

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Evaluación de la correlación entre las imágenes multiespectrales y el contenido de carotenoides en *Jungia rugosa*

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica


Autores:

Marissa Andrea Ortega Machuca

Jennifer Patricia Suquitana Paidá

Directora:

Nancy Mirian Cuzco Quizhpi

ORCID:  0000-0003-0356-6192

Cuenca, Ecuador

2023-05-02

Resumen

Los carotenoides son compuestos que han sido ampliamente estudiados en diferentes matrices debido a su potencial actividad biológica, siendo el poder antioxidante la principal propiedad de interés. Esto conlleva el reto de buscar nuevas alternativas para facilitar su identificación y cuantificación. En Ecuador, el uso de las imágenes multiespectrales como una técnica no destructiva para predecir metabolitos secundarios en plantas medicinales es escaso. En ese contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar una posible correlación entre los valores de reflectancia extraídos de las imágenes multiespectrales con la concentración de carotenoides totales en hojas de *Jungia rugosa*.

En este estudio se determinaron carotenoides totales por espectrofotometría aplicando dos métodos de extracción, el primero por maceración a partir de hojas liofilizadas y el segundo en extractos clorofórmicos obtenidos por percolación. Para la obtención de las imágenes multiespectrales se empleó el sensor Parrot Sequoia en los sitios de recolección Llaviuco, Mosquera, San José de Raranga y en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, con el propósito de evaluar posibles variaciones en los valores de reflectancia en estos lugares.

Mediante la aplicación de un modelo de regresión múltiple, se encontró que los dos métodos de extracción son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) para predecir la cantidad de carotenoides, sin embargo, el método de extracción uno ($R^2 = 0.28$) y dos ($R^2 = 0.36$) muestran valores de R^2 ajustados que explican en un bajo porcentaje la variabilidad de los datos.

Finalmente, la investigación realizada, aunque demuestra una correlación entre la Banda RED (640-680 nm) y el contenido de carotenoides no es suficiente para ser usada como un modelo predictivo de la concentración de carotenoides, por lo que los resultados obtenidos se deben considerar únicamente como un punto de partida para análisis posteriores.

Palabras clave: Jungia rugosa, imágenes multiespectrales, carotenoides totales

Abstract

Carotenoids are compounds that have been extensively studied in different matrices due to their potential biological activity; being the antioxidant power the main property of interest. This brings the challenge of searching for new alternatives to facilitate their identification and quantification. In Ecuador, the use of multispectral images as a non-destructive technique to predict the presence of secondary metabolites in medicinal plants is limited. In this context, the objective of this study was to evaluate a possible correlation between reflectance values extracted from multispectral images with the concentration of total carotenoids in leaves of *Jungia rugosa*.

In this study, total carotenoids were determined by spectrophotometry using two extraction methods. The first method was done by maceration of freeze-dried leaves and the second one from chloroform extracts obtained by percolation. Multispectral images were obtained using the Parrot Sequoia sensor at the collection sites Llaviuco, Mosquera, San José de Raranga, and at the University of Cuenca School of Chemical Sciences to evaluate possible variations in reflectance values at these locations.

Multiple regression analysis reveals that both extraction methods are statistically significant ($p < 0.05$) for predicting carotenoid content. However, the extraction method one ($R^2 = 0.28$) and two ($R^2 = 0.36$) show adjusted R^2 values that explain a low percentage of data variability. Although this research found a correlation between the RED Band (640-680 nm) and carotenoid content, it cannot be used as a model to predict carotenoid concentration. Therefore, these results should only be considered as a starting point for further analysis.

Keywords: *Jungia rugosa*, multispectral images, total carotenoids

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract	3
Índice de contenido	4
Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Dedicatoria	9
Agradecimiento.....	10
Introducción	11
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
1.Marco teórico	13
1.1 Espectroscopía.....	13
1.2 Radiación electromagnética.....	13
1.2.1 Espectro electromagnético	14
1.2.2 Espectro visible.....	15
1.2.3 Radiación infrarroja	16
1.3 Teledetección	17
1.3.1 Tipos de resoluciones en teledetección.....	17
1.3.1.1 Resolución Espacial	17
1.3.1.2 Resolución Espectral	18
1.3.1.3 Resolución Radiométrica	18
1.4 Firma espectral o curva de reflectividad.....	19
1.5 Sistemas multiespectrales	20
1.6. Jungia rugosa	21
1.6.1 Metabolitos secundarios.....	21
1.7 Carotenoides	22
1.7.1 Estructura química de los carotenoides.....	23
1.7.2 Biosíntesis de carotenoides	24
1.7.3 Propiedades de los carotenoides	26
1.7.3.1Propiedades físicas y químicas	26
1.7.3.2 Propiedades espectroscópicas	26
1.7.4 Actividad biológica	27
2. Metodología.....	30

2.1 Tipo de diseño de investigación.....	30
2.2 Áreas de estudio y muestreo	30
2.2.1 Puntos de muestreo	30
2.3 Materiales y reactivos.....	31
2.3.1 Reactivos grado análisis	31
2.3.2 Reactivos grado HPLC.....	31
2.3.3 Equipos.....	31
2.4 Métodos.....	31
2.4.1 Recolección del material vegetal.....	31
2.4.2. Pretratamiento del material vegetal	32
2.4.2.1 Liofilización.....	33
2.4.3 Preparación de extractos	33
2.4.3.1 Obtención del extracto por percolación.....	33
2.4.4 Análisis químico de carotenoides.....	34
2.4.4.1 Determinación de carotenoides totales	34
2.4.4.1.1 Cuantificación de carotenoides en hojas liofilizadas.....	34
2.4.4.1.2 Cuantificación de carotenoides en el extracto lipofílico.....	34
2.4.4.2 Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	36
2.4.4.2.1 Preparación de las muestras	36
2.4.4.2.2 Procesamiento	36
2.4.5 Captura de imágenes multiespectrales	37
2.4.5.1 Descripción del equipo	37
2.4.5.2 Procedimiento para la adquisición de imágenes	39
2.4.5.2.1 Protocolo de Instalación y funcionamiento del sensor Parrot Sequoia....	39
2.4.5.3 Procesamiento de las imágenes multiespectrales	40
2.5 Análisis Estadístico.....	43
2.5.1 Regresión lineal múltiple	43
3. Resultados y discusión	45
3.1 Determinación de carotenoides	45
3.1.1 Cuantificación de carotenoides totales en hojas liofilizadas	45
3.1.2 Cuantificación de carotenoides totales en el extracto lipofílico	45
3.1.3 Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	46
3.2 Análisis de la correlación entre imágenes espectrales y métodos de laboratorio	48
3.2.1 Método de extracción 1	49

3.2.2 Método de extracción 2.....	50
3.3 Discusión de resultados.....	53
4. Conclusiones y recomendaciones.....	56
4.1 Conclusiones.....	56
4.2 Recomendaciones.....	56
Referencias	57
Anexos.....	64

Índice de figuras

Figura 1. Radiación electromagnética polarizada plana	14
Figura 2. Espectro Electromagnético.....	15
Figura 3. Frecuencias y longitudes de onda del Espectro Visible.	16
Figura 4. Porción infrarroja del espectro electromagnético y sus diferentes regiones.	16
Figura 5. Curvas de reflectancia espectral típicas de distintos materiales	20
Figura 6. Ruta biosintética de los terpenoides.	22
Figura 7. Estructura del licopeno y β caroteno	23
Figura 8. Estructura química de los carotenoides.....	24
Figura 9. Rutas biosintéticas de los carotenoides.....	25
Figura 10. Reacciones de desaturación de la cadena poliénica y ciclación del licopeno	26
Figura 11. Estructura del cromóforo del licopeno	27
Figura 12. Espectro de absorción de luz UV-visible de los carotenoides.....	27
Figura 13. Coordenadas de los sitios de recolección.....	30
Figura 14. Captura de imágenes multiespectrales.....	39
Figura 15. Fotografía en diferentes bandas espectrales: GREEN, RED, REG, NIR y RGB.40	
Figura 16. Cuadro de georreferenciación	41
Figura 17. Cuadro de diálogo de la herramienta Extract Multi Value to Points	41
Figura 18. Tabla de atributos con los datos de reflectancia de cada banda.....	42
Figura 19. Extracción de los valores de cada píxel mediante la función Identify.....	42
Figura 20. Gráfica de residuos vs valores ajustados del método de extracción 1	52
Figura 21. Gráfica de residuos vs valores ajustados del método de extracción 2	53

Índice de tablas

Tabla 1. Carotenoides con actividad provitamina A.	28
Tabla 2. Coordenadas geográficas de los sitios de recolección.....	30
Tabla 3. Compuestos químicos extraídos en cada fase de extracción.....	35
Tabla 4. Longitudes de onda y características de las bandas espectrales	38
Tabla 5. Contenido de carotenoides totales en hojas liofilizadas de las salidas 1 y 2	45
Tabla 6. Contenido de carotenoides totales en el extracto en las salidas 1 y 2.....	45
Tabla 7. Resultados de la determinación de carotenoides por HPLC	48
Tabla 8. Modelo de regresión del método de extracción 1	49
Tabla 9. Resultados del análisis estadístico incluyendo bandas GREEN y RED	50
Tabla 10. Modelo de regresión del método de extracción 2.....	50
Tabla 11. Resultados del análisis estadístico incluyendo las bandas RED, b1_RGB y b2_RGB.....	51
Tabla 12. Resultados de las pruebas para verificar los supuestos de la regresión lineal múltiple	52

Dedicatoria

A Dios por ser mi guía concediéndome Fe, Esperanza y Sabiduría para culminar mis estudios universitarios, y a quien le agradezco por brindarme salud y vida para ello.

A mis padres Paul y María Luisa, por ser mis pilares fundamentales, quienes me han acompañado y apoyado incondicionalmente durante todo mi trayecto en la carrera y en mi vida, por formarme con valores y disciplina, demostrados con su buen ejemplo. Gracias por haberme impulsado a seguir adelante brindándome su confianza y el aliento que necesitaba para concluir con esta meta.

A mi hermana María Paula, quien me inculcó las bases de la responsabilidad, perseverancia, la importancia del estudio y el deseo de superación, le agradezco por creer en mí y siempre hacerme sonreír.

A mi abuelita María Luisa Segarra, por brindarme su cariño y palabras alentadoras, por motivarme a seguir adelante frente a las adversidades, y por sus oraciones constantes, quien desea con gran anhelo observarme cumplir este objetivo.

A mi prima Gabriela, mis tías, primos, compañeros y amigos por compartir momentos valiosos e inolvidables que de alguna forma fueron parte de este camino para cumplir mi sueño.

Marissa

A Dios por brindarme salud y permitirme cumplir esta etapa.

A mi familia, por acompañarme durante todo este proceso, por todo su cariño y apoyo. En especial a mi mamá Anita por confiar en mí y apoyarme siempre. Gracias por enseñarme a ser fuerte y perseverante y por amarme incondicionalmente. Es mi inspiración y la persona más importante en mi vida.

A mis hermanos: Ariana y Brian por estar siempre conmigo y motivarme a cumplir mis sueños.

A Carmita y Víctor, por aconsejarme y brindarme su apoyo incondicional.

Jennifer

Agradecimiento

A nuestros padres y familiares por brindarnos su apoyo para cumplir esta meta.

A nuestra tutora, Dra. Nancy Cuzco por brindarnos su conocimiento, tiempo, y compromiso para el desarrollo de este trabajo de titulación. Agradecemos su paciencia, calidez y amabilidad durante este proceso.

A nuestro asesor Ing. Aleksandr Khachatryan por contribuir activamente en el desarrollo de esta investigación y ayudarnos con el análisis estadístico.

Al Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, de manera especial a las Dras. Salomé Zea y Jessica Calle por ser nuestra guía y apoyo durante el procesamiento experimental.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de manera especial al Ing. Mateo López e Ing. Luis Medina por contribuir con sus conocimientos en el uso de la técnica multiespectral.

A todos quienes formaron parte de este proceso, les estaremos siempre agradecidas.

Marissa y Jenniffer

Introducción

A lo largo de los años se ha evidenciado un aumento exponencial en el estudio de diferentes especies vegetales, debido a que son una fuente importante de componentes biológicamente activos que pueden ser usados en el tratamiento de diferentes patologías (Pujol et al, 2020). La actividad farmacológica que poseen las plantas está asociada principalmente a la presencia de metabolitos secundarios, compuestos que no intervienen directamente en los procesos de crecimiento y desarrollo, sino que se sintetizan en respuesta a restricciones nutritivas y ambientales y confieren a las plantas propiedades biológicas de gran importancia (Carranco, Calvo & Romo, 2011).

Entre los principales metabolitos secundarios se pueden mencionar a los polifenoles, quinonas, flavonoides, taninos, cumarinas y carotenoides, siendo estos últimos ampliamente conocidos por su actividad antioxidante en las células, al actuar en la depuración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas como parte del metabolismo celular, y a los cuales se le ha asociado en la patogénesis de varias enfermedades degenerativas (Castillo, Zavala, Carrillo, 2011). Por lo antes mencionado, los carotenoides se han convertido en moléculas de gran interés, siendo necesaria la búsqueda de nuevas técnicas que permitan su caracterización de forma más eficiente, ya que su análisis por métodos convencionales es complejo y requiere procesos exhaustivos de extracción, además del uso de solventes tóxicos que representan un elevado riesgo para el operario y un alto costo por el uso de reactivos y manejo de residuos (Wang et al., 2018).

Para solucionar estos inconvenientes se plantea el uso de herramientas tecnológicas como la teledetección, basada en sensores multispectrales, una técnica no destructiva que proporciona información espectral detallada de una muestra al capturar el espectro de reflectancia en la región del espectro visible-infrarrojo cercano (Gómez, Velázquez & Jiménez, 2016). En consecuencia, la técnica brindaría notables ventajas tales como: menor exposición del analista a agentes tóxicos, optimización de recursos y la reducción del impacto ambiental, al evitar un muestreo destructivo de las plantas (Wang et al., 2018).

Estudios recientes han demostrado que es factible estimar el contenido de clorofila y carotenoides en las plantas utilizando la reflectancia de las hojas, ya que la respuesta espectral de la vegetación en la región visible (400-700 nm) está gobernada por los pigmentos fotosintéticos. En el caso de los carotenoides presentan un pico máximo de reflectancia a 550 nm (Zarco et al., 2013).

Hasta la actualidad, en nuestro país no se han reportado investigaciones científicas que respalden el uso de la técnica de imágenes multiespectrales para el análisis fitoquímico predictivo in situ en las plantas medicinales. La bibliografía reportada describe que su principal aplicación es la agricultura de precisión, área en donde se usa para la detección temprana de plagas y enfermedades asociadas a los cultivos, detección de alteraciones fisiológicas, entre otras (Guerrón et al., 2022; Quiroz & Tenorio, 2020).

Objetivos

Objetivo general

- Establecer la correlación entre la técnica de imágenes multiespectrales y la concentración de carotenoides totales en *Jungia rugosa*.

Objetivos específicos

- Analizar los resultados obtenidos de las imágenes multiespectrales y la concentración de carotenoides a partir de hojas liofilizadas y extractos lipofílicos de *Jungia rugosa*.
- Evaluar la concordancia estadística entre los métodos de laboratorio y las mediciones de reflectancia usando un modelo de regresión múltiple.
- Comparar la concentración de carotenoides totales en distintos sitios de recolección de *Jungia rugosa*.

1.Marco teórico

1.1 Espectroscopía

La espectroscopía trata de la relación de distintos tipos de radiación con la materia, principalmente entre la radiación electromagnética y la materia, así como también las interacciones con otras formas de energía tales como ondas acústicas y los haces de partículas como iones o electrones. Los métodos espectrométricos consisten en la medición de la intensidad de la radiación con un transductor fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico (Skoog, Holler & Crouch,2018).

Cuando la luz incide sobre un objeto parte de la luz se dispersa o refleja, y otra parte se absorbe. De la parte inicial que se absorbe, una parte se emite más tarde como luz de diferente longitud de onda. La espectroscopía intenta determinar qué energías y cantidades específicas de luz incidente son absorbidas por sustancias específicas, y aquellas que se vuelven a emitir más tarde.

Los espectrómetros revelan en registros como una serie de longitudes de onda o frecuencias específicas, las energías luminosas absorbidas y emitidas. Estos registros, denominados espectros, brindan información importante relacionada con la estructura atómica y molecular de las sustancias sobre las que se concentra la energía electromagnética. Estos espectros proporcionan "huellas dactilares" que son características y, por lo tanto, están relacionadas de forma única con diferentes elementos y compuestos (OPTEC, 2008).

