencia, un objeto tiene un patrón de interacción característico con la radiación entrante y presenta espectros de reflexión, absorbancia y transmisión de

la luz. Los seres humanos pueden reconocer la parte visual de la luz (400-700 nm) y de esta forma distinguir entre diferentes colores y características materiales como rugosidad, solidez y composición. Las plantas muestran una gran diversidad de colores producidos por los fotopigmentos (antocianinas, xantofilas, carotenoides y clorofila). Estos pueden convertir la energía de la luz y proteger las plantas contra la radiación ultravioleta A y B (280-380 nm) (Mahlein et al., 2018).

1.2. Imágenes multiespectrales

La teledetección es una técnica que permite monitorear la superficie terrestre empleando satélites o aeronaves que registran la radiación electromagnética reflejada o emitida por los objetos. Esto hace posible capturar imágenes en múltiples regiones espectrales que abarcan múltiples bandas en las gamas visible e infrarroja. Estas bandas reflectadas dependen de la propiedad del material, la rugosidad de la superficie, el ángulo de incidencia, la intensidad y la longitud de onda (Kharuf, 2018).

El uso de sensores remotos permite la extracción de información de un objeto a distancia, utilizando los datos adquiridos por un sensor que no requiere el contacto físico con el objeto de análisis. En sus inicios, el sensado remoto fue realizado utilizando globos aerostáticos o aviones para tomar fotografías. Se diseñaron los primeros satélites artificiales para capturar fotografías aéreas. Posteriormente, los avances fueron complementados con la adaptación de espectrómetros en plataformas satelitales. A partir de esto, el sensado remoto comenzó a aplicarse en la agricultura (Valdiviezo-Navarro, 2007).

Un sensor remoto es un aparato que capta imágenes a distancia, sin encontrarse en contacto directo con el objeto, y que es transportado en una plataforma. Puede reunir información para diferentes regiones del espectro y cada una de estas regiones se denomina canal o banda (Chuvieco, 2000).

Los nuevos sensores hiperespectrales de alta resolución espectral, con anchos de banda inferiores al nanómetro, permiten obtener información de más de 250 bandas espectrales en la región visible e infrarroja, aumentando potencialmente las aplicaciones de la teledetección en agricultura (Calderón, Navas, Zarco, & Landa, 2018). Mientras que un satélite de teledetección con un sensor multiespectral recoge información entre 3 y 7

bandas de unos 100 nm de ancho. Sin embargo, hay satélites que producen imágenes multispectrales que tienen unas 10 o 15 bandas (Roman-Gonzalez, Vargas-Cuentas, & Vargas, 2013).

El análisis de imágenes multispectrales es considerado como un área de investigación activa. Con la aparición de sistemas comerciales aerotransportados y el lanzamiento de satélites, estas imágenes se han convertido en una herramienta importante para la observación remota (Valdiviezo-Navarro, 2007).

La técnica de análisis mediante imágenes multispectrales puede utilizarse para demostrar la variedad de compuestos en muestras no homogéneas mediante el uso de mapas de distribución. Por lo tanto, esta técnica permite apreciar el contenido de varios componentes en alimentos y productos agrícolas, tales como la humedad en semillas de pepino, azúcar y nitrógeno en plantas forrajeras, fibra dietética en apio y proteína en trigo; clorofila en hojas de plantas de té y el contenido de agua en té verde procesado (Wang et. al., 2021).

1.2.1. Ventajas y desventajas de la técnica de imágenes multispectrales

Las técnicas de imágenes multispectrales ayudan a la medición rápida de imágenes espectrales de alta resolución espacial que permiten recuperar la reflectancia de un objeto, o la señal de color combinada en cada píxel de la imagen (López-Álvarez, Hernández-Andrés, Romero, Campos, & Pons, 2009). Estas imágenes constituyen un análisis no destructivo y no invasivo, en el no se requieren reactivos y materiales durante los análisis, ni preparación de las muestras, lo que implica una reducción de costos y tiempo por lo cual resulta ser una técnica rápida y sencilla (Ivorra-Martínez, 2015).

Además, se pueden analizar varias muestras de forma simultánea e identificar distintos componentes químicos de una muestra; así como también seleccionar regiones de interés en una muestra. Entre las desventajas de esta técnica están la existencia de información redundante que conlleva un mayor coste computacional para su procesamiento y que podría generar confusión en personal no capacitado. Se necesita un equipo con una buena capacidad de procesamiento para su uso, lo que implica un alto costo inicial (Ivorra-Martínez, 2015).

1.2.2. Índices de vegetación

Los índices de vegetación son medidas cuantitativas que permiten estimar y evaluar el estado de salud de las plantas, basándose en la medición de la radiación que emiten o reflejan. El índice es calculado a partir de los valores de la reflectancia a distintas longitudes de onda (Gilabert, González & García, 1997). Usualmente el índice corresponde a la combinación de las bandas espectrales, siendo el producto de varios valores espectrales que son sumados, divididos, o multiplicados en una forma diseñada para producir un valor único que indique la cantidad o vigor de vegetación dentro de un píxel. Un valor alto indica que la vegetación es saludable (García, 2015).

Existen diversos tipos de índices de vegetación (Tabla 1) que ayudan a monitorizar la vegetación. La mayoría de ellos están basados en las interacciones entre la vegetación y la energía electromagnética de las bandas del espectro rojo e infrarrojo (García, 2015).

Tabla 1. Tipos de índices de vegetación. Fuente: (García, 2015; Olivares & Beltrán, 2020).

Índice de vegetación		Característica
NDVI Normalizado de Vegetación)	(Índice Diferencial	Sus valores son el reflejo de la relación de la banda roja y una banda en el infrarrojo cercano (NIR). La banda roja es influenciada por la cantidad de clorofila, mientras que la banda NIR es influenciada por el contenido de agua. Cuando la vegetación sufre algún tipo de estrés, la reflectividad disminuye el NIR y aumenta en el rojo al tener menor absorción de clorofila. Los valores de este índice fluctúan entre -1 y 1.
GNDVI Vegetación de Normalizada Verde)	(Índice de Diferencia	Es una variante del NDVI que utiliza la banda del verde en lugar del rojo.
RVI (Índice de Vigor Relativo)		Es el cociente entre la reflectividad en el infrarrojo cercano y la reflectividad en la banda del rojo.

GVI (Índice Verde de Vegetación)	Es el cociente entre la reflectividad en el infrarrojo cercano y la reflectividad en la banda del verde.
NGRDI (Índice de Diferencia Verde Rojo Normalizado)	Hace referencia al uso de dos bandas, el verde y el rojo.
RG (Red Green o Rojo Verde Rojo-Verde)	Permite calcular un índice que excluya la banda del infrarrojo cercano y ver la relación entre las bandas rojo y verde, con el índice de vegetación normalizado NDVI.

1.3. Relación de la técnica de imágenes multiespectrales con la caracterización de metabolitos secundarios

Se emplean cámaras multiespectrales en la investigación para determinar el estado de salud de las plantas. El estrés de las plantas se presenta como una reorganización o pérdida de los pigmentos. Para evaluar las propiedades ópticas de las plantas y para analizar el efecto del estrés, se utilizan sensores ópticos. La imagen hiperespectral (HSI) incluye técnicas ópticas de alta resolución que permiten evaluar bandas de onda roja, verde y azul, bandas de onda estrechas en la luz visual de 400 a 700 nm (VIS), en el infrarrojo cercano de 700 a 1000 nm (NIR) y en el infrarrojo de onda corta de 1000 a 2500 nm (SWIR). La reflectancia VIS de las plantas se caracteriza principalmente por la absorción de clorofila, carotenoides y xantofilas. El NIR y el SWIR estimulan el movimiento molecular que induce una fuerte absorción o reflexión por compuestos que muestran un patrón espectral característico. Debido a la enorme cantidad de información presente en las imágenes multiespectrales que son invisibles a simple vista, esta tecnología podría utilizarse para el análisis completo de la composición vegetal (Mahlein et al., 2018).

Cuando un haz de luz incide sobre una planta, puede ocurrir reflexión, absorción, transmisión y dispersión de la luz. Un 4% de la radiación incidente se refleja en la superficie externa como reflectancia especular o brillo. La radiación restante penetra en el tejido en direcciones distintas donde es absorbida o dispersada. La profundidad de penetración de luz varía según la longitud de onda y la energía luminosa. La absorción de

la luz está relacionada con las estructuras químicas de los constituyentes vegetales (Viera-Maza, 2018).

Los principales compuestos que absorben energía en el intervalo de longitud de onda visible son la clorofila, carotenoides y antocianinas. El agua es el principal absorbente en la región infrarroja cercana. La luz que penetra más profundamente en los tejidos es modificada por las absorciones seleccionadas de los constituyentes y, por lo tanto, contiene información de composición útil (Viera-Maza, 2018).

Las antocianinas son compuestos fenólicos frecuentes en especies vegetales. Son el grupo más importante de pigmentos dentro de los polifenoles, son hidrosolubles y producen pigmentos rojos, azules y púrpuras. Su concentración es afectada por factores ambientales como la luz, temperatura y altitud. Son compuestos que absorben fuertemente en la región visible del espectro (Viera-Maza, 2018).

Las antocianinas presentan máximos de absorción en la región visible (490 – 550 nm) y en la ultravioleta (260-280 nm). La absorción de antocianina generalmente se manifiesta como una banda cerca de 540 – 550 nm por lo general superpuesta con la absorción de clorofila y carotenoides (Viera-Maza, 2018).

1.4. La fotosíntesis y la caracterización de biomoléculas con las imágenes multispectrales

Los factores ambientales tienen un impacto importante sobre la morfología y fisiología de las plantas, ya que las características como el tamaño y forma son modificadas por la luz, temperatura, sequía, entre otros. Estas condiciones pueden afectar el metabolismo, llevando a una disminución o aumento de metabolitos secundarios (Giraldo, Atehortúa & Mejía, 2014; Hornyák et al., 2022). Por ejemplo, la luz solar es esencial para la germinación, el desarrollo de las plantas, la fase generativa, la productividad de la fotosíntesis, y es una señal importante para mediar el metabolismo de sustancias químicas. Entre estas sustancias están los compuestos fenólicos que, a su vez, ayudan a tolerar las diferentes fluctuaciones ambientales (Hornyák et al., 2022). Sin embargo, su exceso conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (Méndez, 2015).

La radiación que llega a la Tierra comprende una amplia gama del espectro electromagnético y el 40% de ella se conoce como luz o radiación visible (Carrasco-Ríos, 2009). La radiación emitida por el sol comprende diferentes longitudes de onda que va desde el ultravioleta, hasta el infrarrojo, atravesando por el rango de luz visible (Lira, 2017). La radiación ultravioleta (UVR) se divide en tres regiones en función de la longitud de onda: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) y UVA (320- 400 nm) (Giraldo, Atehortúa & Mejía, 2014). En las plantas, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) juega un papel importante su desarrollo, ya que engloba una fracción del espectro solar que está comprendida entre los 400 nm y los 700 nm, que se encuentra en la zona visible del espectro, esta radiación es absorbida por las plantas, almacenada y transformada a través de sus sistemas fotosintéticos (Araque & Jiménez, 2015).