1.2 Radiación electromagnética

Es un fenómeno de transporte de energía que puede ser únicamente observado por su interacción con la materia. La radiación electromagnética se produce por la vibración de partículas cargadas y consiste en una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes que se propagan a través del espacio a lo largo de un camino lineal y a una velocidad constante, que en el vacío es igual a la velocidad de la luz, $c = 3 \times 10^8$ m/seg (Verhey & Petti, 2010).

Las oscilaciones en los campos eléctricos y magnéticos son perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación de la onda. En la figura 1 se muestra el campo eléctrico oscilante en rojo y el campo magnético oscilante en azul, la amplitud de la radiación, A , y su longitud de onda, λ , que es la distancia entre dos crestas de la onda sinusoidal. Algunas ondas electromagnéticas son muy largas y son medidas en metros, mientras que otras son muy cortas y son medidas en nanómetros. El número de crestas que pasan por un mismo punto

en un segundo se describe como la frecuencia de la onda. Una onda o ciclo por segundo, se denomina hertz o hercios (Northeastern University, 2016).

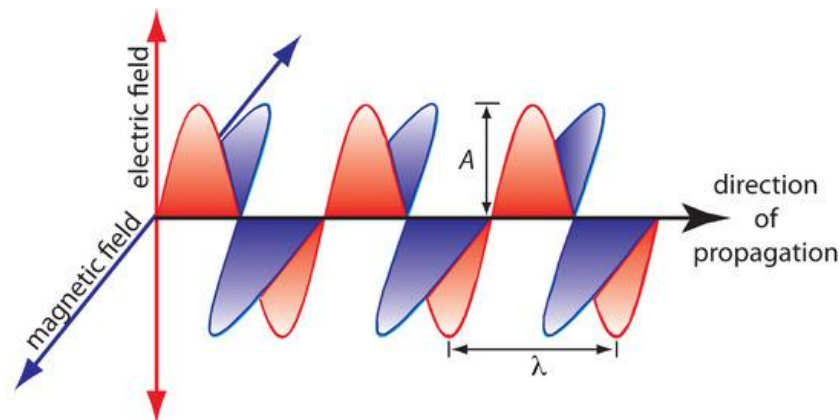


Figura 1. Radiación electromagnética polarizada plana (Northeastern University, 2016)

Aunque la radiación electromagnética se describe convencionalmente como ondas de energía, la física cuántica la describe como una perturbación eléctrica y magnética, que no contiene masa ni carga, pero viaja en paquetes de energía similares a partículas llamadas fotones (Verhey & Petti, 2010).

1.2.1 Espectro electromagnético

El espectro electromagnético (EM) es el conjunto de todas las frecuencias (número de ciclos de la onda por unidad de tiempo) posibles a las que se produce la radiación electromagnética. Como se observa en la figura 2, consiste en diferentes regiones y se compone de ondas de radio, microondas, infrarrojo, espectro visible, UV, rayos X y rayos gamma. Cada región corresponde a una transición atómica o molecular de tipo específico, correspondiente a diferentes energías. Incluye una amplia gama de longitudes de onda y frecuencias, las cuales están inversamente relacionadas entre sí, es decir que cuanto más corta es la longitud de onda, mayor es la frecuencia, y cuanto mayor sea la longitud de onda, menor será la frecuencia (Ordoñez, 2012).

El ojo humano sólo puede detectar una pequeña porción de este espectro llamado luz visible, una radio detecta una porción diferente del espectro y una máquina de rayos X usa otra porción (NASA, 2010).

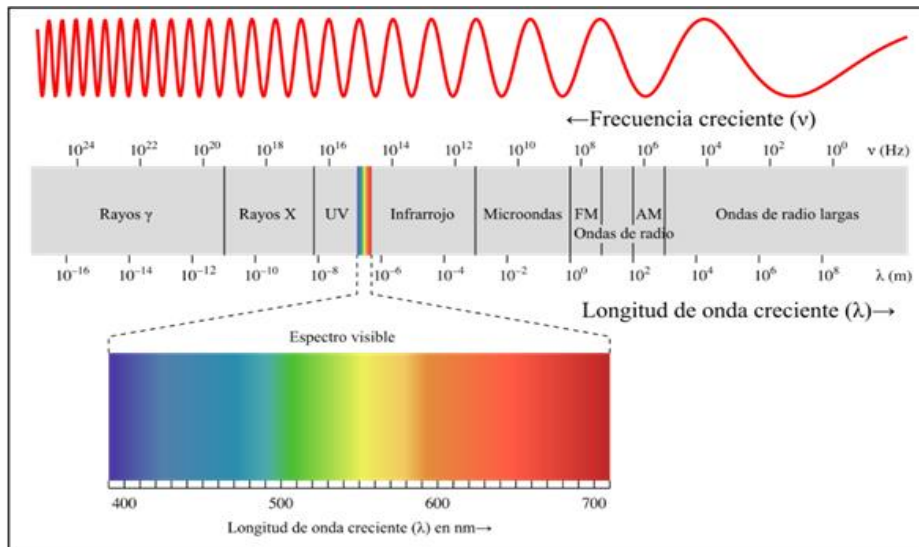


Figura 2. Espectro Electromagnético (EM) (Ronan, 2008)

1.2.2 Espectro visible

El espectro visible es una pequeña porción del espectro electromagnético, que el ojo humano es capaz de percibir, el mismo se encuentra entre la radiación ultravioleta y la infrarroja, por lo que corresponde a un rango de longitud de onda desde los 380 nm hasta los 780 nm (García, 2015).

La luz blanca percibida es la combinación de todas las longitudes de onda visibles, sin que alguna predomine sobre las otras, por lo tanto, este espectro incluye todos los colores que pueden ser producidos por la luz visible a distintas longitudes de onda. Así, los azules y violetas corresponden a longitudes de onda cortas, el rojo y el naranja a longitud de ondas largas, y en el medio encontramos el verde y el amarillo, tal y como se muestran en la figura 3. El ojo humano discrimina entre las distintas frecuencias y longitudes de onda de la región visible por la sensación de color (Moya, 2014).

La espectroscopía se aplica en radiocomunicaciones para la astronomía y el estudio de las propiedades de objetos distantes, por lo que se puede aplicar para obtener información espectral de las plantas en la porción del espectro visible (Moya, 2014).

La forma de la curva de reflectancia espectral de las plantas se rige por los efectos de la absorción de clorofila y otros pigmentos de las hojas. Las plantas sanas tienen una reflectividad baja en el visible, debido a que la clorofila absorbe la luz eficazmente, pero se produce un pico de reflectancia en la longitud de onda del color verde (Román & Vargas, 2013).

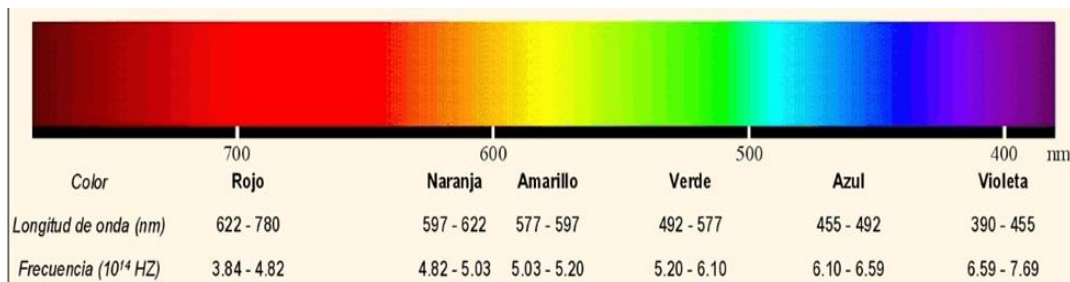


Figura 3. Frecuencias y longitudes de onda del Espectro Visible (Ariza, 2021)

1.2.3 Radiación infrarroja

Es una porción del espectro electromagnético de mayor longitud de onda que la luz visible y comprende un rango de 700 nm a 1 mm (0,7-1000 μm), dependiendo de diversas clasificaciones. A la radiación infrarroja también se le denomina radiación térmica, ya que cualquier cuerpo que tenga una temperatura superior al cero absoluto (0° K, -273° K) emite rayos infrarrojos y su cantidad es directamente proporcional con la temperatura del objeto (Moya, 2014).

La región infrarroja no se puede ver, pero se puede detectar, y cómo se observa en la figura 4, está se subdivide en cinco regiones. Al NIR y SWIR se les denomina infrarrojo reflejado, y al MWIR y LWIR como infrarrojo térmico o emitido (Fontal, 2008; Bhowmick et al., 2011).

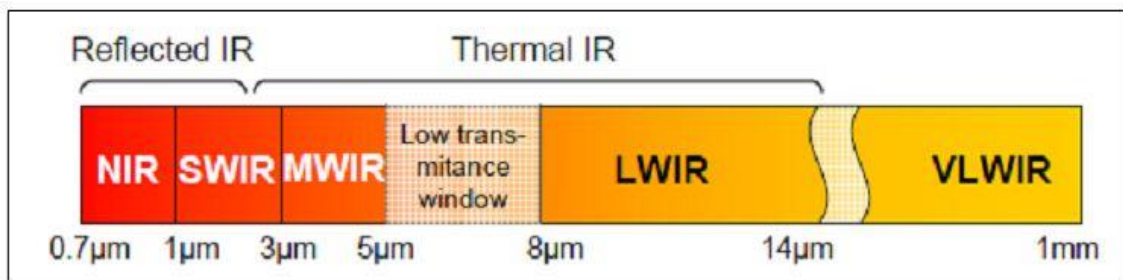


Figura 4. Porción infrarroja del espectro electromagnético y sus diferentes regiones NIR: infrarrojo cercano, SWIR: infrarrojo de longitud de onda corta, MWIR: infrarrojo medio, LWIR: infrarrojo lejano, VLWIR: infrarrojo de onda muy larga (Bhowmick et al., 2011)

La radiación de la región del infrarrojo reflejado se usa con fines de detección remota de forma similar a la radiación de la parte visible. La mayoría de los equipos de sistemas espectrales operan entre 400 y 2500 nm (VIS, NIR y SWIR). En cambio, en la zona del infrarrojo térmico la radiación emitida de los objetos es en forma de calor (Grajeda, 2018).

La reflectancia en el infrarrojo es utilizada como una manera de determinar si la vegetación se encuentra en un estado óptimo, ya que tiene una alta sensibilidad al tipo, la densidad, el

contenido de agua y la salud general de las plantas. En las hojas saludables, los pigmentos tienden a reflejar longitudes de onda del rojo y cercanas al infrarrojo, alcanzando valores de 40-50% para la mayoría de las plantas. Esta alta reflectancia se debe principalmente a las interacciones con la estructura celular interna de las hojas. La mayor parte de la energía restante se transmite, y puede interactuar con otras hojas (Román & Vargas, 2013).

1.3 Teledetección

La teledetección o detección a distancia se fundamenta en el registro de la radiación electromagnética empleando sensores remotos de diferentes tipos que no se encuentran en contacto físico directo con los objetos que emiten la energía (Ardila, Quintero, 2013).

El uso de estos sensores permite la extracción de la información al registrar la radiación reflejada o emitida por los objetos en diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético, teniendo en cuenta que el porcentaje de reflectancia varía en función de sus características físicas y químicas individuales. A cada una de estas regiones se denomina banda o canal.

Para que un sensor remoto recopile y registre la energía electromagnética, debe residir en una plataforma estable alejada del objetivo o la superficie que se está observando. Existen dos tipos diferentes de plataformas: aquellas situadas dentro de la atmósfera como los vehículos aéreos no tripulados VANT o las que se ubican en una nave espacial o satélite fuera de la atmósfera terrestre (Manosalvas, 2019).

1.3.1 Tipos de resoluciones en teledetección

Las especificaciones de la plataforma y del sensor determinan las resoluciones de los datos de teledetección, espacial, espectral y radiométrica.

1.3.1.1 Resolución Espacial

La mayoría de las imágenes de sensores remotos están estructuradas como un ráster o cuadrícula de píxeles, los cuales están dispuestos en columnas y filas. Los píxeles son las unidades más pequeñas y representan un área determinada en la imagen (Román & Vargas, 2013).

La resolución espacial está definida por el tamaño de un píxel y ésta representa la extensión de la imagen que cubre cada píxel y la distancia de muestreo del suelo. El detalle perceptible en una imagen depende de la resolución espacial del sensor, que, con una resolución

creciente, la identificación de las superficies de objetos aún más pequeñas se hace posible (Liang & Wang, 2020).

1.3.1.2 Resolución Espectral

Es la capacidad que posee un sensor para diferenciar múltiples rangos espectrales y de esta forma obtener los datos en varias longitudes de onda del espectro electromagnético. La resolución espectral para un sistema de teledetección está definida por el número y el ancho de las bandas espectrales que el sensor puede detectar. La absorción o reflexión de los materiales de la superficie terrestre se captura con precisión con sensores de alta resolución espectral (Kotawadekar, 2021).

Comúnmente un sensor multiespectral recolecta información en múltiples bandas, entre 3 y 7 bandas espectralmente anchas y separadas, aunque también existen satélites que cuentan con 10 o 15 bandas. Cuantas más bandas incluya un sensor será mejor, ya que cada banda constituye una variable para caracterizar la superficie captada a través del espectro electromagnético. Además, es preferible que estas bandas sean estrechas para que su poder discriminante aumente (Román & Vargas, 2013).

Además de los sensores multiespectrales, también hay satélites con sensores hiperespectrales que capturan información en más de 100 bandas espectrales, con anchos de banda mucho más estrechos que en los sensores multiespectrales pudiendo llegar a ser inferiores al nanómetro. Esto permite generar un gráfico detallado de la reflectancia en función de la longitud de onda del objeto, conocido como curva de reflectancia espectral (Van Leeuwen, 2009; Parody & Zapata, 2018).

1.3.1.3 Resolución Radiométrica

Cada píxel tiene un valor para cada una de las bandas espectrales, y este es la representación numérica de la cantidad de energía electromagnética reflejada que es captada por el sensor, y está representada en bits. Entonces, el número de bits representa la energía registrada y por tanto define la resolución radiométrica. Las características radiométricas determinan la sensibilidad del sensor para detectar la mínima magnitud de energía electromagnética, y mientras mayor es la resolución radiométrica, mayor es la capacidad para discriminar variaciones muy leves de energía (Román & Vargas, 2013).

1.4 Firma espectral o curva de reflectividad

El Sol es el emisor de energía electromagnética más usual para imágenes de teledetección, éste emite la radiación que incide primero en la atmósfera, en donde los gases presentes interactúan con la radiación absorbiéndola, reflejándola o transmitiéndola. Una vez que la radiación solar ha traspasado la atmósfera interactúa con la superficie terrestre encontrándose con todo tipo de materiales diferentes: agua, tierra, nieve, zonas de vegetación, etc. Cada tipo de superficie interactúa con la radiación de diferente manera, absorbiendo unas longitudes de onda muy concretas y reflejando otras diferentes en unas proporciones determinadas (Ávila-Guzmán, 2019).

Cuando se emplean sensores ópticos en los métodos de teledetección, la propiedad más importante para identificar las características individuales de los objetos es la reflectancia espectral, es decir la relación de la intensidad de la luz reflejada desde una superficie dividida por la intensidad de la luz incidente. Cada superficie tiene diferentes propiedades de reflectancia espectral, llamada firma o signature espectral, como se pueden visualizar en la figura 5 algunos ejemplos de materiales con sus respectivas curvas de reflectancia espectral (Horning, 2019).

Un ejemplo de un material con una firma espectral distintiva es la vegetación, la cual está condicionada por los pigmentos fotosintéticos clorofilas, carotenos y xantofilas que tienen un gran efecto en la reflectancia visible. Las clorofilas absorben las longitudes de onda azul (480 nm) y roja (670 nm) que induce un pico de reflectancia en la región verde (550 nm), siendo este último el responsable del color característico de la vegetación sana.

En la región del infrarrojo cercano (NIR) es la estructura interna de la hoja el factor que condiciona los valores de reflectancia, ya que una disminución en dichos valores indica alteraciones en la vegetación (Botero, 2009).

Durante el otoño, cuando el contenido de clorofila disminuye, existe menos absorción y, proporcionalmente, más reflexión de las longitudes de onda rojas, lo que hace que las hojas se vean rojas o amarillas.