Uno de los mecanismos de defensa de las plantas frente a la UVR es el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como los compuestos polifenólicos, los cuales tienen la capacidad de absorber la UVR, y éstos se acumulan en las células de la epidermis de diversas especies vegetales absorbiendo la radiación UVB nociva, sin interferir con la absorción de la radiación fotosintéticamente activa. (Giraldo, Atehortúa & Mejía, 2014; Tsormpatsidis et al., 2010). Por un lado, los flavonoides orto di-hidroxisustituídos, tales como la quercetina y la luteolina son buenos captadores de radicales libres, comparados con sus homólogos mono hidroxisustituídos. Esto sugiere que los flavonoides pueden proporcionar una protección doble frente a los efectos nocivos de la UVR, actuando como especies captadoras de radicales libres y como filtros solares capaces de absorber UVR (Giraldo, Atehortúa & Mejía, 2014).

1.5. Rutas metabólicas de las plantas

El metabolismo se define como el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los organismos vivos para formar sustancias complejas a partir de sustancias simples, o para degradar sustancias complejas. Las plantas sintetizan una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios (García & Carril, 2011).

Las especies vegetales utilizan carbono y energía para formar moléculas orgánicas que no poseen una función directa en procesos elementales del metabolismo primario. Estas sustancias reciben el nombre de metabolitos secundarios (Valares, 2011). A menudo son

específicos para cada especie y pueden ser prescindibles en muchas condiciones. Generalmente no aumentan la aptitud de la planta, pero en el entorno natural, pueden ser esenciales para la supervivencia y la reproducción. Por lo tanto, en su mayoría se fabrican en condiciones controladas para un propósito específico, como la defensa contra patógenos y herbívoros, tolerancia mejorada al estrés abiótico, atracción de insectos y animales para la fertilización y/o dispersión de semillas o repelencia de comedores no deseados (Böttger et al., 2018).

Los metabolitos secundarios pertenecen a los grupos químicos de fenoles, terpenos y compuestos nitrogenados o alcaloides; y de estos, los fenoles y terpenos están ampliamente distribuidos en las plantas. En particular, las rutas principales en la biosíntesis de los polifenoles son las rutas del ácido shikímico y la ruta del ácido mevalónico. La ruta del ácido mevalónico (MEV) se da en el citosol, involucrando tres moléculas de acetyl-CoA que se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). Esta ruta es considerada una fuente importante de fenoles tanto en hongos como en bacterias, sin embargo, es poco utilizada en plantas superiores (García & Carril, 2011). El alcance de este trabajo son los compuestos sintetizados por la ruta del ácido shikímico.

Los polifenoles derivan del ácido shikímico en esta ruta, a través de la cual las especies vegetales biosintetizan más de 8000 compuestos fenólicos y polifenólicos cuya característica más relevante es su comportamiento antioxidante. Esta ruta es la más importante para originar compuestos fenólicos, e inicia con la unión del fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa-4-fosfato, para obtener el ácido 3-deoxi-D-arabino-heptusolónico-7-fosfato (DAHP). El ácido shikímico se forma por deshidratación del ácido 3-dehidroquinico. Los ácidos protocatequínico y gálico son ácidos fenólicos que se forman por deshidratación del ácido 3-dehidroshikímico. Por otra parte, el ácido shikímico es fosforilado en presencia de ATP formando el ácido shikímico 3-fosfato, al unirse a una molécula de fosfoenolpiruvato (Gordo, 2017).

1.5.1. Compuestos fenólicos

Son productos secundarios sintetizados por las plantas, conocidos también como polifenoles o fenilpropanoides. Estos compuestos se derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Gordo, 2017). Su importancia radica en que producen

soporte mecánico a la planta, contribuyen en la coloración de flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación ultravioleta (Valares, 2011).

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que engloba desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos condensados y la lignina (Gordo, 2017).

1.5.1.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

- *Ácidos fenólicos*

Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxilo y grupo hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático (Xu et al., 2017). Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos. La presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos (Peñarrieta et al., 2014). Al igual que otros compuestos fenólicos, su presencia está altamente influenciada por condiciones ambientales como: el frío excesivo, alta incidencia de radiación solar y la polución en zona de crecimiento pueden contribuir a su síntesis (Gordo, 2017).

- *Flavonoides*

Los flavonoides son importantes para el adecuado desarrollo de las plantas, puesto que participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis durante la cual catalizan el transporte de electrones. Principalmente, se encuentran en las partes aéreas y jóvenes de las plantas y en aquellas que se encuentran más expuestas al sol ya que la luz favorece su síntesis. Es por esto que se considera el grupo más grande de compuestos fenólicos en las plantas. En una amplia variedad de plantas que presentan coloración en las hojas, se dice que su color es directamente proporcional a la concentración de flavonoides (Martínez-Flórez et al., 2002).

En cuanto a su actividad biológica, estos compuestos presentan una acción antioxidante, la cual depende de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales como el hierro

y el cobre, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres (Pérez, 2013). Por otro lado, ejercen acciones como: diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria (Pérez, 2013).

- ***Cumarinas***

Se encuentran de forma libre o combinada con azúcares (Valencia et al., 2017). En su estructura presentan un gran número de insaturaciones, lo que les confiere un espectro característico que al ser expuestos a la luz ultravioleta exhiben fluorescencia variable de azul o a amarillo, y a púrpura, exaltada en presencia de amoníaco (Carvajal et al., 2009).

La mayoría de las cumarinas conocidas, se encuentran libres en las plantas, en partes como las raíces, flores y frutos, son sustancias fluorescentes, comúnmente fotosensibles (García et al., 2003).

En el ámbito farmacológico, estos compuestos presentan propiedades como: antimicrobianas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antivirales, antihelmínticas, antioxidantes, o inhibidoras enzimáticas (Herrera et al., 2017)

- ***Lignanós***

Los lignanos son derivados del aminoácido fenilalanina y de alcoholes cinámicos. Aunque existe poca información acerca de las funciones fisiológicas de los lignanos, se sabe que están relacionadas con funciones defensivas: actividades antioxidantes, fungicida, antibacterianas, insecticida, nematocida, antialimentaria, alelopática y similar a ciertas citoquininas (García & Carril, 2011).

- ***Taninos***

Son empleados por las plantas como mecanismo de defensa contra herbívoros y patógenos y para la conservación del nitrógeno (Waterhouse, 2002). La característica principal de los taninos es su capacidad para formar complejos reversibles con las proteínas. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo (Marquéz & Suárez, 2008).

- ***Quinonas***

Son compuestos formados por anillos de carbono que se forman de la oxidación de compuestos aromáticos para dar la correspondiente dicetona. Las quinonas naturales varían desde el color amarillo pálido al casi negro. Aunque están ampliamente distribuidas, contribuyen poco a los colores naturales, en comparación, por ejemplo, a los carotenoides y antocianinas (Leyva et al., 2017).

1.6. *Jungia rugosa*

Jungia rugosa es una especie vegetal que pertenece a la familia *Asteraceae*. Es conocida comúnmente con el nombre de “carne humana” y ha sido utilizada desde tiempos antiguos para combatir lesiones de la piel debido a sus propiedades cicatrizantes y antiinflamatorias (Criollo & Molina, 2016).

Estas plantas contienen ciertos flavonoides y compuestos polifenólicos con propiedades antimicrobianas, antivirales, antiulcerosas, antioxidantes, antihepatotóxicas y antihipertensivas. Además, inhiben una gran variedad de enzimas tales como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa, los radicales libres lo cual está directamente relacionado con la reducción del estrés oxidativo (Enciso & Arroyo, 2011).

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de diseño de investigación:

Investigación cuantitativa analítica de corte transversal.

2.2. Áreas de estudio y muestreo

Se realizó una recolección de tres muestras representativas de las hojas de la planta *Jungia rugosa* en los lugares aledaños a la ciudad de Cuenca y caracterizados por sus diferencias en altitudes. Estos lugares fueron asignados por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales, Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca. Los lugares asignados fueron San José de Raranga, El Cajas camino a la laguna de Llaviuco y Biblián, cuyas coordenadas se presentan en la Tabla 2. En cada lugar se recolectaron tres individuos de la planta.

Tabla 2. Coordenadas de los lugares de recolección de la planta de estudio.

Lugar	Código utilizado	Coordenadas	
San José de Raranga	SJ	X= 721920	Y=9652492
El Cajas camino a Llaviuco	CJ	X=708186	Y=9685550
Biblián	B	X=730160	Y=9705825

2.3. Análisis químico

2.3.1. Materiales, reactivos y equipos

- *Materiales*

Los materiales utilizados en los distintos análisis fueron percoladores, embudos, balones de aforo, pipetas Pasteur, pipetas automáticas, tubos de ensayo, viales ámbar, tubos para liofilizar, vasos de precipitación, espátulas, varillas, tijeras, tubos eppendorf, placa de 96 pocillos.

- *Reactivos*

- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua destilada y ultrapura
- Reactivo de Folin al 10%

- Carbonato de sodio
- Ácido acético glacial
- Estándares de polifenoles: ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico, ácido ferúlico.
- *Equipos*
 - Destilador de agua (Fanem, modelo 724, serie TAD – 30979, Brasil).
 - Congelador (dairei freezer -45/-85°C ULTF80, USA)
 - Rotavapor (Heildolph, Laborota 4000 efficient, serie N° 04819293, Alemania)
 - Espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10-S, serie 2L3M064003, USA).
 - Cámara extractora de gases (Quimis, serie N° 07111126, Brasil).
 - Baño ultrasónico (Cole - Palmer 8893-21, serie QDC 040846137F, USA).
 - Balanza analítica (Mettler Toledo, serie N° 1129070512, Suiza).
 - Balanza analítica (Boeco BBL - 31, serie N° 19509555, Alemania).
 - Estufa (VWR, serie N° 01053410, USA).
 - Centrífuga (sigma 2-6, serie N° 120303, Alemania).
 - Cámara multispectral Sequoia ®

2.3.2. Pretratamiento de muestras

Para la obtención adecuada de los extractos, previamente se realizó un proceso de lavado y secado. Para un lavado adecuado de la planta, primero se seleccionaron las hojas, luego se realizó un lavado con agua potable para eliminar cualquier tipo de residuo contaminante. Posteriormente, se sumergió en agua destilada y se eliminó el exceso de agua mediante el uso de cernidores. Las hojas fueron colocadas en papel periódico sobre bandejas de madera provistas con una malla (previamente sanitizada), para eliminar el exceso de agua, durante 24 horas.