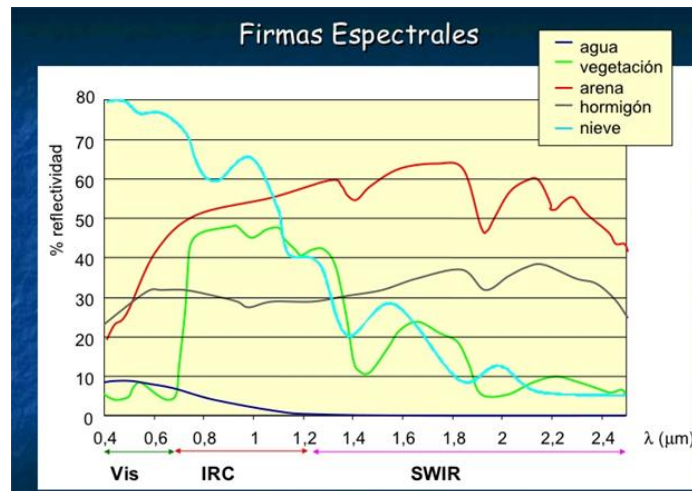


Figura 5. Curvas de reflectancia espectral típicas de distintos materiales. Vis: región visible; NIR/IRC: infrarrojo cercano; SWIR: Short Wavelength InfraRed (Infrarrojo de onda corta). (Volante, 2012)

1.5 Sistemas multispectrales

El método de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) irradia diferentes regiones de onda del infrarrojo y luego mide la absorción o reflexión de las moléculas. Este ha demostrado su capacidad para llevar a cabo una evaluación simultánea de diferentes rasgos de calidad con una precisión comparable a la de los métodos analíticos tradicionales de química. Sin embargo, la información espectral extraída por este método se limita a solo una pequeña porción de una muestra donde se coloca la sonda de medición, sin considerar la información espacial. Para solucionar esta desventaja, se puede combinar información espectral y espacial utilizando técnicas de imagen hiperespectral y multispectral (ElMasry et al., 2019). Las imágenes multibanda o multispectrales corresponden a una técnica de imagen no invasiva en la que se capturan imágenes separadas registradas conjuntamente, una para cada banda espectral en todo el espectro electromagnético, pero que normalmente incluye a las regiones visibles (VIS) y el infrarrojo cercano (NIR) (Amigo, 2019). Éstas proporcionan información tanto espacial como espectral de cada píxel y conforman una matriz de datos numéricos que representan la intensidad de la energía electromagnética reflejada o emitida por los objetos en la superficie terrestre (Sánchez et al., 2018).

En la teledetección satelital los escáneres multispectrales o Multi Spectral Scanners (MSS) son sensores diseñados para obtener imágenes de los objetos mientras recorren el campo de visión. El sensor enfoca la luz entrante en el detector o serie de detectores para mapear

las variaciones de energía. El intervalo de longitud de onda particular al que responde el detector determina la banda espectral que representa la imagen (Sánchez et al., 2018).

Se debe considerar que los sensores multiespectrales sólo permiten obtener una estimación de la curva espectral del objeto de análisis, ya que al no poseer bandas espectrales contiguas como en el caso de los sensores hiperespectrales, tienen una resolución espectral más baja.

1.6. Jungia rugosa

La especie botánica *Jungia rugosa* comúnmente conocida como “carne humana” es una planta semi arbustiva que pertenece a la familia *Asteraceae*.

Esta especie crece de forma silvestre en altitudes entre 1500 y 4000 metros sobre el nivel del mar (msnm) en climas fríos y húmedos, siendo característica de las regiones andinas de Ecuador (Calvopiña et. al, 2021).

Las hojas de *Jungia rugosa* han sido utilizadas ancestralmente para tratar lesiones de la piel en forma de emplastos o decocciones, como infusión en trastornos gástricos, renales y en el tratamiento de afecciones bronquiales.

Los metabolitos secundarios relacionados con su actividad antiinflamatoria y antioxidante incluyen: compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, polifenoles y tetraterpenoides, entre los que se encuentran los carotenoides (Béjar, 2016).

1.6.1 Metabolitos secundarios

A diferencia de otros organismos, las plantas utilizan vías metabólicas alternativas para producir metabolitos secundarios (MS), moléculas con diversas estructuras químicas que cumplen funciones biológicas de gran interés.

La biosíntesis de MS comienza a partir de vías básicas, como la glucólisis o las vías del ácido shikímico, y posteriormente se diversifica, dependiendo del tipo celular, la etapa de desarrollo y las señales ambientales. Otras vías importantes son la del ácido mevalónico y el ácido malónico (Li et al., 2020).

La ruta biosintética de terpenoides se compone de tres etapas: la primera es la formación de intermediarios isopentil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP), que son precursores comunes de los terpenoides y podrían usarse indistintamente en el citoplasma y los plastidios; la segunda es la síntesis de tres precursores directos geranil difosfato (GPP, C10), farnesil difosfato (FPP, C15) y geranilgeranil difosfato (GGPP, C20); y la última etapa da lugar a la formación de terpenoides con diferentes estructuras y funciones mediante reacciones de

1.7.1 Estructura química de los carotenoides

La mayoría de los carotenoides tiene como estructura básica un esqueleto tetraterpeno de 40 átomos de carbono, constituido por la unión de ocho unidades de isopreno que forman una larga cadena lineal con una simetría inversa en el centro de la molécula.

La principal característica estructural de los carotenoides es la presencia de un sistema de dobles enlaces conjugados denominada cadena de polieno (Carranco & Calvo, 2011). En la figura 7 se detalla la estructura de polieno conjugado del licopeno y β caroteno.

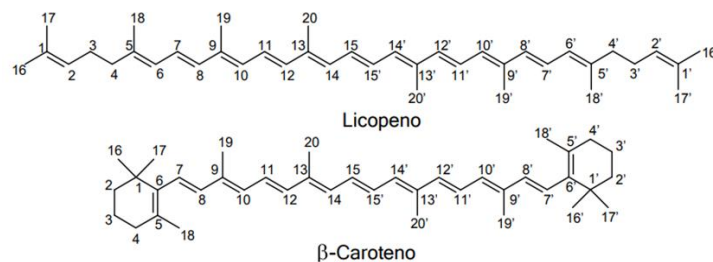


Figura 7. Estructura del licopeno y β caroteno (Mellado, 2013)

La estructura del polieno conjugado, es responsable de la capacidad de absorción de la luz en la región visible del espectro, reactividad, forma, localización en las estructuras subcelulares y su papel en los procesos de transferencia de energía dentro del aparato fotosintético (Meléndez et al., 2017; Maoka, 2020).

Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica como el licopeno, o poseer distintas estructuras cíclicas de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos, como el β -caroteno.

Además, pueden existir en diversas conformaciones cis/trans, aunque la mayoría de los carotenoides presentes en la naturaleza se encuentran principalmente en la forma más estable trans (Meléndez et al., 2019).

En función de su estructura química los carotenoides se clasifican en:

- **Carotenos** (β -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno, licopeno, fitoeno y fitoflueno). Son hidrocarburos puros formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. Alrededor de 50 tipos de carotenos están presentes en la naturaleza (Flores et al., 2017).
- **Xantofilas:** Contienen una o más funciones oxigenadas enlazadas al anillo de seis carbonos. Por ejemplo: el grupo epoxi se encuentra en la violaxantina, neoxantina y

fucoxantina, el grupo hidroxilo en la luteína, β -criptoxantina y zeaxantina y el grupo funcional cetona en la astaxantina y cantaxantina (Meléndez et al, 2019).

Las xantofilas con grupos hidroxilo pueden encontrarse libres en la naturaleza o como ésteres de ácidos grasos, glucósidos, sulfatos y complejos proteicos (Merhan, 2017).

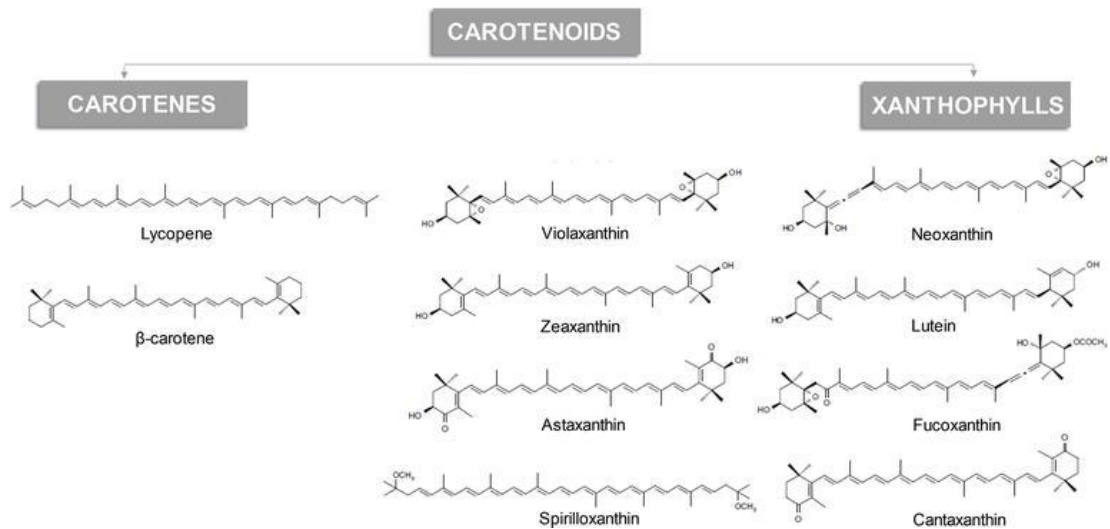


Figura 8. Estructura química de los carotenoides (Maoka, 2020)

1.7.2 Biosíntesis de carotenoides

Todos los carotenoides se derivan del precursor isoprenoide isopentil difosfato (IPP), el cual, en las plantas superiores posee dos rutas independientes para ser producido. Por un lado, el IPP puede generarse en el citosol a través de la ruta del ácido mevalónico (MVA), o en los plastidios a partir de la ruta del metil eritritol 4-fosfato (MEP) o vía del no mevalonato. No obstante, es su isómero alílico el dimetilalilpirofosfato (DMAPP) el sustrato inicial activado para la formación de compuestos poliisoprenoides.

La adición secuencial de 3 moléculas de IPP a una de DMAPP a través de condensaciones entre los carbonos 1 y 4 de ambos compuestos da lugar al geranilgeranil pirofosfato (GGPP). En la primera etapa específica de la síntesis de carotenoides, la enzima fitoeno sintasa (PSY) cataliza la condensación de dos moléculas de geranilgeranil difosfato (GGPP) para formar el 15-cis-fitoeno (C40), considerado el primer compuesto lipofílico en la ruta de biosíntesis (Chacón & Esquivel, 2013). La ruta biosintética del fitoeno se describe en la figura 9.

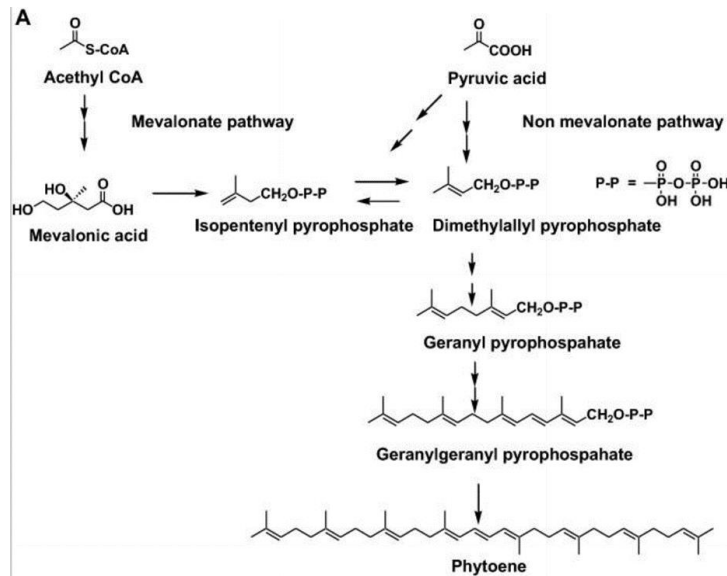


Figura 9. Rutas biosintéticas de los carotenoides (Maaka, 2020)

Posteriormente, el fitoeno (incolore) es convertido en licopeno (carotenoide coloreado) a través de una serie de reacciones de desaturación e isomerización consecutivas que introducen en cada etapa un nuevo doble enlace, con la consecuente extensión del cromóforo.

Una vez obtenido el licopeno se pueden tomar dos vías para la ciclación de los extremos de la molécula. Cuando intervienen tanto la ϵ licopeno ciclasa (ϵ -LCY) y la β -licopeno ciclasa (β -LCY) se produce el α -caroteno, y cuando se ciclan los dos extremos con la β -licopeno ciclasa (β -LCY) se forma el β -caroteno, como se observa en la figura 10 (Chacón & Esquivel, 2013).

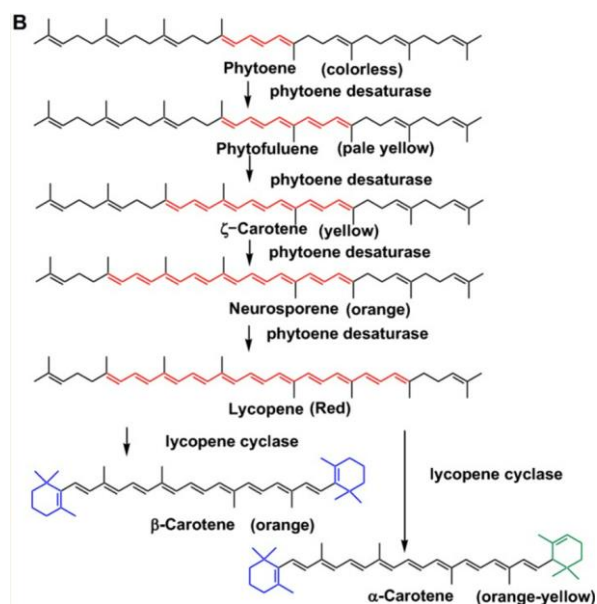


Figura 10. Reacciones de desaturación de la cadena poliénica y ciclación del licopeno (Maoka, 2020)

Los últimos pasos de la ruta metabólica implican la generación de funciones oxigenadas como hidroxilaciones, epoxidaciones y otras modificaciones estructurales en los extremos para producir las xantofilas.

Así, por ejemplo, el β -caroteno sufre dos hidroxilaciones secuenciales de los anillos β para producir primero β -criptoxantina y luego zeaxantina (Nisar et al., 2015).

1.7.3 Propiedades de los carotenoides

1.7.3.1 Propiedades físicas y químicas

El grado de solubilidad de los carotenoides depende del tipo de sustituyente presente en la molécula. La mayoría de ellos son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como la acetona, cloroformo, hexano, entre otros. Sin embargo, una excepción son las xantofilas que al poseer grupos funcionales altamente polares se solubilizan mejor en solventes como el etanol o el metanol.

Por otra parte, los carotenoides son susceptibles a diversas modificaciones estructurales tales como reacciones de isomerización (cis-trans), hidrogenación, ciclación en uno a ambos extremos o adición de sustituyentes especialmente en presencia de la luz, calor, metales, ácidos y el oxígeno (Flores et al., 2017).

1.7.3.2 Propiedades espectroscópicas

La propiedad de los carotenoides de absorber la luz se deriva de la presencia de un sistema de dobles enlaces conjugados, denominado cromóforo. Éste les permite absorber la radiación en la región ultravioleta visible y exhibir coloraciones amarillentas, anaranjadas o rojizas (Meléndez et al, 2019). En la figura 11 se detalla el cromóforo del licopeno, el cual está constituido por 11 enlaces dobles conjugados (e.d.c).

Para que los carotenoides muestren una coloración perceptible, se requiere de al menos 7 e.d.c y el color se acentúa a medida que se extiende este sistema. Por ejemplo, el caroteno al contar con 7 e.d.c muestra una coloración amarillo pálido mientras que el fitoeno y fitoflueno con 3 y 5 e.d.c respectivamente son compuestos incoloros (Meléndez et al, 2017).

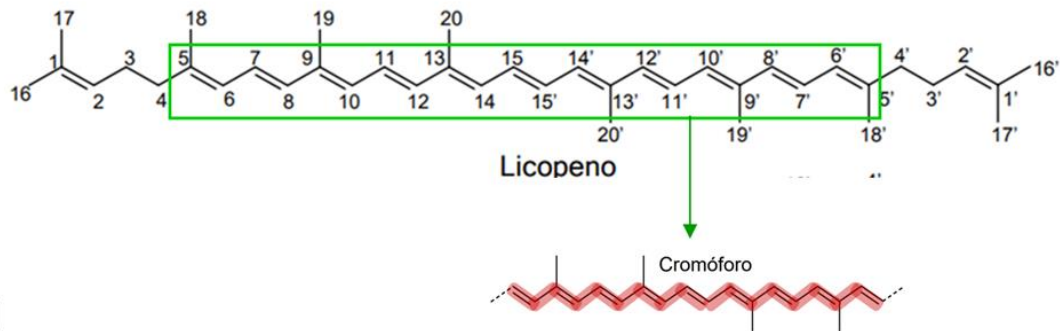


Figura 11. Estructura del cromóforo del licopeno (Mellado, 2013)

Aunque las principales bandas de absorción para la mayoría de los carotenoides caen dentro de la región de longitud de onda de 400-500 nm, existe una variación considerable en la forma del espectro para diferentes carotenoides en función del número de d.e.c. y del disolvente empleado para obtener los espectros (Meléndez et al., 2019).

Los espectros de la mayoría de los carotenoides tienen una estructura vibratoria fina, es decir, no sólo muestran una única banda de absorción, sino tres picos más o menos distintos, como se indica en la figura 12.

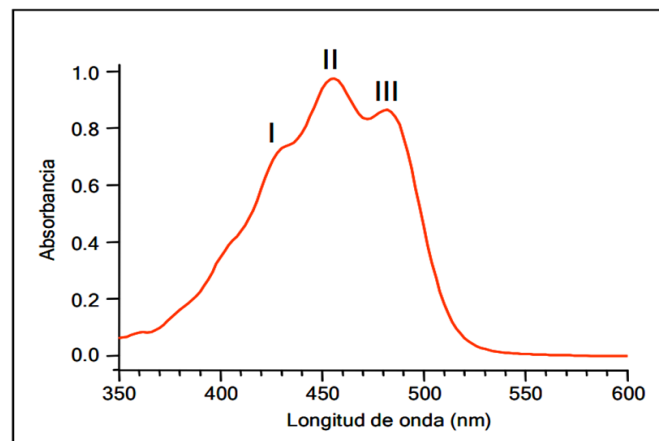


Figura 12. Espectro de absorción de luz UV-visible de los carotenoides (Mellado, 2013)

1.7.4 Actividad biológica

Los carotenoides cumplen funciones biológicas esenciales tanto en las plantas como en el ser humano. En las plantas, los carotenoides constituyen las unidades estructurales básicas del aparato fotosintético, siendo sus principales sitios de acumulación las membranas tilacoidales y los complejos de recolección de luz; ahí actúan como pigmentos accesorios en la captación de luz durante la fotosíntesis. Además, intervienen en los mecanismos de

fotoprotección de las células vegetales, al eliminar el exceso de energía luminosa de la clorofila en forma de calor y/o contrarrestar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el oxígeno singlete, los radicales hidroxilo y los radicales anión superóxido (Maoka, 2020). También las xantofilas ejercen un papel fotoprotector directo al participar en la disipación de energía por extinción no fotoquímica (Maoka, 2020).

En los animales, los carotenoides cumplen un rol vital, ya que al no poder ser biosintetizados, deben obtenerse de la dieta y ser metabolizados para usarse como micronutrientes. Esto es posible gracias a que los seres humanos expresamos al menos dos oxigenasas de escisión de carotenoides (CCD), las cuales catalizan la ruptura de la molécula para dar lugar a derivados oxidados como los retinoides, que exhiben actividad de vitamina A (Meléndez et al., 2019; Nisar et al., 2015).

CAROTENOIDES			
Carotenos		Xantofilas	
Actividad Provitamina A	No provitamínicos	Actividad Provitamina A	No Provitaminicos
β -caroteno	Licopeno	β -criptoxantina	Zeaxantina
α -caroteno	Fitoeno		Luteína
γ -caroteno	Fitoflueno		Astaxantina
			Violaxantina

Tabla 1. Carotenoides con actividad provitamina A. Elaborado por autores

Los carotenoides destacan sobre todo por actuar como precursores de la síntesis de Vitamina A, entre estos, se considera al β -caroteno como el precursor de mayor actividad provitamínica del grupo, ya que cuenta con dos anillos de β -ionona que le permiten sintetizar dos moléculas de Vitamina A.

El interés de los carotenoides se centra además en su efecto antioxidante, propiedad que está estrechamente relacionada con la presencia de dobles enlaces conjugados en su estructura. Éstos les permiten actuar como extintores físicos y químicos del oxígeno singlete, así como de otras especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya generación descontrolada, es un contribuyente esencial para el desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer, trastornos cardiovasculares y otras enfermedades degenerativas. Gracias a las propiedades

antioxidantes de los carotenoides, se les considera componentes funcionales prometedores para la dieta humana (Fiedor & Burda, 2021; Hammond & Renzi, 2013).

2. Metodología

2.1 Tipo de diseño de investigación

Estudio cuantitativo analítico de corte transversal

2.2 Áreas de estudio y muestreo

Se recolectaron muestras representativas de las hojas de la planta *Jungia rugosa*, cuyo estudio hace parte de la línea de investigación del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales, Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca.

Los sitios de recolección fueron seleccionados en función de las diferencias en las condiciones geográficas de cada lugar. Además, las coordenadas y altitudes fueron recopiladas a través de la plataforma de gestión y visualización de datos denominada KoboCollect, las cuales se muestran en la tabla 2.

Lugar	Coordenadas geográficas	Altitud
A. San José de Raranga	(-3.140803; -78.9894044)	3127.0 m
B. El Cajas, camino a la Reserva Natural de Llaviuco	(-2.8437607; -79.1272849)	3035.7 m
C. Mosquera-Biblián	(-2.6597617 -78.9298075)	3123.0 m

Tabla 2. Coordenadas geográficas de los sitios de recolección

2.2.1 Puntos de muestreo

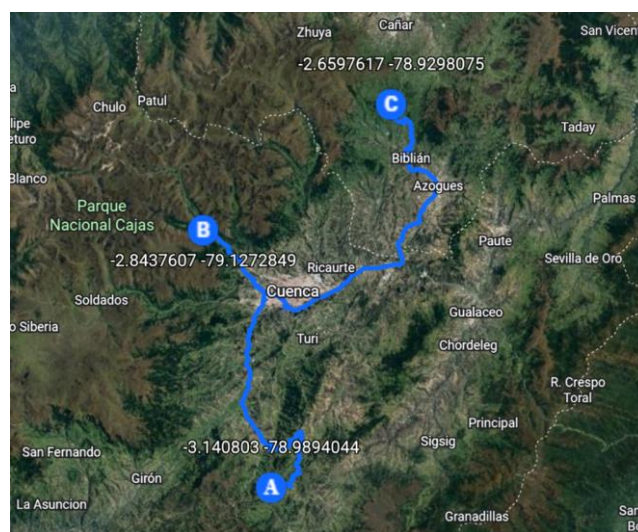


Figura 13. Coordenadas de los sitios de recolección (Google Earth, 2022)

Las actividades experimentales se realizaron en los laboratorios de plantas y fitoquímica del del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales, Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca.

2.3 Materiales y reactivos

2.3.1 Reactivos grado análisis

El cloroformo, etanol, acetona, éter de petróleo, carbonato de magnesio para análisis se obtuvieron de Merck ® (Darmstad, Alemania) y el metanol grado análisis de Sigma-Aldrich ® (Darmstad, Alemania).

2.3.2 Reactivos grado HPLC

El metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloroformo se obtuvieron de Merck ® (Darmstad, Alemania) y la trietilamina de Sigma-Aldrich ® (Darmstad, Alemania).

2.3.3 Equipos

- Cámara multiespectral Parrot Sequoia + (Parrot, Francia)
- Estufa de secado (PRO-3, Ecuador)
- Rotavapor Laborota 4000 efficient (Heidolph, Alemania)
- Concentrador al vacío RapidVap (Labconco, Estados Unidos)
- Biofreezer R134A (Fisher Scientific, Estados Unidos)
- Liofilizador FreeZone 2.5L (Labconco, Estados Unidos)
- Baño ultrasónico 3510 (Branson Ultrasonics, Estados Unidos)
- Espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos)
- Centrífuga 2-6 E (Sigma, Alemania)
- Cromatógrafo HPLC Series 1200 (Agilent Technologies, Estados Unidos)

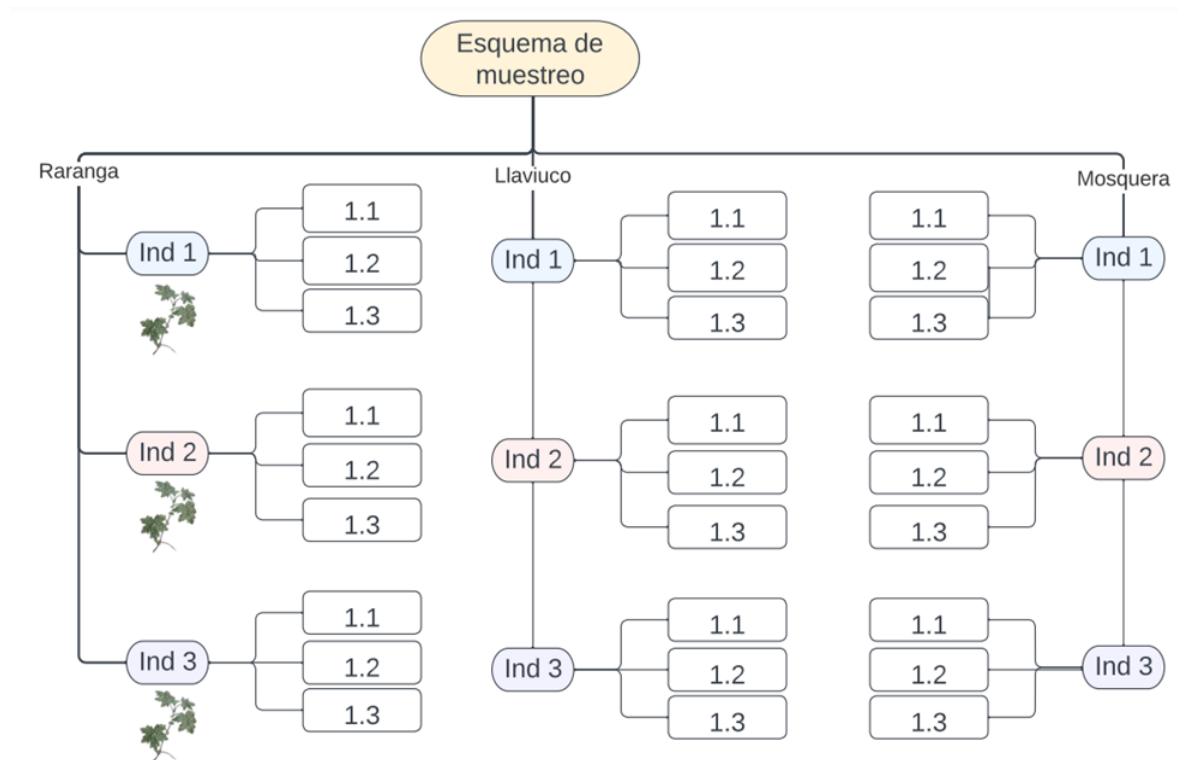
2.4 Métodos

2.4.1 Recolección del material vegetal

Se recolectaron hojas jóvenes de *Jungia rugosa* entre el 10 y 28 de octubre del 2022 programadas en dos salidas de campo. La primera salida se realizó los días 10 y 14 de octubre, en donde se recolectaron 3 individuos por cada lugar obteniendo un total de 27 muestras.

La segunda salida se llevó a cabo los días 16 y 28 de octubre y de la misma forma se recolectaron 27 individuos, consiguiendo un total de 54 muestras, tal como se indica en el esquema 1.

Una vez recolectadas las hojas fueron colocadas en bolsas de papel y transportadas hasta la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca para su posterior tratamiento.



Esquema 1. Muestreo del material vegetal. Elaborado por autores

2.4.2. Pretratamiento del material vegetal

Una vez recolectadas las hojas, se inició el proceso de selección para eliminar aquellas que mostraban signos evidentes de daño o contaminación. Se lavaron con agua potable con el fin de eliminar materia extraña, y luego se dejó reposar en agua destilada por 10 min.

Después, se drenó el agua y se colocaron las hojas sobre papel periódico en bandejas provistas de una malla de acero inoxidable para eliminar el exceso de agua y facilitar el proceso de secado durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, una parte de las hojas se reservó para el proceso de secado por liofilización y la porción restante se colocó en la estufa de secado a 40 °C por 24 horas.

2.4.2.1 Liofilización

La liofilización requiere de un proceso previo de congelación, por lo que las hojas frescas de *Jungia rugosa* antes de colocarse en el equipo fueron llevadas a congelación en el biofreezer por un periodo mínimo de 3 horas a -80 °C. Posteriormente, se cargaron los tubos en el liofilizador por 24 horas como se observa en el anexo D.

Una vez transcurrido este tiempo, se registró el peso de la muestra seca y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

2.4.3 Preparación de extractos

Se trituró la droga vegetal seca en una licuadora en 3 ciclos de prendido y apagado de 30 s para evitar un sobrecalentamiento de las cuchillas y así evitar la pérdida de componentes de interés.

Posteriormente, se pesó 10 g de materia seca de cada individuo, se colocó en un frasco de vidrio y se humectó con 15 mL de cloroformo. Por último, se cubrió el frasco con papel aluminio y se dejó reposar durante 16h.

2.4.3.1 Obtención del extracto por percolación

En un percolador previamente armado como indica el anexo E, se colocó el material vegetal anteriormente humectado y se añadió el solvente de extracción hasta 1 cm por encima de la droga vegetal y se dejó en maceración por 24 horas. Trascurrido este tiempo, se obtuvo el extracto estableciendo una velocidad continua de 20 gotas por minuto y se procedió a recolectar la primera fracción que contiene la mayor concentración de metabolitos, la cual corresponde al 75% del peso de la droga. Posteriormente se dejó el goteo a la misma velocidad durante 8 horas hasta el agotamiento de la droga y al finalizar se traspasó todo el extracto a un balón de evaporación.

Después se concentró el extracto en un rotavapor, como se observa en el anexo F, y en un concentrador al vacío para obtener el extracto seco y finalmente almacenarlo a -20 °C hasta su análisis.

2.4.4 Análisis químico de carotenoides

2.4.4.1 Determinación de carotenoides totales

La propiedad de los carotenoides para absorber la luz en la región visible del espectro electromagnético es utilizada para la cuantificación de estos, ya que en disolución los carotenoides obedecen a la ley de Beer- Lambert y las mediciones de absorbancia se pueden usar para estimar la concentración total de carotenoides en una muestra (Scott, 2001).

2.4.4.1.1 Cuantificación de carotenoides en hojas liofilizadas

En un tubo de ensayo se pesó 5 mg de hojas liofilizadas de *Jungia rugosa* y se añadió 100 uL de agua destilada ultrapura para hidratar el material por aproximadamente 10 minutos. Luego se agregó 8 mL de etanol al 96%, se homogeneizó en un vortex y se dejó reposar el material durante la noche cubierto con papel aluminio.

Al día siguiente se homogeneizaron las muestras y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, y se trasladaron a cubetas para la lectura, tal y como se observa en el anexo G. Finalmente, se midieron las absorbancias del sobrenadante a 470 nm (carotenoides), 648 nm (clorofila b), 664 nm (clorofila a) y eventualmente a 750 nm para corregir las impurezas. Las absorbancias deben encontrarse en el rango de 0.2 - 0.8.

A continuación, se describe la fórmula usada para obtener la concentración de carotenoides.

$$C_{x+c} = \frac{(4.785 A_{470} + 3.657 A_{664.2} - 12.76 A_{648.6}) * 8.1}{DW}$$

Donde:

Cx+c: Contenido de carotenoides totales (carotenos + xantofilas),

A: absorbancia

DW: peso seco del tejido vegetal (mg)

2.4.4.1.2 Cuantificación de carotenoides en el extracto lipofílico

En un tubo de ensayo se pesó 5 mg de extracto clorofórmico seco, se añadió 4 mg de carbonato de magnesio y se disolvió en 5 mL de acetona previamente refrigerada. Se llevó a un baño ultrasónico durante 5 minutos y luego se centrifugó a 3500 rpm por 10 min.