2.3.3. Obtención de extractos vegetales

Se trituraron las hojas con una tijera hasta obtener fracciones pequeñas, de un tamaño inferior a 0.2 cm. Se procedió a cargar el percolador cuidando de apelmazar suavemente el material vegetal con el fin de evitar la presencia de cámaras de aire que dificulten la extracción. Se añadió metanol hasta cubrir las canicas y sobrepasar su altura en 1 cm, y

se abrió la llave reguladora del flujo de salida hasta asegurarse que toda la superficie esté llena de solvente (Figura 3A). Se dejó macerar la droga por un período de 24 horas. Después de este período, se procedió a abrir la llave inferior para la obtención del primer extracto en un tubo a razón de 20 gotas por minuto, esta fracción corresponde al 75% (3.75 ml) del peso en extracto seco (5 g) (Figura 3B), para esta relación se consideró el PNT N° OG 005. Según lo establecido en el PNT mencionando anteriormente, se colocó un balón con base redonda para obtener el filtrado restante durante 5 horas, y se renueva el solvente según sea necesario. Después de este tiempo se abrió la llave del percolador hasta agotar la droga.

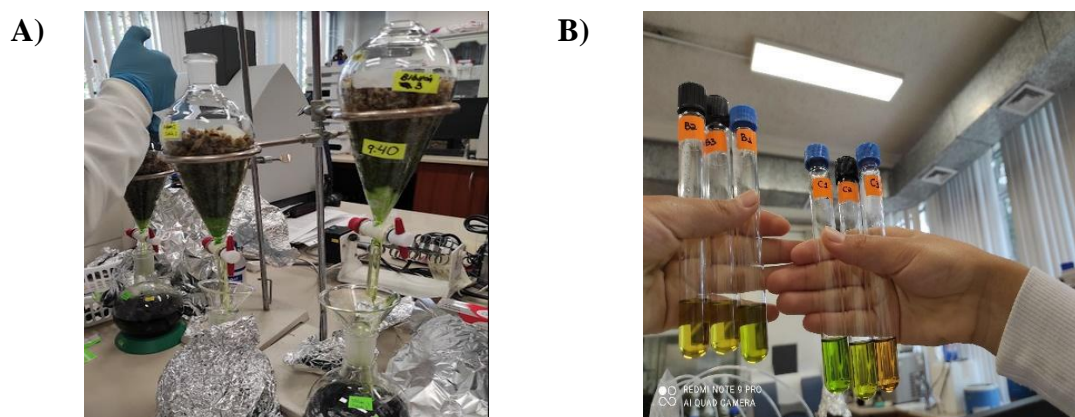


Figura 3. A) Percoladores cargados con la muestra. **B)** Primera fracción del extracto metanólico

Para eliminar el solvente metanólico, el extracto fue llevado al rotavapor (Figura 4). El contenido del tubo (3.75 ml) fue colocado en el balón y fue llevado a sonicación. Posteriormente, el contenido del balón fue colocado nuevamente en el mismo tubo que contenía la fracción. Después, el solvente se secó bajo una corriente de nitrógeno gaseoso (Figura 5). Luego de esto, se añadieron alícuotas de agua destilada ultra pura y el tubo fue llevado a un sonicador y así remover el extracto vegetal de las paredes del tubo.



Figura 4. Evaporación del metanol en el rotavapor



Figura 5. Secado del extracto metanólico mediante nitrógeno

El extracto del tubo anterior fue vertido en un tubo especial de liofilizado (Figura 6). Este tubo fue llevado a congelación a una temperatura de -80°C por al menos 3 horas. En el congelador los tubos fueron girados constantemente (cada 5 minutos) para lograr una distribución adecuada del extracto en las paredes del tubo. Después el tubo fue introducido en el liofilizador, el extracto final se obtuvo 24 horas después. Luego, los tubos fueron pesados para calcular su rendimiento. El extracto vegetal fue almacenado en un tubo de vidrio, en el biofreezer a -20°C hasta ser utilizado.



Figura 6. Tubo con extracto previo a la congelación.

2.3.4. Metodología para calcular el rendimiento del extracto

Para calcular el rendimiento del extracto vegetal se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{w_i - w_f}{w_i} * 100$$

Donde % R indica el porcentaje de rendimiento a calcular, w_i es el peso del tubo con el extracto y w_f es el peso del tubo vacío.

2.3.5. Determinación de polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu)

2.3.5.1. Fundamento

El método de Folin-Ciocalteu permite determinar y cuantificar fenoles totales en vegetales y se basa en la capacidad de estas moléculas para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008). Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul. El mecanismo es una reacción redox, por lo que indirectamente puede considerarse como un método para medir la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra produce una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a un patrón de ácido gálico (García, Fernández, & Fuentes, 2015).

2.3.5.2. Procedimiento

Se pesó 5 mg del extracto seco de la muestra de estudio y se disolvió en 1 ml de metanol. Posteriormente, se realizó una dilución 1/4 (250 µl de la solución y 750 µl de metanol).

En microtubos se colocó una alícuota de 100 µl de la muestra (o solución patrón) con 200 µl de reactivo de Folin al 10 % y se mezcló. Se dejó en reposo por un tiempo de 5 minutos. Luego, se añadió 800 µl de Na_2CO_3 700 mM y se homogeneizó con ayuda del vortex. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad. En el caso de existir precipitación, los tubos deben ser centrifugados (6000 rpm durante 2 minutos); si no se evidencia precipitación, se continúa directamente.

Finalmente, se tomó 200 µl de cada tubo y se colocó en un pocillo de la microplaca (de 96 pocillos). La absorbancia se midió a 765 nm mediante Microplate Reader. Las soluciones se prepararon por triplicado.

Para la curva de calibración (Anexo 1) se utilizó ácido gálico como patrón, el cual fue diluido en agua destilada hasta concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/ml y un blanco de reactivos. De aquí en adelante, se continuó con el mismo procedimiento aplicado a las muestras.

2.3.6. Análisis de polifenoles por HPLC-DAD

2.3.6.1. Fundamento

La cromatografía líquida acoplada a detectores UV-visible con arreglo de diodo (HPLC-UV) permite la separación e identificación de algunos compuestos fenólicos comparando los tiempos de retención con los de los estándares (Gordo, 2017).

2.3.6.2. Preparación de la muestra

Se utilizó 1 mg de extracto seco de cada muestra y se añadió 1 ml de metanol grado HPLC. Posteriormente, la muestra fue introducida en el baño maría con ultrasonido por 5 minutos. Se filtró la muestra con una jeringa acoplada a un filtro de membrana con un diámetro de 0.45 μm . Luego se realizó una dilución 1/10 (100 μl de extracto reconstituido y 900 μl de una solución de metanol/agua 50:50, v/v) y se depositó en viales ámbar para ser analizado por el equipo de HPLC.

2.3.6.3. Procedimiento

El análisis cromatográfico se realizó mediante el método optimizado en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca. Este análisis se llevó a cabo en un HPLC Serie 1200 (Agilent Technologies, St. Clara, CA, EE. UU.) equipado con una columna Zorbax C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 μm) (Agilent Technologies, St. Clara, CA, EE. UU.) a una temperatura de 30 °C. Se empleó como fase móvil A una mezcla de agua/ácido acético al 0.3% v/v, y fase móvil B una mezcla de acetonitrilo/agua 50:50 v/v /ácido acético 0.3%. La separación se realizó con una elución tipo gradiente a un caudal de 1 ml/min. La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos (DAD) (Agilent Technologies, St. Clara, CA, EE. UU.) a una longitud de onda de 254, 280 y 320 nm.

Para el análisis, se contó con los estándares de ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico y ácido ferúlico. Para la elaboración de la curva de calibración se

partió de una solución madre de 1000 ng/ml de cada estándar disuelto en una solución metanol/agua 50:50 (v/v) y realizaron diluciones de 50:50 de concentración ([Anexo 2](#)).

2.4. Imágenes multiespectrales

2.4.1. Fundamento

Las imágenes fueron captadas con una cámara multiespectral Parrot Sequoia (Figura 7). El dispositivo permite capturar imágenes de cultivos en múltiples bandas espectrales para evaluar la composición vegetal. El equipo consta de 4 cámaras espectrales de 1.2 Mpx y una cámara que consta de tres bandas: rojo, verde y azul (RGB) de 16 Mpx (Kharuf, 2018). En la Tabla 3 se observan las distintas bandas espectrales que pueden ser obtenidas mediante el sensor que son invisibles al ojo humano y también la RGB dentro del espectro visible.

La imágenes de hojas de la planta fueron registradas con



Figura 7. Cámara multiespectral Sequoia. Fuente: (Kharuf, 2018)

Tabla 3. Bandas espectrales obtenidas por la cámara multiespectral Sequoia. Fuente: (Kharuf, 2018).

Espectro	Longitud de Onda	Ancho de Banda
Verde	550 nm	40 nm
Rojo	660 nm	40 nm
Borde Rojo	735 nm	10 nm
Infrarrojo Cercano	790 nm	40 nm

La cámara RGB captura la luz en tres bandas de longitud de onda en el espectro visible rojo, verde y azul (Kharuf, 2018).

2.4.2. Procedimiento

Para el uso correcto de la cámara multiespectral se siguieron los pasos indicados en el [anexo 3](#).

Las imágenes de hojas extraídas de las plantas fueron registradas con la incidencia de luz solar. Para esto se utilizó un marco de madera de 50x50 cm (Figura 8.A), y la medición se realizó a nivel de campo y en condiciones de laboratorio. Las condiciones de laboratorio fueron las siguientes: presencia de radiación solar directa, lugar abierto evitando la existencia de edificios alrededor. La altura a la que fue colocada la cámara fue de 1,40 m. La toma de fotos se realizó a distintas horas en un intervalo de 10h00 a 14h30 (Figura 8.B).



Figura 8. Calibración y captura de imágenes. **A)** Calibración de la cámara. **B)** Toma de imágenes de las hojas de *Jungia rugosa*.

Posteriormente, se transportaron las plantas recolectadas en bolsas de papel etiquetadas de acuerdo al lugar y fecha de recolección, para su posterior análisis químico.

Para la obtención de datos de las imágenes multiespectrales se utilizó un software especializado, el cual permitió capturar, almacenar, administrar y analizar información digital, posibilitando cargar con facilidad datos espaciales y tabulares para ser mostrados en forma de mapas, tablas y gráficos (López, 2015). Además, en cada imagen se tomaron como referencia 50 puntos, se obtuvieron los promedios y valores representativos de cada banda, a partir de los cuales se extrajo la información correspondiente a cada píxel.

2.5. Análisis de datos

Para el análisis y procesamiento de datos obtenidos del HPLC se utilizó el software Chemstation (Agilent Technologies, St. Clara, CA, EE. UU.). Los picos cromatográficos se identificaron por comparación con los tiempos de retención, de acuerdo a cada uno de los estándares: ácido neoclorogénico (10,99 min), ácido clorogénico (14,56 min), ácido criptoclorogénico (15,16 min) y ácido ferúlico (23,8 min). Las áreas bajo la curva del pico cromatográfico fueron interpoladas en la curva de calibración de cada estándar ([Anexo 2](#)). Los resultados de concentración fueron expresados como nanogramo por mg de extracto.