Se transfirió el sobrenadante a un embudo de separación y se colocó 8 mL de éter de petróleo y 4 mL de la solución previamente centrifugada, se agitó y se dejó reposar por 15 minutos. Luego, por las paredes del embudo se adicionó 30 mL de agua destilada, se agitó la mezcla y se dejó reposar hasta observar la separación de fases (fase etérea-acuosa). Se descartó la fase acuosa y se repitió el ciclo de lavado 4 veces con 20 mL de agua destilada, con el propósito de eliminar la acetona residual.

En un tubo de ensayo se recolectó la **fase etérea 1**.

En un embudo de separación se colocó 3 mL de la fase etérea 1, se añadió 2.4 mL de metanol al 92%, se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta la separación de fases durante 15 minutos (**fase etérea 2 - fase metanólica**).

Una vez que las fases estén completamente separadas, se recolectó cada fase en un tubo de ensayo. La fracción más densa corresponde a la **fase metanólica** y se encuentra en la parte inferior, mientras que la **fase etérea 2**, se ubica en la parte superior, tal como se muestra en el anexo H.

Fase	Compuesto extraído
Fase etérea 1	Carotenoides totales y clorofilas a y b
Fase etérea 2	Carotenoides y clorofila a
Fase metanólica	Xantofilas y clorofila b

Tabla 3. Compuestos químicos extraídos en cada fase de extracción

Los carotenoides se midieron a una absorbancia de 450 nm en un espectrofotómetro UV-Vis para las fases etéreas 1 y 2, usando como blanco el éter de petróleo y para la fase metanólica un blanco de metanol al 92%.

Para la medición se consideró un rango espectrofotométrico de 0,2 a 0,8 unidades de absorbancia. Debido a que las concentraciones sobrepasaron el rango fue necesario realizar diluciones en cada una de las soluciones; fase etérea 1 y fase etérea 2, en una relación de 1:4; y la fase metanólica en una relación de 1:2.

El contenido de carotenoides se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{E * V * 10^6}{E^{1\%} * 100 * p}$$

Donde:

E= Absorbancia de la muestra a 450 nm

V= Volumen de aforo (1mL)

E 1%= 2500 Coeficiente de absortividad molar de una solución de 1g de pigmento en 100 mL de solvente medido en una celda de 1 cm³

p= peso de la muestra

2.4.4.2 Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.4.4.2.1 Preparación de las muestras

Se preparó una solución madre de 5 mg de extracto en 1 mL de cloroformo en viales ámbar, se procedió a sonicar por 2 minutos y se colocó en un rotador de tubos durante 8 horas para obtener una mezcla homogénea. Se realizó una dilución 1/5 (300 μ L de la solución madre y 1200 μ L de metanol/ acetonitrilo 90/10) para obtener 1 mg/mL de extracto. Una vez preparadas las diluciones se procedió a filtrar usando un filtro de membrana con tamaño de poro de 0,45 μ m. Posteriormente se almacenaron los viales a -20°C, hasta su uso.

2.4.4.2.2 Procesamiento

El análisis se realizó siguiendo el método estandarizado por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, el cual está basado en las condiciones de análisis descritas por Vandekinderen et al, 2009.

Los carotenoides se separaron en una columna de sílica YMC, C30 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) de fase reversa empleando un detector de arreglo de diodos (DAD), a una longitud de onda de 450 nm. El caudal utilizado fue de 1 mL/min a una temperatura de 30°C, y el volumen de inyección fue de 25 μ L. Se utilizó una combinación de dos fases móviles: metanol/acetonitrilo (90/10, v/v) (solvente A) y acetato de etilo con 0,25% (v/v) de trietilamina (solvente B). Se usó un gradiente lineal de solvente A de 100 % a 40% en 25 min. Esta combinación de solventes se mantuvo en modo de elución isocrática durante 5 min para alcanzar nuevamente el 100% del solvente A hasta los 35 min y posteriormente hasta los 40 min.

Los carotenoides fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los 4 estándares (luteína, β criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno). Para la cuantificación se utilizaron curvas de calibración de cada uno de los estándares y se obtuvo la ecuación de la

recta, en la cual se interpolaron las áreas de los picos de cada una de las muestras para conocer la concentración del componente correspondiente.

2.4.5 Captura de imágenes multiespectrales

2.4.5.1 Descripción del equipo

El sensor multiespectral Parrot Sequoia + está diseñado para capturar simultáneamente múltiples bandas espectrales, al contar con 4 sensores monocromáticos verde, rojo, red edge (borde rojo) e infrarrojo cercano y un sensor RGB (Red, Green y Blue). Las longitudes de onda se describen en la tabla 4.

Además, consta de un sensor de brillo “sunshine” o sensor de irradiancia que registra la intensidad de la luz ambiente en las cinco bandas, realizando una calibración radiométrica para corregir las diferencias de iluminación (Sequoia, 2019).

Sensores monocromáticos	Longitud de onda	Ancho de banda	Características
Verde	530-570 nm	40 nm	- Está relacionada con la cantidad de pigmentos fotosintéticos que contiene una planta: clorofilas y carotenoides.
Rojo	640-680 nm	40 nm	- La reflectancia en esta banda es baja, debido a la fuerte absorción de la clorofila. - Varía en función de factores como el índice de área foliar, suelo, humedad y el estrés de la planta.
Red edge (Borde Rojo)	730-740 nm	10 nm	-Corresponde al punto de entrada del infrarrojo cercano. -Es muy sensible al estrés de las plantas y proporciona información sobre la clorofila y el estado de nitrógeno de las plantas.

Infrarrojo cercano (NIR)	770-810 nm	40 nm	<p>- Las estructuras internas de una planta sana actúan como reflectores difusos de longitudes de onda del NIR.</p> <p>- Esta banda tiene una correlación muy fuerte con el contenido de clorofila, por lo que variaciones altamente significativas de la reflectancia se usan como indicadores de la salud de la planta.</p>
RGB (Red, Green, Blue)	470-700 nm		<p>- RGB es un modelo de color basado en la síntesis aditiva, con el cual es posible representar un color mediante la mezcla de los tres colores de luz primarios: rojo, verde y azul.</p> <p>- Permite representar al espectro visible.</p> <p>- Se crea un espacio de color RGB asignando los colores a un sistema de coordenadas cartesianas tridimensionales y como resultado se forma un cubo unitario, en donde los valores están a lo largo de tres ejes, y entre estos se encuentran las diferentes intensidades de color.</p>

Tabla 4. Longitudes de onda y características de las bandas espectrales (Manosalvas, 2019; Alonso, 2009)

Especificaciones del Sensor Sequoia+

- Cámara autocalibrada usando el sensor de irradiación.
- Tasa de toma fotográfica de 1 foto por segundo.
- Posee 4 cámaras espectrales de 1.2 Mpx, tamaño del píxel de 3.75 µm y distancia focal de la lente de 3.98 mm.
- Cámara RGB: 16 Mpx, tamaño del píxel de 1.34 µm y distancia focal de la lente de 4.88 mm.
- Memoria interna de 64 GB.

2.4.5.2 Procedimiento para la adquisición de imágenes

La obtención de las imágenes multiespectrales de cada uno de los individuos recolectados se realizó tanto en los sitios de recolección como en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, esto se hizo con el propósito de establecer posibles variaciones en los valores de reflectancia entre los dos lugares.

2.4.5.2.1 Protocolo de Instalación y funcionamiento del sensor Parrot Sequoia

Primero se acondicionó la cámara multiespectral, el sensor de brillo y la batería sobre un soporte trípode para micrófono a una altura estandarizada de 1,20 m, tal como se indica en la figura 14. Posteriormente se conectó la cámara multiespectral al sensor de irradiancia utilizando el cable USB y después el sensor a la batería de la misma manera.

Luego se enlazó la cámara a un dispositivo móvil mediante Wi-Fi con el propósito de definir las especificaciones para el disparo de imágenes (single mode).

Posteriormente se realizó la calibración, para ello se capturó una imagen del panel de calibración radiométrica, con el propósito de corregir la reflectancia de las imágenes teniendo en cuenta las diferencias de iluminación.

En cuanto a las hojas, se depositaron dentro de un marco de referencia de madera de 50 x 50 cm como se indica en la figura 14. Cabe recalcar que el registro fotográfico se hizo bajo el efecto directo de la radiación solar tanto en los puntos de recolección como en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.



Figura 14. Captura de imágenes multiespectrales. Elaborado por autores

El número total de imágenes capturadas en las 2 salidas de campo fueron 108 tanto en los puntos de recolección como en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

Por último, para recuperar el contenido de la cámara se accedió a la tarjeta de memoria SD en donde se visualizaron las imágenes en las 5 bandas espectrales, tal como se indica en la figura 15.



Figura 15. Fotografía en diferentes bandas espectrales: GREEN, RED, REG, NIR y RGB. (ArcGIS, 2023)

2.4.5.3 Procesamiento de las imágenes multiespectrales

- Georreferenciación

La georreferenciación implica asignar coordenadas a una serie de puntos de referencia en una imagen. Para ello, se empleó la herramienta de referenciación de ArcMap, y se tomó como puntos foto identificables los cuatro vértices del marco de referencia de 50 x 50 cm.

Una vez que se cargaron las imágenes desde el catálogo de ArcMap, se referenció cada una de ellas utilizando la herramienta denominada agregar puntos de control para cubrir los cuatro vértices, como se observa en la figura 16.



Figura 16. Cuadro de georreferenciación (ArcGIS, 2023)

- Extracción de datos de reflectancia

Se cargó una tabla intacta sin datos previamente ingresados, a la misma se le exportaron los datos correspondientes a la imagen georreferenciada usando el comando export data, por lo que solo se toman en cuenta los datos que se encuentran dentro de la medida 50x50 cm del marco y finalmente se guardaron en formato shapefile.

Después se exportaron las imágenes de cada una de las bandas desde la opción Add Data de la barra de herramientas.

En ArcToolbox se seleccionó la extensión Spatial Analyst Tools - Extraction - Extract Multi Values to Points. Posteriormente en el cuadro de diálogo que se muestra en la figura 17 se ingresó el shapefile en “Input point features” y las imágenes de las bandas en “Input rasters”. Como resultado se agregaron los valores de las imágenes a la capa de puntos de entrada (shapefile) y se obtuvo una tabla de atributos con los datos de reflectancia, como se observa en la figura 18.

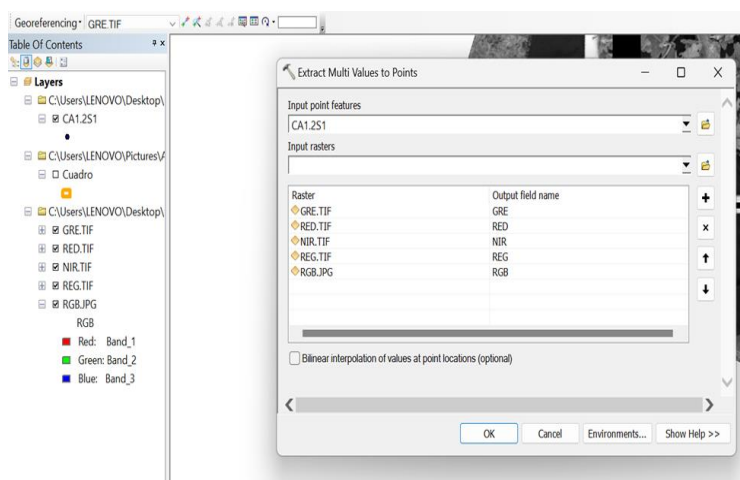


Figura 17. Cuadro de diálogo de la herramienta Extract Multi Value to Points (ArcGIS, 2023)

FID	Shape	OBJECTID	Id	Area	ORIG_FID	GRE	RED	NIR	REG	b1
0	Point	995	0	0.000001	994	65472	65472	33728	33280	
1	Point	996	0	0.000001	995	65472	65472	33728	34880	
2	Point	997	0	0.000001	996	65472	65472	33792	34880	
3	Point	998	0	0.000001	997	65472	65472	32256	35392	
4	Point	999	0	0.000001	998	65472	65472	32256	35392	
5	Point	1494	0	0.000001	1493	65472	65472	33728	36032	
6	Point	1495	0	0.000001	1494	65472	65472	33728	35968	
7	Point	1496	0	0.000001	1495	65472	65472	32896	35968	
8	Point	1497	0	0.000001	1496	65472	65472	33664	35008	
9	Point	1498	0	0.000001	1497	65472	65472	33664	35008	
10	Point	1993	0	0.000001	1992	65472	65472	33728	35648	
11	Point	1994	0	0.000001	1993	65472	65472	33728	35520	
12	Point	1995	0	0.000001	1994	65472	65472	32896	35520	
13	Point	1996	0	0.000001	1995	65472	65472	33664	35456	
14	Point	1997	0	0.000001	1996	65472	65472	33664	35456	
15	Point	2492	0	0.000001	2491	60288	65472	31744	33664	
16	Point	2493	0	0.000001	2492	63232	65472	31744	34944	
17	Point	2494	0	0.000001	2493	63232	65472	33472	34944	
18	Point	2495	0	0.000001	2494	61952	65472	32128	34368	
19	Point	2496	0	0.000001	2495	61952	65472	32128	34368	
20	Point	2991	0	0.000001	2990	67144	65472	31744	33728	

Figura 18. Tabla de atributos con los datos de reflectancia de cada banda (ArcGIS, 2023)

- **Cálculo de la mediana de valores de reflectancia**

Después se exportaron los datos de la tabla de atributos en formato ASCII, para convertirlo en un documento Excel que contiene los valores de reflectancia de la imagen. Luego se elaboraron histogramas para observar la distribución de los datos y estimar los límites inferior y superior.

Posteriormente mediante la función Identify de ArcGIS se establecieron los límites superior e inferior de valores de reflectancia que correspondían únicamente a las hojas de la planta, como se observa en la figura 19, y con estos se calculó el valor de la mediana.

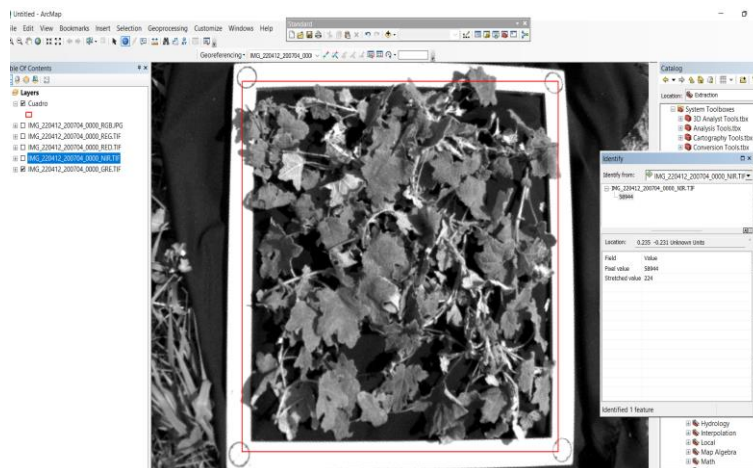


Figura 19. Extracción de los valores de cada píxel mediante la función Identify (ArcGIS, 2023)

2.5 Análisis Estadístico

2.5.1 Regresión lineal múltiple

En esta investigación se evaluó la relación entre las reflectancias obtenidas en las diferentes bandas espectrales con la concentración de carotenoides totales de *Jungia rugosa*. Los datos experimentales se analizaron utilizando un modelo de regresión lineal múltiple, presentado en la ecuación 1, donde “Y” representa la concentración de carotenoides extraídos por los dos métodos de análisis o variable dependiente; y “X” corresponde a las variables independientes codificadas por la mediana de los valores de reflectancia de cada banda de la cámara multiespectral. Para realizar el análisis estadístico se empleó el software estadístico RStudio versión 4.2.2.

Una vez creados los nombres de las variables y vectores respectivos, se procedió a subir los datos de la tabla en Excel que se muestra en el anexo Q, empleando los comandos `openxlsx` y `read.xlsx`, para trasladarlos al software estadístico RStudio. Posteriormente, se usó los comandos correspondientes para lograr el ajuste de modelo de regresión lineal múltiple.

$$Y_i = B_0 + B_1X_{i1} + B_2X_{i2} + \dots + B_kX_{ik} + \varepsilon_i$$

Ecuación 1: Fórmula de regresión lineal múltiple

Y_i= variable dependiente

B₀= intercepto

X_{ik}=variable independiente

B_k=coeficientes de regresión beta

ε_i= error aleatorio o error de estimación

El análisis de regresión lineal múltiple exige el cumplimiento de requisitos o supuestos que permitan explicar con seguridad los resultados obtenidos en el modelo predictivo. Éstos son normalidad, multicolinealidad y homocedasticidad.

- Normalidad de los errores

El supuesto de la normalidad implica que las variables sigan la ley normal. Este supuesto lo verificaremos mediante el test de Shapiro-Wilks, el cual plantea la hipótesis nula de que una muestra proviene de una distribución normal, y una alternativa que sostiene que la distribución no es normal (Vilà, Torrado & Reguant, 2019).

- **Multicolinealidad**

El supuesto de la no colinealidad supone que las variables independientes no estén correlacionadas entre ellas. Para validar este parámetro se aplicará el Factor de inflación de varianza (VIF), el cual debe ser inferior a 5 (Vilà, Torrado & Reguant, 2019).

- **Homocedasticidad**

El supuesto de homocedasticidad nos indica que la variación de los residuos debe ser uniforme y que en el gráfico éstos no muestren pautas de asociación. Además, se aplicará el test de Breusch-Pagan para evaluar si la heterocedasticidad está presente en este modelo de regresión (Vilà, Torrado & Reguant, 2019).

- **Valores influenciados**

Los puntos influyentes son aquellos que afectan de manera significativa la pendiente de la línea de regresión. La distancia Cook's es un indicador para determinar si una observación influye en el valor del conjunto de coeficientes beta, una distancia grande significa que una observación tiene un gran peso en la estimación de β , y esta se considera problemática cuando es mayor a 1.

Finalmente, para determinar si existen diferencias en la concentración de carotenoides entre los tres sitios de recolección se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en el cual se comparó la variable dependiente (concentración de carotenoides) con la variable independiente (sitio de recolección). También se realizó el test de Tukey o prueba de medias para evaluar si existen diferencias significativas entre sitios de recolección.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de carotenoides

3.1.1 Cuantificación de carotenoides totales en hojas liofilizadas

Los resultados expresados en mg de carotenoides totales /g de hojas secas, se muestran en la tabla 5 para la salida 1 y 2 respectivamente.

Lugar de recolección	Salida 1	Salida 2
	Media \pm DS	Media \pm DS
Biblián-Mosquera	1.360 \pm 0.11	1.622 \pm 0.19
San José de Raranga	1.842 \pm 0.26	1.347 \pm 0.20
El Cajas- Llaviuco	1.663 \pm 0.09	1.806 \pm 0.16
	Media \pm DS de tres mediciones	

Tabla 5. Contenido de carotenoides totales en hojas liofilizadas de las salidas 1 y 2

Tras realizar el análisis de varianza y test de Tukey se comprobó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la concentración de carotenoides totales entre los sitios de recolección.

3.1.2 Cuantificación de carotenoides totales en el extracto lipofílico

Los resultados expresados en μ g de carotenoides totales/mg de extracto se muestran en la tabla 6 para la salida 1 y 2 respectivamente.

Lugar de recolección	Salida 1	Salida 2
	Media \pm DS	Media \pm DS
Biblián-Mosquera	1.817 \pm 0.15	1.632 \pm 0.17
San José de Raranga	2.027 \pm 0.18	1.942 \pm 0.11
El Cajas- Llaviuco	1.498 \pm 0.33	1.832 \pm 0.17
	Media \pm DS de tres mediciones	

Tabla 6. Contenido de carotenoides totales en el extracto en las salidas 1 y 2

Tras realizar el análisis de varianza y test de Tukey se evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,042$) entre el Cajas (ingresando a Llaviuco) y San José de Raranga, siendo este último el que presenta la mayor concentración de carotenoides totales tanto en la salida 1 y 2. Al considerar la altitud de los diferentes sitios de recolección, San José de Raranga es el lugar más alto y como lo indican Macar & Kalefetoglu (2018) posiblemente altitudes elevadas se relacionan con alta intensidad de luz ultravioleta y con un aumento de carotenoides debido a que su función es la de actuar como pigmentos fotoprotectores. Esto podría explicar la mayor cantidad de carotenoides en este lugar.

Además, se observa que existen diferencias en la concentración de carotenoides entre salidas, lo cual podría explicarse por las variaciones en las condiciones climáticas durante los días en que se recolectó el material vegetal. Así lo demostraron Casierra, Ávila, Riascos (2012) que evaluaron los cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. Los pigmentos se extrajeron por macerado y dilución en metanol al 70% en condiciones de oscuridad. Encontraron que los contenidos de carotenos y clorofila total mostraron diferencias a lo largo del día con una tendencia creciente a medida que avanzaba el día y que la sombra afectó las relaciones clorofila a/clorofila b y carotenos/clorofila. Así mismo el valor de la relación carotenos/clorofila fue más alto en plantas que crecieron en plena exposición (Casierra, Ávila & Riascos, 2012).

Todo lo anterior nos indica que el contenido de carotenoides en hojas es muy variable, llegando a mostrar variaciones dentro del mismo día. Otros factores que influyen en la variación del contenido de carotenoides incluyen: estación, parte de la planta, edad de la hoja, y de parámetros ambientales como clima y principalmente de las condiciones de luz (Meléndez, 2017).

En un estudio realizado por León & Reyes (2017) se determinó la concentración de carotenoides totales en un extracto de *Jungia rugosa* en el que se usó diclorometano (DCM) como solvente. A pesar de que se trata del mismo sitio de recolección (Llaviuco), los resultados obtenidos mostraron una mayor concentración promedio de carotenoides ($2.653 \mu\text{g}/\text{mg}$), en comparación con los reportados en esta investigación ($1.832 \mu\text{g}/\text{mg}$), lo que podría estar relacionado con la época del año en la que se recolectó la muestra, así como el solvente de extracción empleado (León & Reyes, 2017).

3.1.3 Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El mecanismo de separación cromatográfica se basa en el grado de hidrofobicidad de los carotenoides. Así, las xantofilas al ser menos apolares muestran una menor retención y

eluyen primero, a diferencia de los carotenos que tiene más afinidad por la fase estacionaria hidrofóbica y eluyen más tarde (Meléndez, 2017).

Los picos cromatográficos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los principales estándares: luteína (11.86 min), β -criptoxantina (18.0 min), α -caroteno (20.45 min), y β -caroteno (22.81 min).

El anexo I y la tabla 7 muestran los resultados de los tiempos de retención, las áreas máximas y la concentración de los carotenoides en los extractos clorofórmicos de los 3 sitios de recolección.

Carotenoide identificado	Lugar de recolección	Salida	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de extracto	
Luteína	Biblián-Mosquera	1	0.950	
		2	0.902	
	El Cajas- Llaviuco	1	0.877	
		2	0.848	
	San José de Raranga	1	0.953	
		2	1.021	
	β criptoxantina	El Cajas- Llaviuco	1	0.867
			2	0.879
San José de Raranga		1	0.877	
		2	0.893	
α caroteno	Biblián-Mosquera	1	0.872	
		2	0.880	
	El Cajas- Llaviuco	1	0.879	
		2	0.865	
	San José de Raranga	1	0.871	
		2	0.888	
β caroteno	Biblián-Mosquera	1	1.620	
		2	2.611	
	El Cajas- Llaviuco	1	1.578	
		2	1.374	

San José de Raranga	1	1.533
	2	1.650

Tabla 7. Resultados de la determinación de carotenoides por HPLC

Los resultados mostraron que el b-caroteno y la luteína fueron los carotenoides comunes y mayoritarios en todas las muestras, seguido del α -caroteno que no se detectó únicamente en el individuo dos de Biblián. En cuanto a la β -criptoxantina estuvo presente en las muestras de Llaviuco y San José de Raranga, pero no se encontró en ningún individuo de Mosquera en las dos salidas de campo.

Esto concuerda con lo descrito por Barba, Esteve & Frígola (2014), pues mencionan que el b-caroteno y la luteína suelen ser los carotenoides más abundantes en los tejidos de las plantas fotosintéticas dada su importancia en los mecanismos de fotoprotección. A diferencia de la β -criptoxantina que suele encontrarse en menor proporción entre las especies vegetales y cuya presencia está condicionada por cambios estacionales, etapas de madurez, entre otros. Cabe recalcar que ésta última junto al b-caroteno son sustancias de gran interés debido a su capacidad para actuar como provitamina A.

Asimismo, es importante mencionar que los carotenoides son sustancias fácilmente oxidables debido al gran número de dobles enlaces que poseen en su estructura. La estabilidad a la oxidación de un pigmento en particular depende mucho del medio ambiente que lo rodea. Un daño físico al tejido que contiene carotenoides o la extracción de estos aumenta la susceptibilidad a la oxidación. Las incisiones oxidativas pueden ocurrir en una gran variedad de sitios a lo largo de carotenoides dando como resultado productos oxigenados que muchas veces no son caracterizados (Yeverino, 1997).

Además, tras realizar un análisis de varianza y test de Tukey se comprobó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los componentes analizados (luteína, β criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno) en los diferentes sitios de recolección.

3.2 Análisis de la correlación entre imágenes espectrales y métodos de laboratorio

Se evaluó una posible asociación entre las reflectancias de las diferentes bandas espectrales con la concentración de carotenoides totales de *Jungia rugosa*. Para ello se empleó un modelo de regresión múltiple, en donde, la variable dependiente corresponde a la concentración de carotenoides totales obtenidos tanto por el método de extracción 1 (hojas liofilizadas) como por el método de extracción 2 (extracto clorofórmico) y las variables independientes representan la mediana de los valores de reflectancia de las 5 bandas: RGB,

RED, REG, NIR, GREEN. En los anexos J,K y L se encuentran las gráficas que representan los resultados de la correlación de ambos métodos de extracción.

Como se indicó anteriormente, las imágenes fueron capturadas tanto en los sitios de recolección como en la Facultad de Ciencias Químicas para establecer posibles variaciones en los valores de reflectancia entre los dos sitios. Sin embargo, el trabajo de titulación realizado simultáneamente con Pacheco & Urgilés (2022) demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de reflectancia de los dos lugares, por lo que únicamente se evaluó la correlación con los datos extraídos de las imágenes de los sitios de recolección.

3.2.1 Método de extracción 1

Se calculó un modelo de regresión múltiple para predecir el efecto de los valores de reflectancia sobre la concentración de carotenoides totales obtenidos por el método de extracción 1 (hojas liofilizadas), cuyos resultados se indican en la tabla 8. La ecuación de regresión fue estadísticamente significativa ($p=0.007$) para predecir la variable de respuesta (concentración de carotenoides).

Además, el valor de R^2 fue de 0.22, lo que indica que el 22% de la variación en la concentración de carotenoides puede ser explicada por la variación en los valores de reflectancia en las 5 bandas espectrales.

Variables predictoras	R^2	B	p	Pr(> t)
Método de extracción 1	0.22	2.73	0.007	
RED		-1.71e-04		0.0003**
REG		9.92e-06		0.31
b1_RGB		7.94e-04		0.77
b2_RGB		3.87e-04		0.86
b3_RGB		-2.30e-03		0.51
GRE		2.78e-05		0.093
NIR		-4.38e-06		0.58

Tabla 8. Modelo de regresión del método de extracción 1

Si analizamos las variables predictoras de forma individual se observa que únicamente la banda espectral RED es estadísticamente significativa ($p<0.05$) para predecir la variable de respuesta.

Posteriormente, se realizó la selección de las variables predictoras para elegir el mejor subconjunto de regresión que se ajuste a la variable de respuesta, para esto se aplicó el criterio de información de Akaike (AIC), comparando las puntuaciones de varios modelos posibles, eligiendo el de menor valor (AIC -163.52). Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 9.

Variables predictoras	R ²	B	p	Pr(> t)
Método de extracción 1	0.28	2.87	8.96e-05	0.0076
RED		-1.68e-04		1.78e-05
GRE		2.71e-05		0.0567

Tabla 9. Resultados del análisis estadístico incluyendo bandas GREEN y RED

Se evidencia que al incluir únicamente las bandas RED y GREEN en el modelo, éste es capaz de explicar un mayor porcentaje (27.8%) de la variación total de la concentración de carotenoides.

3.2.2 Método de extracción 2

Se calculó un modelo de regresión múltiple para predecir el efecto de los valores de reflectancia sobre la concentración de carotenoides totales obtenidos por el método de extracción 2 (extracto clorofórmico), cuyos resultados se indican en la tabla 10. La ecuación de regresión fue estadísticamente significativa ($p=0.0003$) para predecir la variable de respuesta. Además, el valor de R² fue de 0.34, lo que indica que el 34% de la variación en la concentración de carotenoides puede ser explicada por la variación en los valores de reflectancia en las 5 bandas espectrales.

Variables predictoras	R ²	B	p	Pr(> t)
Modelo 1	0.34	1.85e-16	0.0003	
RED		2.28e-01		0.13
REG		1.79e-02		0.90
b1_RGB		-4.14e-01		0.03
b2_RGB		-2.84e-01		0.08
b3_RGB		1.89e-01		0.23
GRE		1.54e-01		0.28
NIR		-4.32e-02		0.77

Tabla 10. Modelo de regresión del método de extracción 2

Si analizamos las variables predictoras de forma individual se observa que únicamente la banda espectral b1_RGB es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para predecir la variable de respuesta.

Posteriormente, se realizó la selección de las variables predictoras para elegir el mejor subconjunto de regresión que se ajuste a la variable de respuesta, para esto se aplicó el criterio de información de Akaike (AIC), comparando las puntuaciones de varios modelos posibles, eligiendo el de menor valor (AIC -20.03). Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 11.

Variables predictoras	R ²	B	p	Pr(> t)
Método de extracción 2	0.36	3.14e-16	1.36e-05	0.0076
RED		2.99e-01		0.0116
b1_RGB		-2.98e-01		0.0495
b2_RGB		-2.28e-01		0.1238

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico incluyendo las bandas RED, b1_RGB y b2_RGB

Se evidencia que al incluir únicamente las bandas RED, b1_RGB y b2_RGB en el modelo, éste es capaz de explicar un mayor porcentaje (35.7%) de la variación total de la concentración de carotenoides.

- Verificación de los supuestos de la regresión lineal múltiple

Para validar el modelo de regresión lineal múltiple se verificó el cumplimiento de los supuestos. El supuesto de la normalidad se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilks, obteniendo que en los métodos de extracción 1 y 2 las variables siguen una distribución normal ($p > 0.05$).

El supuesto de multicolinealidad se validó mediante la aplicación de Factor de inflación de varianza (VIF) confirmando que no existe dependencia entre los predictores tanto en el método de extracción 1 y 2 ($VIF < 5$). Los anexos M y N muestran los valores de VIF de las bandas correspondientes de cada método.

El supuesto de homocedasticidad se analizó mediante los gráficos de dispersión de las figuras 20 y 21, en los cuales se visualizó que en los dos métodos los residuos se distribuyen con la misma varianza y sin mostrar signos de asociación, es decir que las variables predictoras son homocedásticas, además esto se confirmó con el test de Breusch-Pagan ($p > 0.05$).