Los resultados de polifenoles totales fueron calculados a partir de la curva de calibración del ácido gálico usado como patrón de referencia para la determinación de compuestos fenólicos ([Anexo 1](#)). Los resultados de concentración fueron expresados en mEq Ácido gálico / mg de extracto.

Para obtener los datos de las imágenes multiespectrales se siguieron dos métodos de extracción: forma ordinaria y la interpolación binomial utilizando un software estadístico. Los datos se extrajeron de acuerdo a las distintas bandas espectrales, en donde los datos de radiación captados para cada banda definida se organizaron en un archivo de Excel para su respectivo análisis.

Para establecer una correlación entre las imágenes multiespectrales y los métodos químicos se realizó el test de correlación de Pearson y posteriormente se aplicaron regresiones múltiples, utilizando los datos de las concentraciones de polifenoles totales, de los cuatro polifenoles cuantificados por HPLC y de las bandas espectrales. Las

variables independientes fueron las reflectancias de la planta obtenidas mediante las imágenes multiespectrales; mientras que en las variables dependientes se incluyeron las concentraciones de polifenoles totales e individuales obtenidas a nivel de laboratorio.

Para evitar la multicolinealidad se analizó la correlación entre la reflectancia de las imágenes tomadas en el campo y a nivel de laboratorio. Posteriormente se realizó una matriz de comparación para todos los lugares de muestreo. Para los análisis posteriores, únicamente se utilizaron los datos provenientes de las imágenes tomadas a nivel de campo debido a que los datos fueron muy similares a los obtenidos en las imágenes tomadas a nivel de laboratorio.

Se realizó el test de correlación de Pearson como método confirmatorio de la existencia o no de correlación entre la concentración del contenido polifenólico y las reflectancias de las diferentes ondas tomadas con la cámara multiespectral. Además, al realizar las regresiones múltiples, se analizaron los residuos con el fin de evaluar el modelo de regresión. El análisis estadístico se realizó en el software R Studio versión 4.2.1

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Rendimiento del extracto

En el [Anexo 4](#) se presentan los datos obtenidos calculados a partir de la fórmula del rendimiento. Se observa un mayor rendimiento en las muestras obtenidas de El Cajas en la salida dos.

3.2. Análisis de polifenoles totales

Los resultados de la cuantificación de fenoles totales en cada uno de los extractos de la planta de estudio, expresados en mg/Eq de ácido gálico/mg de extracto, se presentan en la Tabla 4 y en el [Anexo 5](#).

Tabla 4. Promedio de contenido de fenoles totales en las muestras analizadas

Lugar de muestreo	Salida 1		Salida 2	
	Promedio	DE	Promedio	DE
El Cajas	1,62	0,23	2,07	0,10
San José de Raranga	1,31	0,27	2,05	0,38
Biblián	1,72	0,13	1,74	0,20

Datos expresados en mg/Eq de ácido gálico/mg de extracto.

Se observaron variaciones en las concentraciones de polifenoles de cada extracto, en particular entre lugares de recolección, presentando la mayor concentración las muestras obtenidas en San José de Raranga y en El Cajas. Esto podría deberse a diferencias relacionadas al genotipo, variedad, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica el procesamiento y condiciones de almacenamiento, entre otros (Valencia et al., 2017; Azofeifa, 2009). Además, según Ávila & Ruales (2016), la presencia de sombra reduce la concentración de compuestos fenólicos en las plantas, sobre todo en las partes que se encuentran expuestas. Se demostró que, al saturar el suelo con agua se redujo el contenido fenólico de los frutos; pero al llevar la planta a condiciones de sequía se produce un aumento del contenido polifenólico.

3.3. Análisis de polifenoles por HPLC

El análisis cromatográfico de polifenoles se llevó a cabo con un número limitado de estándares (ácido neoclorogénico, clorogénico, criptoclorogénico y ferúlico) que permitieron la identificación y cuantificación de estos compuestos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5 y [Anexo 6](#).

Tabla 5. Contenido de ácido neoclorogénico, clorogénico, criptoclorogénico y ferúlico en las muestras de la planta *Jungia rugosa* obtenidos por HPLC-DAD.

Compuestos	Código	Lugares	Salida	Concentración (ng/mg extracto)
Ácido neoclorogénico	JR.SJ1.S1	San José de Raranga	1	2683,8
	JR.CJ3.S1	El Cajas	1	2176,4
	JR.B1.S1	Biblián	1	5560,1
	JR.SJ3.S2	San José de Raranga	2	3942,1
	JR.CJ1.S2	El Cajas	2	2742,9
	JR.B3.S2	Biblián	2	3676,0
Ácido clorogénico	JR.SJ1.S1	San José de Raranga	1	51411,0
	JR.CJ3.S1	El Cajas	1	44467,1
	JR.B1.S1	Biblián	1	96971,48
	JR.SJ3.S2	San José de Raranga	2	94017,3
	JR.CJ2.S2	El Cajas	2	58019,5
	JR.B3.S2	Biblián	2	69408,4
Ácido criptoclorogénico	JR.SJ1.S1	San José de Raranga	1	3218,9
	JR.B1.S1	Biblián	1	5558,8
	JR.SJ1.S2	San José de Raranga	2	3975,4

	JR.SJ3.S2	San José de Raranga	2	5511,7
	JR.B3.S2	Biblián	2	3830,6
Ácido ferúlico	JR.SJ1.S1	San José de Raranga	1	371,1
	JR.CJ3.S1	El Cajas	1	406,2
	JR.B1.S1	Biblián	1	627,1
	JR.SJ1.S2	San José de Raranga	2	472,6
	JR.CJ2.S2	El Cajas	2	536,1
	JR.B2.S2	Biblián	2	415,8

JR: *Jungia rugosa*; SJ: San José de Raranga; B: Biblián; CJ: El Cajas. S1: salida 1; S2: salida 2. El número ubicado junto a cada inicial del lugar de recolección indica el número de muestra (1-3).

En general, la concentración de los compuestos fenólicos estudiados fue mayor en los extractos de las muestras recolectadas en Biblián y en San José de Raranga. Cabe indicar que, en este trabajo, se analizaron algunos polifenoles como ejemplo pero que no fueron seleccionados por su ocurrencia en la planta de estudio. En el estudio de Casado y colaboradores (2010) se analizó un extracto metanólico de la planta *Jungia paniculata* y se reportó la presencia de flavonoides y derivados del ácido fenólico, sin especificarlos. En otro estudio realizado Acosta y colaboradores (2019) en la especie *Jungia rugosa* se reportaron cantidades considerables de luteolina y apigenina., por lo que estos compuestos deberían ser considerados en estudios posteriores.

3.4. Imágenes multiespectrales

El análisis de los datos obtenidos de las imágenes a partir de los dos métodos de extracción (forma ordinaria y con interpolación binomial) demostró que las bandas RED, REG, GREEN y NIR (Figura 9) en las distintas imágenes son similares. Por lo que únicamente se utilizaron los datos obtenidos de la forma ordinaria. De la misma manera, en la Figura 10 se muestra una buena correlación entre los datos de los dos métodos de extracción, en donde los resultados son similares en las bandas b1_RGB, b2_RGB y b3_RGB, cada una corresponde a tres bandas de longitud de onda en el espectro visible rojo, verde y azul.

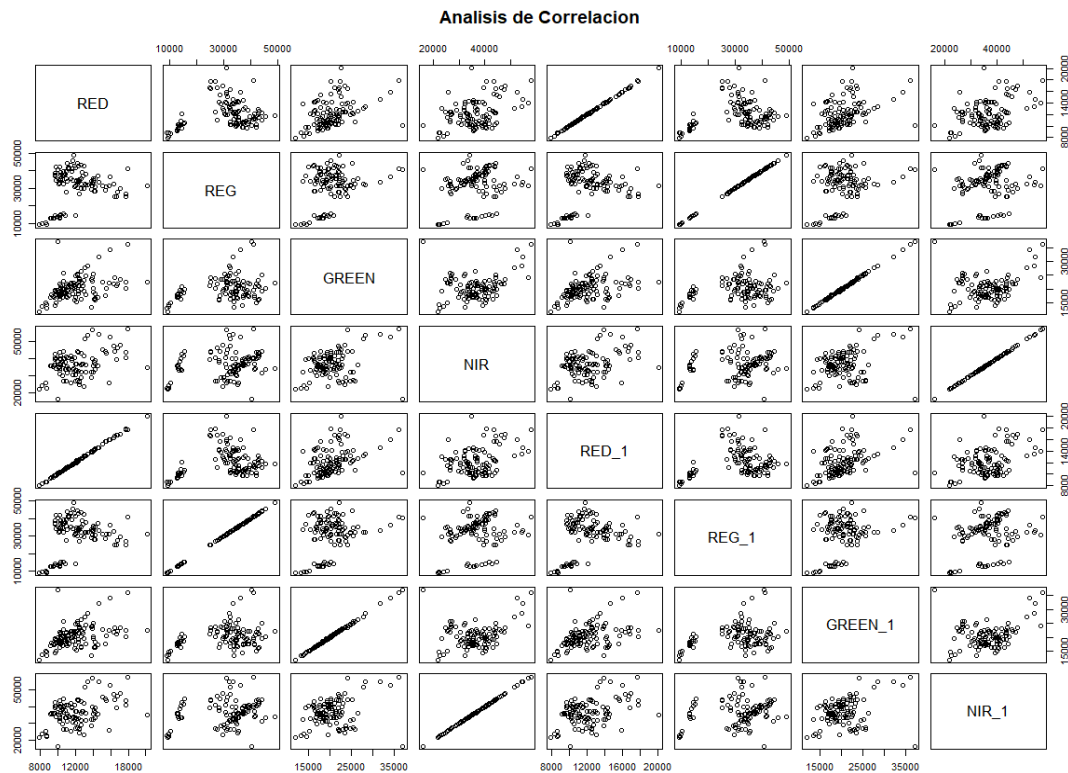


Figura 9. Análisis de correlación de la reflectancia entre las bandas espectrales RED, REG, GREEN, NIR.