Método de extracción	Test Shapiro Wilks	Factor de inflación de varianza (VIF)		Test de Breusch-Pagan	Valores Influenciados	Distancia de Cook's
1	p=0.27	RED	1.27	p=0.85	CA_3.2_S1	0,0002
		GREEN	1.27		CA_1.1_S2	0.04
					SJ_1.3_S1	0.21
					SJ_1.3_S2	0.09
2	p=0.27	RED	1.07	p=3.79 e05	BIB_2.1_S2	0,07
		b1_RGB	1.80		CA_1.2_S1	0.07
		b2_RGB	1.75		CA_1.3_S1	0.05
					SJ_1.3_S2	0.22
					SJ_2.2_S2	0.01

Tabla 12. Resultados de las pruebas para verificar los supuestos de la regresión lineal múltiple

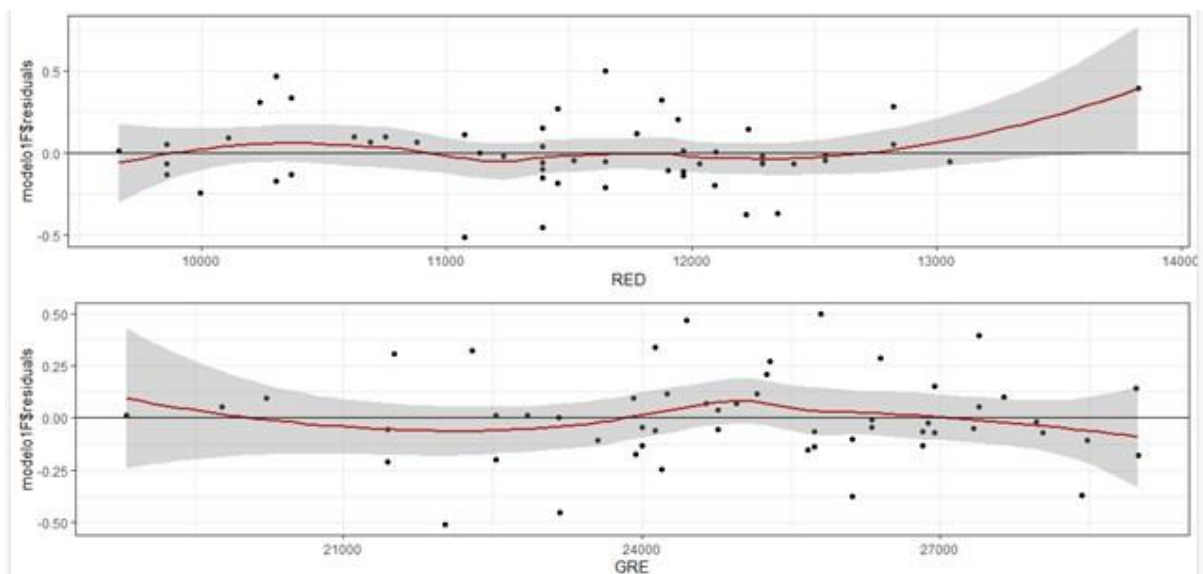


Figura 20. Gráfica de residuos vs valores ajustados del método de extracción 1

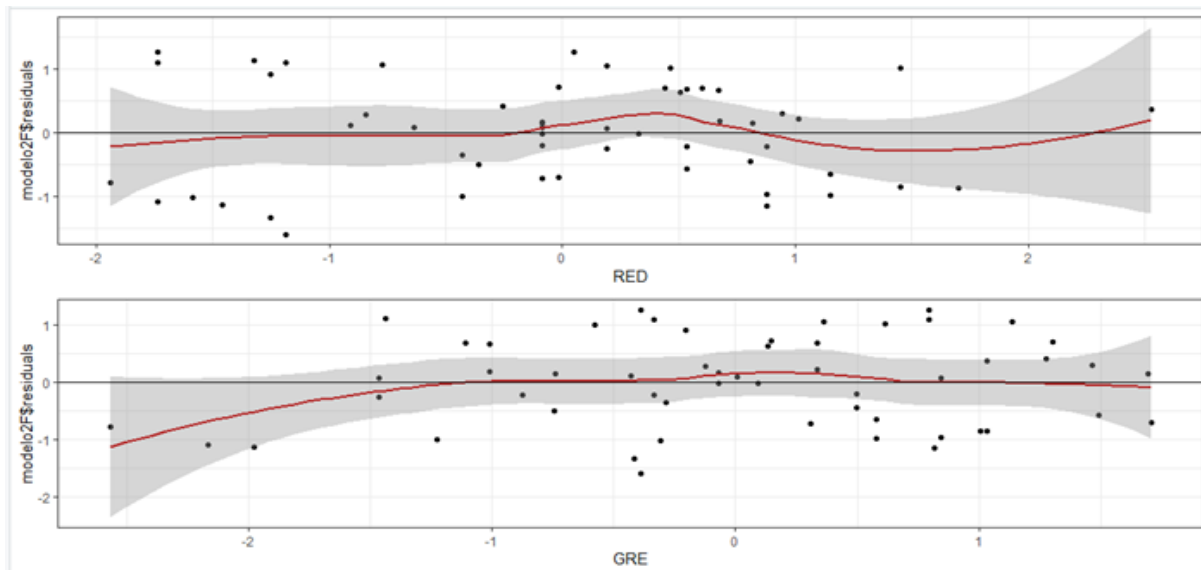


Figura 21. Gráfica de residuos vs valores ajustados del método de extracción 2

- Valores influenciados

Los anexos O y P muestran un gráfico de burbujas que representa a los puntos influenciados de los modelos, el cual está compuesto de los residuales en el eje vertical, los hat values o valores ajustados en el eje horizontal y las áreas de los círculos que representan las distancias de Cook's. Las distancias Cook's son inferiores a 1 por lo tanto, los puntos son aceptables y no influyen de manera significativa o problemática en el modelo de regresión.

3.3 Discusión de resultados

A pesar de que los dos modelos de regresión mostraron significancia estadística ($p < 0.05$), el valor de R^2 en ambos casos no es el más adecuado, ya que logran explicar en un pequeño porcentaje, el 27.8% y 35.7% de la variabilidad de la concentración de carotenoides respectivamente. Al contrarrestar esto con los resultados obtenidos se observa que el método de extracción 2 es el que mejor se ajusta a nuestra variable dependiente (R^2 0.36), lo cual podría estar relacionado con el tipo de solvente empleado para la extracción. En el método 2 se empleó el cloroformo como solvente, cuya apolaridad permitió una mayor extracción de los pigmentos de la matriz vegetal. A diferencia del método de extracción 1, en el que se utilizó etanol, un solvente polar que difícilmente solubiliza estos compuestos, además de su baja penetración en la membrana celular (Butnariu, 2016).

En ese sentido, Minocha et al (2009) desarrollaron una metodología estandarizada para la extracción de clorofilas y carotenoides totales en el follaje de distintos tipos de árboles, demostrando la eficiencia de extracción de los solventes: acetona, etanol, sulfóxido de dimetilo (DMSO) y N, N-dimetilformamida (DMF). Se basaron en el método propuesto por Lichtenthaler 1987 y encontraron que el etanol al 95% extrajo grandes cantidades de clorofilas al igual que el resto de los solventes, sin embargo, la DMF fue el solvente más eficiente para la extracción de carotenoides totales en 24 horas (Minocha et al., 2009).

Por lo mencionado anteriormente se evidenció que el etanol por sí solo no es el solvente adecuado para la extracción de carotenoides, sin embargo, se ha demostrado que la combinación de etanol con solventes orgánicos apolares mejoran la extracción de carotenoides, ya que la mezcla de solventes permite extraer de la matriz vegetal sustancias con distinta polaridad; por un lado, el solvente apolar solubiliza los carotenos y el etanol las xantofilas. Esto concuerda con lo descrito por Taungbodhitham et al (1998) que evaluaron seis diferentes combinaciones de disolventes para extraer licopeno, α - y β -caroteno y las mejores recuperaciones se obtuvieron con la mezcla etanol:hexano (4:3). Taungbodhitham et al, (1998) Así también Lichtenthaler & Buschmann (2001) mencionan que la extracción de clorofilas y carotenoides a partir de materiales vegetales que contienen agua requiere de solventes polares como acetona, metanol o etanol. Luego estos extractos deben ser transferidos a un solvente apolar como el éter dietílico (Lichtenthaler & Buschmann, 2001).

Una vez que se han evaluado distintos modelos a partir de la combinación de diferentes variables para la predicción de carotenoides en hojas, se evidencia que la banda RED es la variable independiente predictora más adecuada para dicho fin. En diversos estudios se ha evidenciado que las longitudes de onda de las bandas GREEN, RED y NIR están implicadas en la predicción de carotenoides. Así lo determinaron Zhao et al (2016) para la predicción de carotenoides totales en hojas de pepino empleando imágenes hiperespectrales en un rango de 400 a 1000 nm. Y seleccionaron cinco longitudes de onda importantes a: 484, 558, 675, 705 y 765 nm (Zhao et al, 2016). En hojas de té negro aplicando diferentes tratamientos de nitrógeno, seleccionaron longitudes de onda a 560, 671, 703, 715 y 760 nm para estimar el contenido de carotenoides totales (Wang et al, 2018).

Ihsan et al (2019) encontraron la capacidad de las imágenes hiperespectrales para la predicción del contenido de carotenoides en hojas de mabolo, las longitudes de onda más importantes fueron 578 y 762. En los estudios antes mencionados utilizan una cámara hiperespectral, la cual muestra información espectral de todo el espectro visible e infrarrojo cercano, por lo que nuestra cámara al ser multiespectral no abarca ciertas longitudes de onda

importantes como a 484, 703, 705, 715, y 760, por lo tanto, podemos sugerir utilizar una cámara hiperespectral para obtener mejores resultados (Ihsan et al, 2019).

Es necesario seleccionar adecuadamente las bandas espectrales para la predicción de carotenoides, ya que no siempre los valores de reflectancia están relacionados con la concentración de carotenoides, y podría deberse a otros factores internos de la hoja. Ihsan, et al (2019) en su estudio realizado en hojas de mabolo presentaron errores de medición con un RMSE (error cuadrático medio de la raíz) alto de 39,21. Al correlacionar de manera directa el porcentaje de reflectancia relativa a diferentes concentraciones de carotenoides versus la longitud de onda, demostraron que los valores altos de reflectancia no representan necesariamente valores altos de contenido de carotenoides y viceversa (Ihsan et al, 2019). Además, Wang et al (2018) indicaron los espectros que corresponden a los pigmentos fotosintéticos y aquellos que identifican otros componentes. Tanto la región espectral visible (VIS) y el borde rojo (REG) fueron importantes para la identificación de pigmentos fotosintéticos. La región (VIS) de 400 a 680 nm tenía una reflectancia relativamente más baja y los valores de reflectancia aumentaron en los rangos de 680 a 750 nm (REG). Mientras que valores altos de reflectancia correspondientes a 780-1000 nm estaban estrechamente relacionados con las discontinuidades estructurales celulares internas de las hojas (Wang et al, 2018).

La investigación realizada, aunque demuestra una correlación entre la Banda RED y el contenido de carotenoides no es suficiente para ser usada como un modelo predictivo de la concentración de carotenoides, por lo que los resultados obtenidos se deben considerar únicamente como un punto de partida para análisis posteriores. Se requiere realizar investigaciones en otras especies vegetales y que involucren rangos de reflectancia más amplios para establecer la validez del modelo predictivo.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Se logró establecer la correlación entre los valores de reflectancia de las cinco bandas espectrales con la concentración de carotenoides totales obtenidos por los dos métodos de extracción en las hojas de *Jungia rugosa*. Tras realizar el análisis estadístico se corroboró que el método de extracción 2 es el que mejor se ajusta a nuestra variable de respuesta y que la Banda RED es la más importante para la predicción del contenido de carotenoides.
- La ecuación de regresión lineal múltiple para cada método de extracción fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para predecir la concentración de carotenoides. Sin embargo, al considerar los valores de R^2 ajustado se observa que éstos explican en un bajo porcentaje la variabilidad de la concentración de carotenoides (variable de respuesta), siendo el método de extracción 2 el que explica un mayor porcentaje de variación (35.7%). Lo cual nos hace suponer que éste último al utilizar un solvente apolar permitió una mayor extracción en comparación con el uso del etanol absoluto y que probablemente existen otros factores que influyen en la variación de los valores de reflectancia.
- Al comparar la concentración de carotenoides totales en distintos sitios de recolección de *Jungia rugosa*, se comprobó que únicamente en el método de extracción 2 existieron diferencias estadísticamente significativas entre los lugares de recolección Llaviuco y San José de Raranga, siendo este último el que presenta la mayor concentración de carotenoides.

4.2 Recomendaciones

1. Se sugiere emplear los datos obtenidos como punto de partida para estudios posteriores en los que se investigue la correlación entre los valores de reflectancia y la concentración de otros metabolitos secundarios de interés y en distintas plantas para evaluar la validez del modelo predictivo.
2. Se propone realizar un estudio de predicción de carotenoides por medio de imágenes hiperespectrales para tener una mayor comprensión del espectro visible e infrarrojo cercano sin pérdidas de información.

Referencias

- Alonso, M. (2009). Espacios de color RGB, HSI y sus generalizaciones a η -dimensiones. [Tesis de Grado, Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica]. Repositorio del INAOE. <http://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1009/362>
- Amigo, J. (2019). *Data Handling in Science and Technology: Hyperspectral Imaging (vol. 32)* ScienceDirect.com by Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/bookseries/data-handling-in-science-and-technology/vol/32/suppl/C>
- Baños, R., Fonseca, M., Álvarez, M. (2019). Análisis de regresión lineal múltiple con SPSS: un ejemplo práctico. REIRE: Revista d'Innovació I Recerca En Educació, 12(2), 10. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7057067>
- Barba, F., Esteve, M., Frigola, A. (2014). Bioactive Components from Leaf Vegetable Products. *Studies in Natural Products Chemistry*; 41:321-346. doi:10.1016/B978-0-444-63294-4.00011-5
- Butnariu, M. (2016). Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. *Journal of Ecosystem & Ecograph*; 6(2). doi: 10.4172/2157-7625.1000193
- Canada Center for Remote Sensing. (2009). Fundamentals of Remote Sensing. Obtenido de: https://www.nrcan.gc.ca/sites/www.nrcan.gc.ca/files/earthsciences/pdf/resource/tutor/fundam/pdf/fundamentals_e.pdf
- Carranco, M., Calvo, M., Pérez, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*; 61(3). Obtenido de: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
- Carvalho, L., Gomes, P., Godoy, R., Pacheco, S., do Monte, P., Nutti, M., Neves, A., Vieira, A., Ramos, S. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47(2), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.040>

- Casierra, F., Ávila, O., Riascos, D. (2012) Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. *Temas agrarios*, 17(1). doi:10.21897/rta.v17i1.697
- Chacón, T., Esquivel, P. (2013). Frutos tropicales como fuente de carotenoides: biosíntesis, composición, biodisponibilidad y efectos de procesamiento. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*;4(1): 01-023.
- Chen, P., Wei, X., Qi, Q., Jia, W., Zhao, M., Wang, H., Zhou, Y., Duan, H. (2021). "Study of Terpenoid Synthesis and Prenyltransferase in Roots of *Rehmannia Glutinosa* Based on ITRAQ Quantitative Proteomics." *Frontiers in Plant Science*, vol. 12, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.693758>
- ElMasry, G., Mandour, N., Al-Rejje, S., Belin, E., Rousseau, D. (2019). Recent Applications of Multispectral Imaging in Seed Phenotyping and Quality Monitoring- An Overview. doi:10.3390/s19051090
- Fiedor J., Burda K (2021). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*; 6(2):466-88. doi: 10.3390/nu6020466.
- Flores, M., Torres, F., Monzon, J., Escobedo, M., Glossman, D & Barraza, D. (2017). "Electronic Structure of Carotenoids in Natural and Artificial Photosynthesis". En Cvetkovic, D., Nikolic, G (eds.), *Carotenoids*, IntechOpen, London. doi:10.5772/67636.
- Fontal, B. (2008). *El Espectro Electromagnético y sus Aplicaciones VII Escuela Venezolana Para la Enseñanza de la Química*. http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16746/espectro_electromagnetico.pdf?sequence=1
- García, A., Carril, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*, 2(3). <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- García, S. (2015). Instrumentos de Observación. Instituto Politécnico Nacional. [PDF]. Studocu. Recuperado de: <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-politecnico-nacional/fisiologia/espectro-pdf/11221767>

Gómez, A., Velásquez, F., Jiménez, A. (2016). Agricultura de Precisión y Sensores Multiespectrales Aerotransportados. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/317225959_Agricultura_de_Precision_y_Sensores_Multiespectrales_Aerotransportados

Grajeda, U. (2018). Desarrollo de algoritmos matemáticos para detectar la presencia de bacterias, hongos y plagas, utilizando sistemas de procesamiento de imágenes [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Repositorio digital de UANL <http://eprints.uanl.mx/16664/>

Hammond, B., Renzi, L. (2013) Carotenoids. *Advances in Nutrition*;4(4):474-6. doi: 10.3945/an.113.004028

Horning, N. (2019). *Remote Sensing* (B. Fath, Ed.). ScienceDirect; Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095489106074>

Ihsan, M., Saputro, A., Handayani, W. (2019). Hyperspectral Imaging Feature Selection Using Regression Tree Algorithm: Prediction of Carotenoid Content Velvet Apple Leaf. 3rd International Conference on Informatics and Computational Sciences (ICICoS). doi: 10.1109/ICICoS48119.2019.8982490