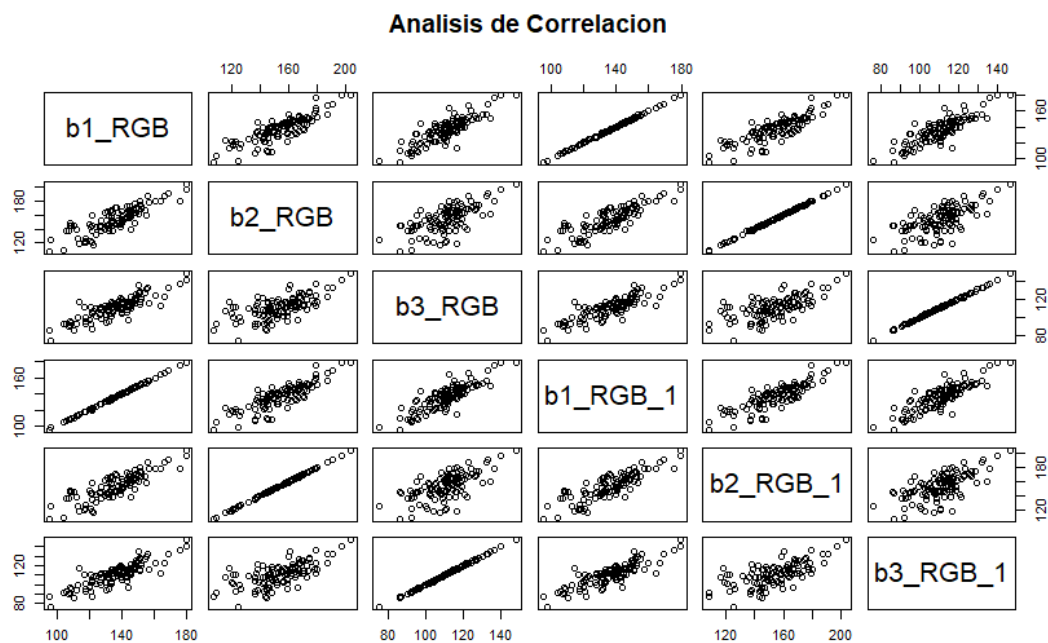


Figura 10. Análisis de correlación de la reflectancia según las bandas espectrales b1_RGB, b2_RGB, b3_RGB.

En la Figura 11 se presenta una matriz de correlación entre la reflectancia de las hojas recolectadas obtenida a partir de las imágenes tomadas en el lugar de recolección y las imágenes tomadas en el laboratorio. Se puede observar que en la mayoría de gráficas, existe una correlación considerable de reflectancia para todas las muestras. Sin embargo, la mejor correlación se observó en las imágenes de las hojas recolectadas en el Cajas, por lo que se podría suponer que la existencia de esta correlación estaría dada por la distancia corta entre El Cajas y el laboratorio, al compararla con los otros dos lugares de recolección de las plantas.

Según Flores, López & Scott (2000), la caracterización espectral de plantas también depende de la reflectividad de la hoja, según su estado fenológico, forma y contenido de humedad. Así como las características morfológicas de la planta: su altura, perfil, grado de cobertura del suelo, etc., las cuales pueden dar lugar a una notable modificación de su comportamiento reflectivo.

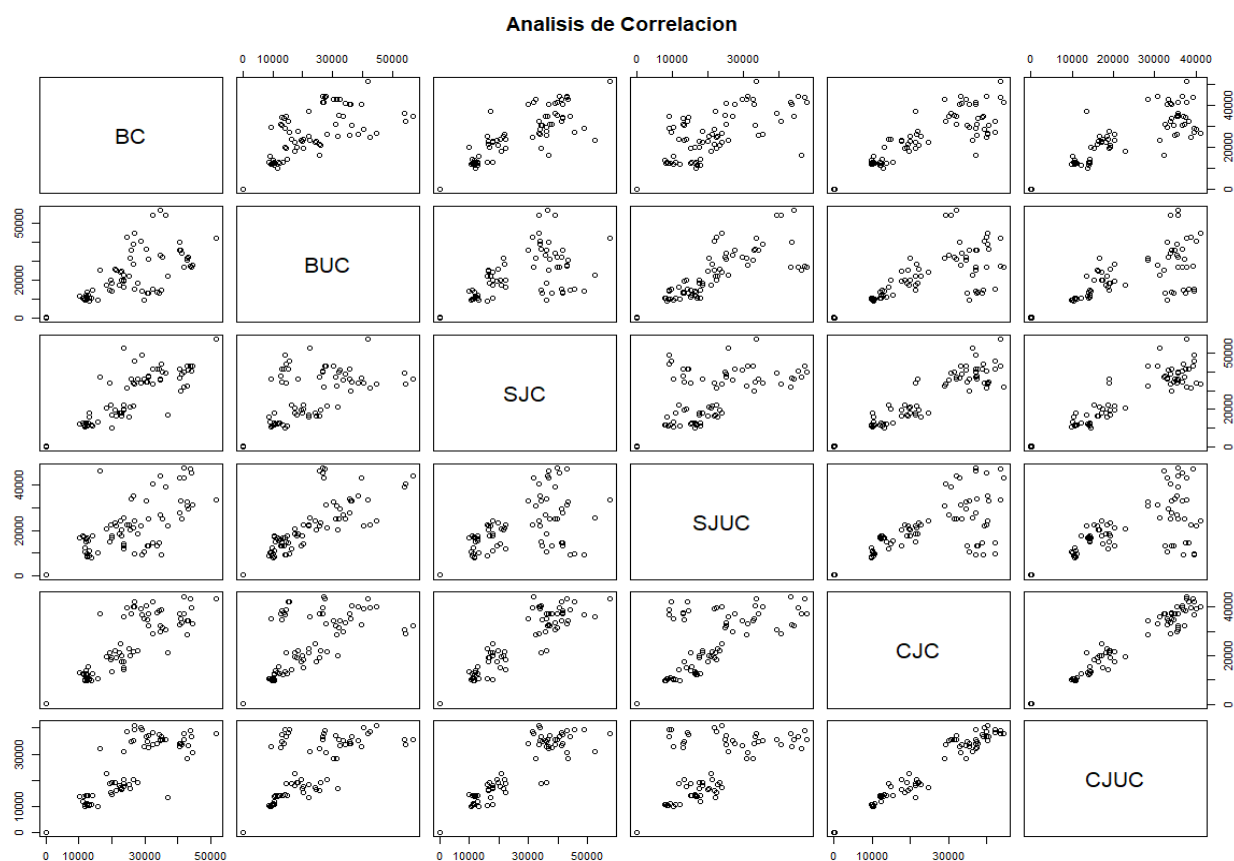


Figura 11. Análisis de correlación de la reflectancia en distintos lugares de muestreo.

3.5. Análisis de la correlación entre imágenes espectrales y métodos de laboratorio

Mediante la aplicación del test de correlación Pearson (Tabla 6 y [Anexo 7](#)) y con el método de Regresión múltiple se demostró que existe una buena correlación en la mayoría de datos obtenidos a partir de las imágenes multiespectrales y las determinaciones de polifenoles por métodos espectrofotométricos y cromatográficos. Además, considerando el valor R^2 ajustado (Tabla 6 y [Anexo 8](#)) y los gráficos de residuos ([Anexo 9](#)) de la regresión, se puede confirmar que, en general, el modelo de regresión tiene un alto nivel de ajuste entre las variables.

Al comparar la procedencia de las muestras, se observó una correlación significativa entre las muestras obtenidas en San José de Raranga y en El Cajas, mientras que en Biblián la correlación no es significativa (Tabla 6). Estas diferencias podrían estar asociadas a las condiciones geográficas de la planta, así como la asociación con otras especies y la geometría de la plantación (Cárdenas, 2016). Además, la temperatura constituye un factor físico considerable que determina el rendimiento de la planta, y está relacionada con muchas características estructurales y funcionales, como la orientación de las hojas, la capacidad calorífica, las propiedades de la superficie, la absorción de infrarrojos y la tasa de transpiración (Fiorani et. al., 2012). En el presente estudio, la temperatura de Biblián (provincia del Cañar) es relativamente menor en comparación a los lugares pertenecientes a la provincia del Azuay.

Tabla 6. Resultados de correlación entre imágenes espectrales y métodos de laboratorio.

Muestra	Compuesto polifenólico	Banda espectral	Regresión múltiple	Test de correlación	R^2 ajustado
Valor p					
BC	Ácido neoclorogénico	b3_RGB	0,4659	0,04193*	0,01304
BUC	Fenoles totales	NIR	0,03035*	0,0001619*	0,5275
	Ácido criptoclorogénico	REG	0,08693	0,02748*	0,3901
	Ácido ferúlico	RED	0,04686*	0,0004588*	0,4762
SJC	Fenoles totales	REG	0,03434*	0,04731*	0,5136
	Ácido neoclorogénico	REG	0,00111*	0,06132	0,7732
	Ácido clorogénico	GREEN	0,006737*	0,07229	0,6645

	Ácido criptoclorogénico	GREEN	0,004034*	0,06626	0,7003
	Ácido ferúlico	REG	0,001791*	0,03733*	0,7487
SJUC	Fenoles totales	REG	0,03331*	0,0006172*	0,5171
	Ácido neoclorogénico	REG	0,000591*	8,21E-07*	0,8016
	Ácido clorogénico	REG	0,0009041*	3,00E-05*	0,7828
	Ácido criptoclorogénico	REG	0,0007095*	2,14E-05*	0,7937
	Ácido ferúlico	REG	0,0006664*	3,31E-06*	0,7964
CJC	Fenoles totales	b2_RGB	0,005339*	0,0006258*	0,6813
	Ácido neoclorogénico	RED	8,075e-07*	2,30E-06*	0,9489
	Ácido clorogénico	b2_RGB	0,0002269*	0,01006*	0,8377
	Ácido criptoclorogénico	b2_RGB	0,001724*	0,003823*	0,7507
	Ácido ferúlico	RED	0,001758*	0,01421*	0,7497
CJUC	Fenoles totales	b3_RGB	0,0006093*	2,93E-05*	0,8003
	Ácido neoclorogénico	RED	9,146e-06*	4,04E-11*	0,9163
	Ácido clorogénico	b3_RGB	0,01342*	0,002466*	0,6085
	Ácido criptoclorogénico	b3_RGB	0,03435*	0,01376*	0,5136
	Ácido ferúlico	RED	0,009568*	0,002069*	0,6372

BC=Biblián “a nivel de campo” campo; BUC= Biblián “a nivel de laboratorio”; SJC= San José de Raranga “a nivel de campo” SJUC= San José de Raranga “a nivel de laboratorio”; CJC= Cajas “a nivel de campo”; CJUC= Cajas “a nivel de laboratorio”. * Valor $p < 0,05$ significativo.

Se considera que existe una correlación entre variables en aquellos valores de R^2 mayores a 0,70. Mientras que los valores menores a 0,5 se consideran no significativos.

Mirik y colaboradores (2007) indican que existe una relación entre las bandas espectrales y los compuestos químicos, carotenoides y antocianinas, ya que en la fotosíntesis las plantas tienen una fuerte influencia de la radiación electromagnética debido a que la absorción de radiación de onda corta por parte de las plantas depende de las interacciones moleculares que tienen lugar en el tejido vegetal, en donde los electrones absorben la radiación solar incidente en longitudes de onda controladas por uniones químicas y estructurales. Por otro lado, Bruning y colaboradores (2020) mencionan que existe una influencia del contenido de agua en la reflectancia visible y que las bandas de onda NIR están afectadas por el contenido de agua de la planta. De modo que no se evidenciaron resultados significativos en la mayoría de muestras relacionadas con esta banda

La técnica de imágenes multiespectrales es una herramienta muy versátil. Según Lara, y otros, (2013) se utiliza la técnica de imágenes como un procedimiento no destructivo para identificar la influencia del estrés salino en lechuga recién recolectada. Los resultados de esta investigación indican que es viable la supervisión mediante técnicas de análisis de imagen para mantener los niveles de salinidad en el rango óptimo y conseguir un aumento de la vida útil del producto, sin comprometer su productividad ni su calidad fisiológica. Sin embargo, no se indican los valores de correlación.

En el presente trabajo se encontró una correlación entre las imágenes multiespectrales y el contenido de polifenoles totales y unos polifenoles específicos, tomados como ejemplo. Este estudio debería considerarse como un primer screening para establecer la correlación entre estos parámetros pues tiene como limitaciones el número limitado de muestras analizadas y de polifenoles específicos. Además, para lograr una correcta captura de imágenes mediante el sensor multiespectral Parrot Sequoia es necesario un clima soleado y vientos ligeros (Kharuf, 2018), condición que resultó complicado obtener durante el mes de abril 2022 debido a las irregularidades del clima por lo que fue necesario repetir las visitas a los lugares establecidos.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

El objetivo general de este estudio fue establecer la relación entre el análisis de imágenes multiespectrales de plantas con su comportamiento fisiológico, y de esta manera predecir su composición química. Específicamente, se analizó la correlación entre las imágenes multiespectrales de la planta de estudio *Jungia rugosa* y su contenido de polifenoles, extraídos de planta fresca y analizados mediante los métodos Folin Ciocalteu (fenoles totales) y HPLC (ácido neoclorogénico, clorogénico, criptoclorogénico y ferúlico).

En base a los resultados obtenidos, se observó una correlación entre las imágenes multiespectrales y el contenido de polifenoles, en particular, para las muestras obtenidas en el Cajas y San José de Raranga; estableciéndose la mejor asociación entre el contenido de polifenoles y las bandas b3_RGB, NIR, REG, RED y GREEN obtenidas de las imágenes multiespectrales. Puesto que las características espectrales de la vegetación en la región visible están dominadas por la absorción de luz por pigmentos fotosintéticos como la clorofila.

Además, los resultados analizados entre las distintas imágenes a nivel de campo y de laboratorio demostraron que existe una buena correlación de reflectancia, siendo mayor en las muestras obtenidas en el Cajas.

Los resultados obtenidos constituyen un primer screening para evaluar la posible relación de metabolitos secundarios con las imágenes multiespectrales captadas de especies vegetales consideradas como plantas medicinales. Esto permitirá ahondar en estudios posteriores y el desarrollo de modelos predictivos. Este estudio debería considerarse como un primer screening para establecer la correlación entre estos parámetros pues tiene como limitaciones el número limitado de muestras analizadas y de polifenoles específicos. Además, para lograr una correcta captura de imágenes mediante el sensor multiespectral Parrot Sequoia es necesario un clima soleado y vientos ligeros (Kharuf, 2018), condición que resultó complicado obtener durante el mes de abril 2022 debido a las irregularidades del clima por lo que fue necesario repetir las visitas a los lugares establecidos.

4.2. Recomendaciones

Para futuros estudios es necesario contar con más muestras de diferentes condiciones geográficas y evaluar otros metabolitos secundarios. Además, se debería estandarizar la técnica para capturar las imágenes pues las irregularidades del clima afectan considerablemente la recolección de datos.

REFERENCIAS

- Acosta León, K. L., Tacuamán Jácome, S. E., Vinueza Tapia, D. R., Vélez Correal, F. X., Pilco Bonilla, G. A., García Veloz, M. J., & Abdo López, S. P. (2019). Hypoglycemic activity of *Jungia rugosa* less on induced diabetic mice (*Mus musculus*).
- Araque, L., & Jiménez, A. (2009). Caracterización de firma espectral a partir de sensores remotos para el manejo de sanidad vegetal en el cultivo de palma de aceite. *Revista Palmas*, 30(3), 63-79.
- AGQ Labs Chile. (2017). Análisis químico, medir es comparar. Santiago: Labs & Technological Services.
- Almeyda, A. (2017). Estudio de la acumulación de ácido betulínico y urechitol A durante el desarrollo de *Pentalinon andrieuxii* y su relación con la metilación de ADN (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
- Avella, D. M. G., García, C. A. O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Memorias del simposio de metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro nacional de Querétaro*.
- Ávila, J., & Ruales, J. (2016). Influencia del estrés luminoso e hídrico en la postcosecha, propiedades físico - químicas y estimación de la capacidad antioxidante del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) genotipo gigante amarillo. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 30-40.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Cárdenas Rengifo, R. C. (2016). Evaluación del potencial de los bosques de *Eucalyptus globulus* y *Pinus radiata* como sumideros de carbono en el entorno del Parque Nacional Huascarán (Perú).

Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C. y Wolf, A. (2018). Metabolitos secundarios vegetales y su función general en las plantas. En *Lecciones sobre cafeína, cannabis y compañía* (págs. 3-17). Springer, Cham.

Bruning, B., Berger, B., Lewis, M., Liu, H., & Garnett, T. (2020). Approaches, applications, and future directions for hyperspectral vegetation studies: an emphasis on yield-limiting factors in wheat. *The Plant Phenome Journal*, 3(1), e20007.

Calderón, R., Navas, J., Zarco, P., & Landa, B. (2018). Detección de enfermedades de cultivos mediante imágenes hiperespectrales y térmicas de alta resolución espacial. *Agricultura 4.0*, 40-46.

Camacho-Velasco, A., Vargas-García, C. A., Rojas-Morales, F. A., Castillo-Castelblanco, S. F., & Arguello-Fuentes, H. (2015). Aplicações e desafios do sensoriamento remoto hiperespectral na geologia colombiana. *Revista Facultad de Ingeniería*, 24(40), 17-29.

Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia (Arica)*, 27(3), 59-76.

Chuvieco, E. (2000) Fundamentos de Teledetección espacial, RIALP Criollo, K., & Molina, N. (2016). “Evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado de *Jungia rugosa*”. *Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico*. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.

Díaz-García, J. (2015). Estudio de Índices de vegetación a partir de imágenes aéreas tomadas desde UAS/RPAS y aplicaciones de estos a la agricultura de precisión. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Dong MW (2006) Modern HPLC for practicing scientists: John Wiley & Sons.

Echavarria, A., Regnault, H. D. A., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., de Astudillo, L. R., & Benitez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales/Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Ciencia Unemi*, 9(20), 29-35.

Enciso, E., Arroyo, J., 2011. *Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de Jungia rugosa Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas*. [online] Scielo.org.pe.

Esquivel E, Leal L (2004) Cromatografía en fase reversa. In Métodos fisicoquímicos en Biotecnología, pp. 50. Cuernavaca: UNAM

Fiorani, F., Rascher, U., Jahnke, S., & Schurr, U. (2012). Imaging plants dynamics in heterogenic environments. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 227-235.

Flores-López, F. J., & Scott, C. A. (2000). *Superficie agrícola estimada mediante análisis de imágenes de satélite en Guanajuato, México* (No. 15). Instituto Internacional del Manejo del Agua.

García-Cervigón, D., & José, J. (2015). Estudio de índices de vegetación a partir de imágenes aéreas tomadas desde UAS/RPAS y aplicaciones de éstos a la agricultura de precisión.

García-Argáez, A. N., González-Lugo, N. M., Márquez, C., & Martínez-Vázquez, M. (2003). Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Revista de la sociedad Química de México*, 47(2), 151-154.

García, A. Á., & Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).

García, EM.; Fernández, I.; Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. <http://hdl.handle.net/10251/52056>

Gilabert, M. A., González-Piqueras, J., & García-Haro, J. (1997). Acerca de los índices de vegetación. *Revista de teledetección*, 8(1), 1-10.

Giraldo, J. C. M., Atehortúa, L., & Mejía, M. Á. P. (2014). Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 12(4), 272-281.

González, A. G., Barroso, J. T., Cardona, R. J., Medina, J. M., & Rodríguez Luis, F. (1971). Distribución de antraquinonas y compuestos naftalénicos relacionados en Rubiáceas, Bignoniáceas y Verbenáceas.

González-Calvo, C. (2012). Procesamiento a bordo de imágenes hiperespectrales de la superficie terrestre mediante hardware reconfigurable. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

Gordo, D. A. M. (2017). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104.

Gutiérrez, M., Ortiz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología*.

Herrera-Fuentes, I. A., Quimis-Ponce, K. L., Sorroza-Rojas, N. A., García-Larreta, F. S., Mariscal-Santi, W., & Mariscal-Garcia, R. E. (2017). Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos. *Polo del Conocimiento*, 2(7), 500-522.

Hornyák, M., Dziurka, M., Kula-Maximenko, M., Pastuszak, J., Szczerba, A., Szklarczyk, M., & Płazek, A. (2022). Photosynthetic efficiency, growth and secondary metabolism of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) in different controlled-environment production systems. *Scientific reports*, 12(1), 1-13.

Ivorra-Martínez, E. (enero de 2015). Desarrollo de Técnicas de visión hiperespectral y tridimensional para el sector agroalimentario. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.

Jurado, B., Aparcana, I., Villarreal, L., Ramos, E., Calixto, R., Hurtado, P., & Acosta, K. (2016). Evaluación del Contenido De Polifenoles Totales y La Capacidad Antioxidante de los Extractos Etanólicos de los Frutos de Aguaymanto (*Physalis Peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 272-279.

Kharuf, S. (2018). Análisis de imágenes multiespectrales de sembrados de caña de azúcar adquiridas con vehículos aéreos no tripulados. *TESIS DE MAESTRÍA*. Santa Clara, Cuba: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Kiani, S., van Ruth, S. M., Minaei, S., & Ghasemi-Varnamkhasti, M. (2018). Hyperspectral imaging, a non-destructive technique in medicinal and aromatic plant products industry: Current status and potential future applications. *Computers and electronics in agriculture*, 152, 9-18.

Lara, M., Diezma, B., Lleó, L., Roger, J., Garrido, Y., Gil, M., & Ruiz-Altisent, M. (2013). Aplicación de imagen hiperespectral para observar el efecto de la salinidad en hojas de lechuga. Madrid: VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas.

Leyva, E., Loredó-Carrillo, S. E., López, L. I., Escobedo-Avellaneda, E. G., & Navarro-Tovar, G. (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. *Afinidad*, 74(577).

Lira-Oliver, A. (2017). Radiación solar invisible y arquitectura. *Bitácora Arquitectura* (35), 116-124.

López, L. (2015). Diccionario de Geografía aplicada y profesional. Terminología de análisis, planificación y gestión del territorio. Universidad de León.

Mahlein, A. K., Kuska, M. T., Behmann, J., Polder, G., & Walter, A. (2018). Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: state of the art. *Annual review of phytopathology*, 56, 535-558.

Márquez, D., & Suárez, Á. (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(16), 87-109.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Méndez Gómez, M. (2015). Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno y de los sistemas antioxidantes en raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245.

Mirik, M; Michels, GJ Jr S; Kassymzhanova-Mirik, S; Elliott, NC; Catana, V; Jones, DB; Bowling, R. 2006. Using digital image analysis and spectral reflectance data to quantify damage by greenbug (Hemiptera: Aphididae) in winter wheat (en línea). *Computers and Electronics in Agriculture* 51:86-98. Consultado 15 mar. 2013. Disponible en <http://naldc.nal.usda.gov/download/6849/PDF>

Muñoz, D. (enero de 2020). Estudio del contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y antiinflamatoria del extracto obtenido de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb). *Trabajo de Titulación*. Ambato, Ecuador: Universidad de Ambato.

Morante-Carriel, J., Agnieszka-Obrebska, A., Bru-Martínez, R., & Mercedes Carranza Patiño, R. P.-S.-R. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*, 23-31.

Olivares, Barlin Orlando, & López-Beltrán, Miguel Armando. (2019). Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada aplicado al territorio indígena agrícola de Kashaama, Venezuela. *Cuadernos de Investigación UNED*, 11(2), 112-121. <https://dx.doi.org/10.22458/urj.v11i2.2299>

Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química*, 31(2), 68-81.

Pérez-Nájera, V. C., Lugo-Cervantes, E. C., Gutiérrez-Lomelí, M., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia*, 15(3), 18-22.

Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.

Reyes-Aguilar, L. (octubre de 2014). Efecto de procesamiento sobre la estabilidad de polifenoles en extracto de mango. *Proyecto especial de graduación*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana.

Trueba, G. P., & Sanchez, G. M. (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense*, 20(4), 297-306.

Trujillo, C. (2019). Estudio de la actividad antioxidante en hierbas y frutos. Universidad Nacional de Educación a Distancia.

Tsormpatsidis, E., Henbest, R. G. C., Battey, N. H., & Hadley, P. (2010). The influence of ultraviolet radiation on growth, photosynthesis and phenolic levels of green and red lettuce: potential for exploiting effects of ultraviolet radiation in a production system. *Annals of Applied Biology*, 156(3), 357-366.

Valares, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente.

Valdiviezo-Navarro, C. (2007). Segmentación de Imágenes Hiperespectrales usando Memorias Asociativas Morfológicas. Puebla, México: INAOE.

Valls, J., Lampreave, M., Nadal, M., & Arola, L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 19(2), 119-124.

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (16), 15-29.

Viera-Maza, G. (2018). Aplicación de procesamiento de imágenes para clasificación de granos de cacao según su color interno. *Tesis para optar el Título de Máster en Ingeniería Mecánico-Eléctrica con mención en Automática y Optimización*. Piura: Universidad de Piura.

Wang, C., Liu, B., Liu, L., Zhu, Y., Hou, J., Liu, P., & Li, X. (2021). A review of deep learning used in the hyperspectral image analysis for agriculture. *Artificial Intelligence Review*, 54(7), 5205-5253.

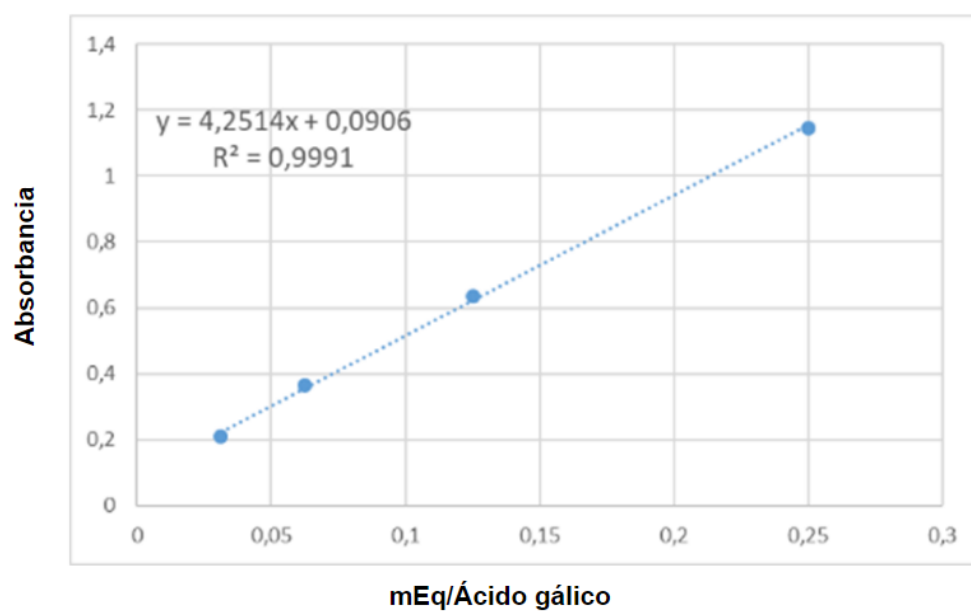
Xu, C.-C., Wang, B., Pu, Y.-Q., Tao, J.-S., & Zhang, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10), 721–731. doi:10.1016/s1875-5364(17)30103-6

Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2021). Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 854-868.

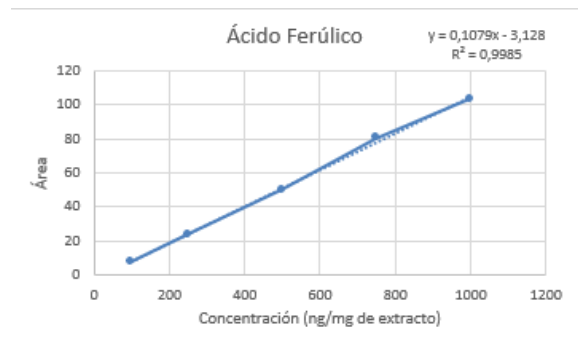
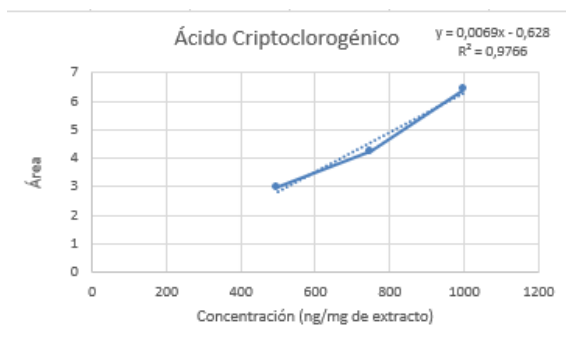
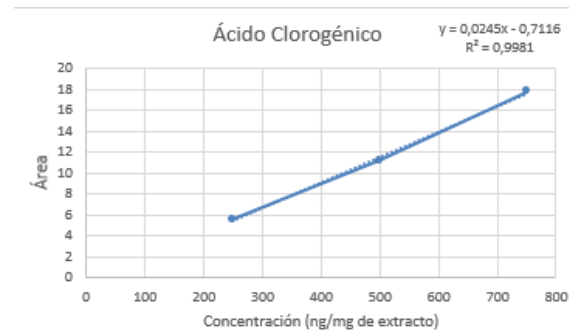
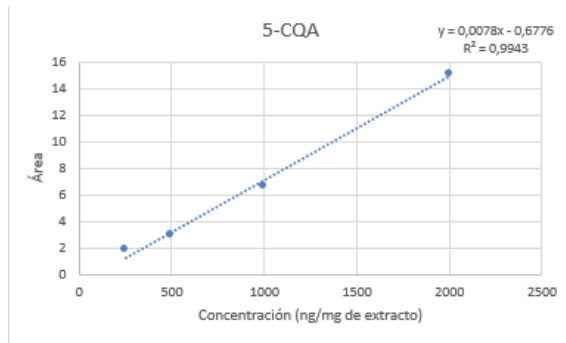
Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., & Loja, B. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte médico*, 5(2).

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu



Anexo 2. Curvas de calibración para el análisis de polifenoles mediante HPLC



Anexo 3. Protocolo de funcionamiento de la cámara

Verificar que el sensor esté ubicado hacia arriba, para que pueda recibir una incidencia de luz solar. Es importante considerar que la parte blanca del sensor no debe estar en contacto con cualquier superficie.

Revisar que esté insertada la tarjeta de memoria en el equipo.

Conectar la cámara multispectral al sensor con el cable USB.

Conectar el sensor multispectral a la batería con el cable USB.

Verificar que se encienda la luz verde tanto de la cámara como del sensor, en caso de presentar color morado, esto indica que no está calibrado correctamente.

Comprobar que la conexión Wi-Fi aparezca en la lista de redes Wi-Fi disponibles.

Caso contrario, pulsar cuatro veces el botón del sensor multispectral

Conectar el celular a la red wifi “Sequoia”.

Ir al navegador y colocar en la dirección web: 192.168.47.1

Ir al menú y dar clic en STATUS. Verificar que tenga acceso al GPS.

Confirmar que las imágenes se guarden en la tarjeta de memoria insertada.

A continuación, se presenta información de las coordenadas, latitud, altitud.

Verificar que exista una concordancia en los colores de la cámara con el canal.

Posteriormente, nos indica la temperatura a la que se encuentra la cámara, la cual debe estar en un rango de 45-65 °C; si es que llega a 70 °C se apaga el equipo y se espera hasta que se enfríe.

Ir a Menú luego a Home definir el método de captura, colocamos en Single mode.

Configurar los sensores.

Resolución: Seleccionar siempre 1,2 Mpx para mayor resolución

Profundidad: Seleccionar 10 bits.

La resolución: seleccionar 16.

Seleccionar tarjeta de memoria SD en la que se va a guardar las imágenes.

Antes de utilizar el equipo es necesario calibrar.



Figura 12. Calibración del equipo

Anexo 4. Datos del rendimiento del extracto

Salida	Muestra	Peso tubo vacío (g)	Tubo+extracto (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
1	SJ1.S1	63,6078	65,0646	1,4568	2,24
1	SJ2.S1	65,3693	66,349	0,9797	1,48
1	SJ3.S1	66,1657	67,8478	1,6821	2,48
1	CJ1.S1	65,3068	67,6783	2,3715	3,50
1	CJ2.S1	66,142	67,7877	1,6457	2,43
1	CJ3.S1	66,0045	67,316	1,3115	1,95
1	B1.S1	65,7108	68,1464	2,4356	3,57
1	B2.S1	64,6961	66,7309	2,0348	3,05
1	B3.S1	64,8088	66,0944	1,2856	1,94
2	SJ1.S2	63,0897	65,8055	2,7158	4,13
2	SJ2.S2	64,04285	68,04425	4,0014	5,88
2	SJ3.S2	65,8173	67,0708	1,2535	1,87
2	CJ1.S2	64,7864	67,5606	2,7742	4,11
2	CJ2.S2	63,6837	66,6457	2,962	4,44
2	CJ3.S2	65,3258	68,0053	2,6795	3,94
2	B1.S2	63,5978	66,3287	2,7309	4,12
2	B2.S2	64,7962	65,221	0,4248	0,65
2	B3.S2	66,1528	68,9832	2,8304	4,10

SJ: San José de Raranga; B: Biblián; CJ: El Cajas. S1: salida 1; S2: salida 2. El número ubicado junto a cada inicial del lugar de recolección indica el número de muestra (1-3).

Anexo 5. Resultados de fenoles totales obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu

Código	Lugar	# de salida	Promedio (mg Eq Ác. Gálico/mg de extracto)	DE
CJ1S1	El Cajas	1	1,353	0,062
CJ2S1			1,630	0,065
CJ3S1			1,874	0,084
SJ1S1	San José de Raranga	1	1,649	0,071
SJ2S1			1,030	0,063
SJ3S1			1,262	0,068
B1S1	Biblián	1	1,850	0,072
B2S1			1,617	0,087
B3S1			1,687	0,112
CJ1S2	El Cajas	2	2,143	0,114
CJ2S2			2,033	0,049
CJ3S2			2,024	0,091
SJ1S2	San José de Raranga	2	2,315	0,130
SJ2S2			1,553	0,095
SJ3S2			2,269	0,153
B1S2	Biblián	2	1,487	0,076
B2S2			1,882	0,093
B3S2			1,864	0,055

SJ: San José de Raranga; B: Biblián; CJ: El Cajas. S1: salida 1; S2: salida 2. El número ubicado junto a cada inicial del lugar de recolección indica el número de muestra (1-3).

Anexo 6. Datos de resultados de distintos polifenoles obtenidos por HPLC

Ácido neoclorogénico				Ácido clorogénico				Ácido criptoclorogénico				Ácido ferúlico			
Muestra	TR	Área	ng/mg extracto	Muestra	TR	Área	ng/mg extracto	Muestra	TR	Área	ng/mg extracto	Muestra	TR	Área	ng/mg extracto
JR.CB1.S1	11,107	2,46	2683,83	JR.CB1.S1	14,618	188,22	51410,98	JR.CB1.S1	15,285	2,70	3218,87	JR.CB1.S1	23,813	2,88	371,10
JR.CB2.S1	11,107	1,69	1788,58	JR.CB2.S1	14,613	100,60	24325,00	JR.CB2.S1	15,277	1,41	1734,29	JR.CB2.S1	23,784	2,16	287,98
JR.CB3.S1	11,043	1,94	1974,83	JR.CB3.S1	14,593	163,38	39398,39	JR.CB3.S1	15,261	2,36	2550,32	JR.CB3.S1	23,802	2,37	299,50
JR.CJ1.S1	11,068	1,23	2039,31	JR.CJ1.S1	14,584	71,49	24557,33	JR.CJ3.S1	15,251	2,50	2830,34	JR.CJ1.S1	23,800	1,94	391,62
JR.CJ2.S1	11,022	1,31	2119,75	JR.CJ2.S1	14,551	67,55	23219,91	JR.B1.S1	15,247	3,21	5558,83	JR.CJ2.S1	23,753	2,00	395,59
JR.CJ3.S1	11,057	2,04	2176,39	JR.CJ3.S1	14,581	173,60	44467,13	JR.B2.S1	15,215	1,02	1993,31	JR.CJ3.S1	23,801	3,89	406,16
JR.B1.S1	11,055	3,66	5560,06	JR.B1.S1	14,579	236,87	96971,38	JR.B3.S1	15,202	1,50	2571,70	JR.B1.S1	23,793	3,64	627,08
JR.B2.S1	11,034	1,46	2286,90	JR.B2.S1	14,547	85,52	29331,43	JR.CB1.S2	15,220	2,39	3975,43	JR.B2.S1	23,735	1,77	378,36
JR.B3.S1	11,017	1,83	2684,13	JR.B3.S1	14,534	135,02	46166,64	JR.CB2.S2	15,204	2,41	3673,39	JR.B3.S1	23,732	2,06	400,76
JR.CB1.S2	11,044	2,34	3512,30	JR.CB1.S2	14,554	189,26	70490,71	JR.CB3.S2	15,225	3,94	5511,70	JR.CB1.S2	23,748	2,48	472,60
JR.CB2.S2	11,000	2,24	3121,21	JR.CB2.S2	14,535	167,43	57192,23	JR.CJ1.S2	15,196	1,06	2228,85	JR.CB2.S2	23,787	2,34	422,08
JR.CB3.S2	11,036	3,01	3942,07	JR.CB3.S2	14,554	275,70	94017,27	JR.CJ2.S2	15,207	1,59	3216,80	JR.CB3.S2	23,743	2,77	455,08
JR.CJ1.S2	10,990	1,68	2742,91	JR.CJ1.S2	14,525	137,82	51403,57	JR.CJ3.S2	15,234	1,09	1774,65	JR.CJ1.S2	23,714	2,45	469,77
JR.CJ2.S2	11,006	1,38	2643,04	JR.CJ2.S2	14,534	141,44	58019,55	JR.B1.S2	15,202	1,97	2349,38	JR.CJ2.S2	23,754	2,66	536,14
JR.CJ3.S2	11,031	2,28	2712,51	JR.CJ3.S2	14,562	128,65	37714,91	JR.B3.S2	15,211	3,34	3830,56	JR.CJ3.S2	23,808	3,42	433,48
JR.B1.S2	11,002	2,77	2762,00	JR.B1.S2	14,530	152,10	38981,28					JR.B1.S2	23,760	1,98	295,78
JR.B2.S2	11,014	1,70	2768,34	JR.B2.S2	14,535	68,89	25825,94					JR.B2.S2	23,768	1,81	415,78
JR.B3.S2	11,007	3,62	3675,97	JR.B3.S2	14,536	254,36	69408,41					JR.B3.S2	23,770	3,27	394,91

Anexo 7. Test de correlación de Pearson

Lugar	Banda	Método	Valor p	
BC	RED	Total	0,1018	
	b3_RGB	Ácido neoclorogénico	0,04193	*
	b3_RGB	Ácido clorogénico	0,05018	
	b3_RGB	Ácido criptoclorogénico	0,1106	
	b3_RGB	Ácido ferúlico	0,08409	
BUC	NIR	Total	0,0001619	*
	NIR	Ácido neoclorogénico	0,08124	
	REG	Ácido clorogénico	0,1141	
	REG	Ácido criptoclorogénico	0,02748	*
	RED	Ácido ferúlico	0,0004588	*
SJC	REG	Total	0,04731	*
	REG	Ácido neoclorogénico	0,06132	
	GREEN	Ácido clorogénico	0,07229	
	GREEN	Ácido criptoclorogénico	0,06626	
	REG	Ácido ferúlico	0,03733	*
SJUC	REG	Total	0,0006172	*
	REG	Ácido neoclorogénico	8,21E-07	*
	REG	Ácido clorogénico	3,00E-05	*
	REG	Ácido criptoclorogénico	2,14E-05	*
	REG	Ácido ferúlico	3,31E-06	*
CJC	b2_RGB	Total	0,0006258	*
	RED	Ácido neoclorogénico	2,30E-06	*
	b2_RGB	Ácido clorogénico	0,01006	*
	b2_RGB	Ácido criptoclorogénico	0,003823	*
	RED	Ácido ferúlico	0,01421	*
CJUC	b3_RGB	Total	2,93E-05	*
	RED	Ácido neoclorogénico	4,04E-11	*
	b3_RGB	Ácido clorogénico	0,002466	*
	b3_RGB	Ácido criptoclorogénico	0,01376	*
	RED	Ácido ferúlico	0,002069	*

BC=Biblián “a nivel de campo” campo; BUC= Biblián “a nivel de laboratorio”; SJC= San José de Raranga “a nivel de campo” SJUC= San José de Raranga “a nivel de laboratorio”; CJC= Cajas “a nivel de campo”; CJUC= Cajas “a nivel de laboratorio”

Anexo 8. Datos obtenidos mediante matrices de comparación y regresiones lineales múltiples

BC	Correlación Imágenes/ Polifenoles		Regresión múltiple		
Método	Banda	Valor p	R ² múltiple	R ² ajustado	Valor p
Fenoles totales	RED	-0,39806395	0,3746	-0,06318	0,5692
Ácido neoclorogénico	b3_RGB	0,48378952	0,4194	0,01304	0,4659
Ácido clorogénico	b3_RGB	0,46795749	0,3902	-0,03667	0,5331
Ácido criptoclorogénico	b3_RGB	0,38898381	0,4303	0,03158	0,4412
Ácido ferúlico	b3_RGB	0,4182759	0,6119	0,3401	0,1182
BUC					
Fenoles totales	NIR	-0,77433908	0,7221	0,5275	0,03035*
Ácido neoclorogénico	NIR	-0,42180747	0,4669	0,09378	0,3611
Ácido clorogénico	REG	-0,38549868	0,5273	0,1964	0,243
Ácido criptoclorogénico	REG	-0,5185242	0,6412	0,3901	0,08693
Ácido ferúlico	RED	-0,7390070	0,6919	0,4762	0,04686*
SJC					
Fenoles totales	REG	-0,47321499	0,7139	0,5136	0,03434*
Ácido neoclorogénico	REG	-0,44943217	0,8666	0,7732	0,00111*
Ácido clorogénico	GREEN	-0,43352479	0,8026	0,6645	0,006737*
Ácido criptoclorogénico	GREEN	-0,44203268	0,8237	0,7003	0,004034*
Ácido ferúlico	REG	-0,49367212	0,8522	0,7487	0,001791*
SJUC					
Fenoles totales	REG	0,72782293	0,7159	0,5171	0,03331*
Ácido neoclorogénico	REG	0,88886554	0,8833	0,8016	0,000591*
Ácido clorogénico	REG	0,82076542	0,8723	0,7828	0,0009041*
Ácido criptoclorogénico	REG	8,287494X10-1	0,8787	0,7937	0,0007095*
Ácido ferúlico	REG	0,86652071	0,8803	0,7964	0,0006664*
CJC					
Fenoles totales	b2_RGB	-0,72728727	0,8125	0,6813	0,005339*
Ácido neoclorogénico	RED	0,8727300	0,97	0,9489	8,075e-07*
Ácido clorogénico	b2_RGB	-0,589365901	0,9045	0,8377	0,0002269*
Ácido criptoclorogénico	b2_RGB	-0,6453586	0,8534	0,7507	0,001724*

Ácido ferúlico	RED	0,5666256	0,8527	0,7497	0,001758*
CJUC					
Fenoles totales	b3_RGB	0,8213813	0,8825	0,8003	0,0006093*
Ácido neoclorogénico	RED	0,96885509	0,9508	0,9163	9,146e-06*
Ácido clorogénico	b3_RGB	0,66762997	0,7697	0,6085	0,01342*
Ácido criptoclorogénico	b3_RGB	0,56882087	0,7139	0,5136	0,03435*
Ácido ferúlico	RED	0,6760586	0,7866	0,6372	0,009568*

BC=Biblián “a nivel de campo”; BUC= Biblián “a nivel de laboratorio”; SJC= San José de Raranga “a nivel de campo” SJUC= San José de Raranga “a nivel de laboratorio”; CJC= Cajas “a nivel de campo”; CJUC= Cajas “a nivel de laboratorio”

Anexo 9. Análisis de residuos: Muestra de El Cajas a nivel del campo