Kotawadekar, R. (2021). *9 - Satellite data: big data extraction and analysis* (D. Binu & B. R. Rajakumar, Eds.). ScienceDirect; Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128206010000082>

León, C., Reyes, P. (2017). Estandarización de la técnica blanqueamiento del betacaroteno para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos lipofílicos: plantas medicinales, frutos y microalgas. [Tesis de Grado, Universidad de Cuenca]. Repositorio institucional - Universidad de Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27662>

Liang, S., Wang, J. (2020). *Chapter 1 - A systematic view of remote sensing*. ScienceDirect; Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128158265000015>

- Lichtenthaler, H., Buschmann, C. (2001). Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4.2.1–F4.2.6. doi: 10.1002/0471142913.faf0402s01
- Macar, O., Kalefetoglu, T. (2018). Altitude Triggers Some Biochemical Adaptations of *Polygonum cognatum* Meissn. *Plants. Cumhuriyet Science Journal*; 39(3):621-627. doi: 10.17776/csj.375050
- Manosalvas, S. (2019). Diseño e implementación de un sensor multiespectral para un vehículo aéreo no tripulado que ayude a la agricultura de precisión. [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas]. Repositorio institucional - Universidad de las Fuerzas Armadas. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/20789/T-ESPE-039628.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Maoka T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*;74(1):1-16. doi: 10.1007/s11418-019-01364-x. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31588965/>
- Meléndez, A., Mapelli, P., Hornero, D & Vicario, I. (2019). CAPÍTULO 1: Estructuras, nomenclatura y química general de los carotenoides y sus ésteres; pp. 1-50 doi: 10.1039/9781788015851-00001
- Meléndez, A., Vicario, I., Heredia F. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas [Carotenoid pigments: structural and physicochemical considerations]. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*;57(2):109-17.
- Mellado, E. (2013). Biosíntesis, acumulación y estabilidad de carotenoides en cereales. Estudio comparativo entre trigo duro (*Triticum turgidum*) y Tritordeum (*H. chilense* x *T. turgidum* conv. *durum*). Repositorio Institucional del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. <http://hdl.handle.net/10261/118198>
- Merhan, O. (2017). The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. Carotenoids. IntechOpen. doi:10.5772/67592

- Minocha, R., Martinez, G., Lyons, B., & Long, S. (2009). Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(4), 849–861. doi:10.1139/x09-015
- Moya, J. (2014). Comunicaciones por Radio. Tecnologías, redes y servicios de radiocomunicaciones. In *Google Books*. Grupo Editorial RA-MA. <https://books.google.com.ec/books?id=lo2fDwAAQBAJ&dq=El+espectro+visible+se+encuentra+entre+la+radiaci%C3%B3n+infrarroja+y+la+radiaci%C3%B3n+ultravioleta>
- National Aeronautics and Space Administration. Science Mission Directorate. (2010). *Introduction to the Electromagnetic Spectrum | Science Mission Directorate*. Nasa.gov. https://science.nasa.gov/ems/01_intro
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N., & Pogson, B. (2015). Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*; 8(1):68-82. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.007
- Northeastern University. *Overview of Spectroscopy*. (2016). Chemistry LibreTexts. https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/10%3A_Spectroscopic_Methods/10.1%3A_Overview_of_Spectroscopy
- OPTEC (Optic and Photonics Series). (2008). *Basics of Spectroscopy*. Photonics Enabled Technologies Module.
- Ordóñez, J. (2012). Espectro electromagnético y espectro radioeléctrico. *Manual Formativo de ACTA*, 62, 17–31. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5738106>
- Parody, A., Zapata, E. (2018). Agricultura de precisión en Colombia utilizando teledetección de alta resolución. *Suelos Ecuatoriales*. 48 (2), 41-49
- Plaza, J., Criado, M., Sánchez, N., Pérez, R., Palacios, C., Charfolé F. (2021). UAV Multispectral Imaging Potential to Monitor and Predict Agronomic Characteristics of Different Forage Associations. *Agronomy*; 11(9). doi: 10.3390/agronomy11091697
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., Sierra, G.(2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria L* que crece en Cuba. *Bionatura*; 5(3). doi: 10.21931/RB/2020.05.03.7

- Quito, N. (2020). *Evaluación del estrés hídrico en el cultivo de brócoli (Brassica oleracea var. Itálica), mediante técnicas espectrales*. [Tesis de Grado, Universidad de Cuenca]. Repositorio institucional - Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/34984/5/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Román, A., Vargas, N. (2013). Análisis de imágenes hiperespectrales. *Revista Ingeniería y desarrollo*, pp. 14-17,
- Sánchez, A., Simón, P., Arguijo, H. (2018). Análisis de imágenes multiespectrales para la detección de cultivos y detección de plagas y enfermedades en la producción de café, *147(7)*, 309–317. https://rcs.cic.ipn.mx/2018_147_7/Analisis%20de%20imagenes%20multiespectrales%20para%20la%20deteccion%20de%20cultivos%20y%20deteccion%20de%20plagas.pdf
- Santos, N., Salas, R., Hernández, B., Villanueva, C. (2019). *Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds*. IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.83815
- Scott, K. (2001). Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* doi:10.1002/0471142913.faf0202s00
- Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2018). *Principios de Análisis Instrumental*. (7.^a ed). Cengage.
- Sun, T., Rao, S., Zhou, X., Li, L (2022). Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*. doi: 10.1186/s43897-022-00023-2
- Swapnil, P., Meena, M., Singh, S., Dhuldhaj, U., Harish, H., Marwal, A (2021). Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*, 26, 100203. doi: 10.1016/j.cpb.2021.100203

- Taungbodhitham, A., Jones, G., Wahlqvist, M., Briggs, D. (1998). Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 63(4), 577–584. doi:10.1016/s0308-8146(98)00011-9
- Vargas, C., Sánchez, G., Jiménez, P. (2013). La producción de metabolitos secundarios en la familia Brassicaceae. 9 (2), 286-305
- Verhey, L., Petti, P. (2010). 7 - *Principles of Radiation Physics* (R. T. Hoppe, T. L. Phillips, & M. Roach, Eds.). ScienceDirect, 95–119. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978141605897700007X?via%3Dihub>
- Vilà, R., Torrado, M., Reguant, M. (2019). Análisis de regresión lineal múltiple con SPSS: un ejemplo práctico. *REIRE Revista d'Innovació i Recerca en Educació*, 12(2), 1–10. doi: 10.1344/reire2019.12.222704
- Wang, Y., Hu, X., Jin, G., Hou, Z., Ning, J., Zhang, Z. (2018). Rapid prediction of chlorophylls and carotenoids content in tea leaves under different levels of nitrogen application based on hyperspectral imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1997–2004. doi:10.1002/jsfa.9399
- Wojdyło, A., Nowicka, P., Tkacz, K., Turkiewicz, I. (2021). Fruit tree leaves as unconventional and valuable source of chlorophyll and carotenoid compounds determined by liquid chromatography-photodiode-quadrupole/time of flight-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-PDA-qTof-ESI-MS). *Food Chemistry*, 349, 129156. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129156
- Yeverino, M. (1997). Determinación Cuantitativa de Carotenoides En Hojas de Cinco Especies Del Género *Leucaena*. [Tesis de Posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León]. *Cd.dgb.uanl.mx*. <https://cd.dgb.uanl.mx/handle/201504211/1806>
- Zarco, P., Guillén-Climent, M., Hernández, R., González, M., Martín, P. (2013). “Estimating Leaf Carotenoid Content in Vineyards Using High Resolution Hyperspectral Imagery Acquired from an Unmanned Aerial Vehicle (UAV).” *Agricultural and Forest Meteorology*, vol. 171-172, pp. 281–294, doi: 10.1016/j.agrformet.2012.12.013.

Zhao, Y., Li, X., Yu, K., Cheng, F., He, Y. (2016). Hyperspectral Imaging for Determining Pigment Contents in Cucumber Leaves in Response to Angular Leaf Spot Disease. Scientific Reports, 6(1), 27790. doi:10.1038/srep27790

Anexos



Anexo A: Sitio de recolección: Llaviuco



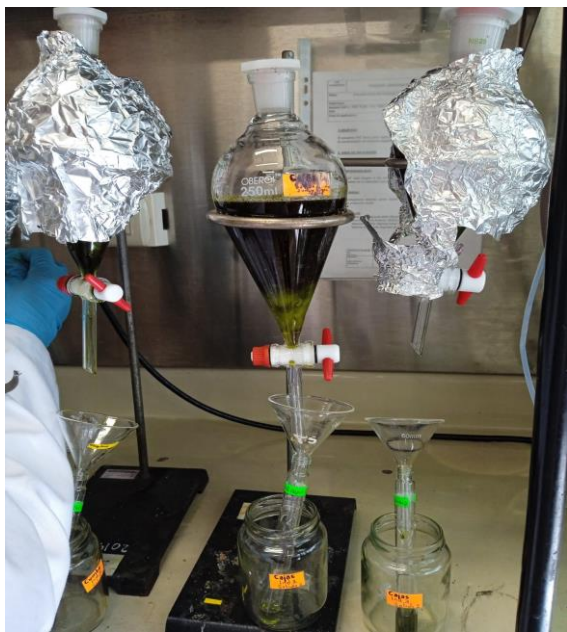
Anexo B: Sitio de recolección: Mosquera



Anexo C: Sitio de recolección: San José de Raranga.



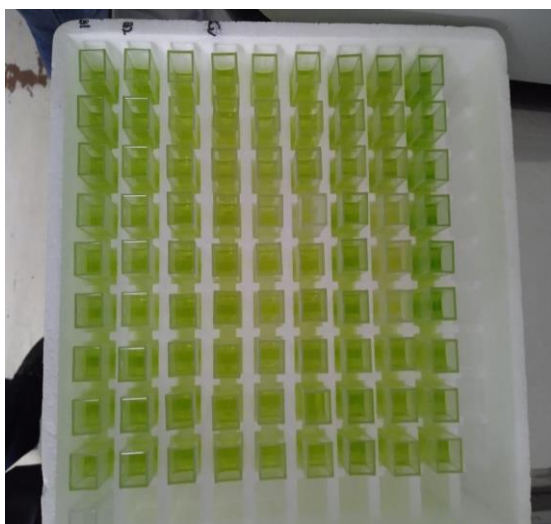
Anexo D: Hojas liofilizadas de *Jungia rugosa*



Anexo E: Obtención de extractos por percolación



Anexo F: Concentración del extracto



Anexo G: Cuantificación de carotenoides metanólica



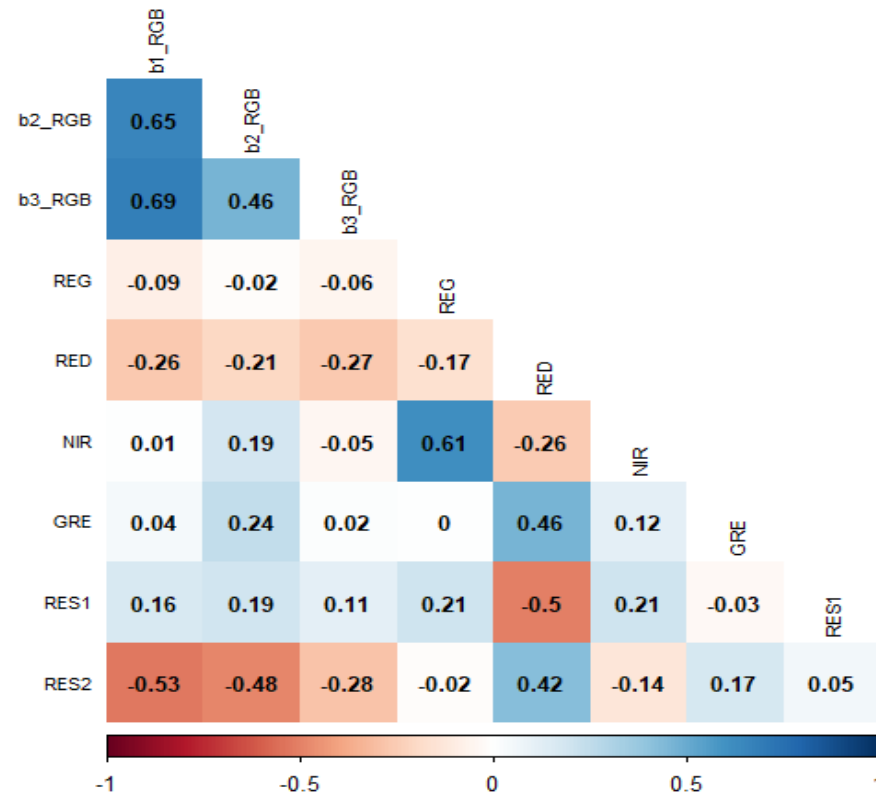
Anexo H: Fase etérea 2 y fase

Anexo I. Tabla de resultados de la determinación de carotenoides en el extracto, obtenidos por RT-HPLC-DAD

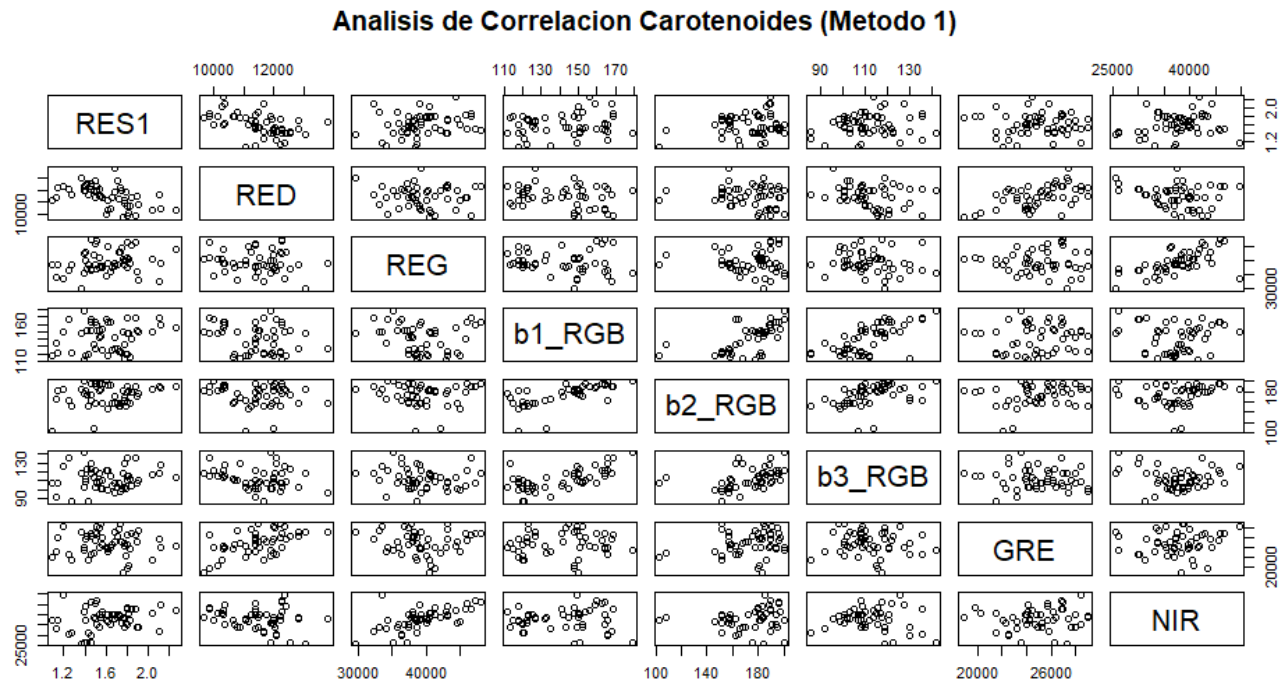
Código del extracto	Luteína			β Criptoxantina			α caroteno			β caroteno		
	(tR) (min)	Área	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en extracto	(tR) (min)	Área	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en extracto	(tR) (min)	Área	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en extracto	(tR) (min)	Área	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) en extracto
B1.S1	11.65	181.35	0.82				20.04	44.39	0.86	22.61	445.98	1.55
B2.S1	11.65	333.72	1.23				20.05	61.45	0.89	22.62	553.16	1.72
B3.S1	11.65	173.30	0.80				20.04	45.58	0.87	22.63	471.28	1.59
CA1.S1	11.64	44.88	0.46	18.29	21.52	0.85	19.99	44.88	0.87	22.59	258.41	1.24
CA2.S1	11.65	344.87	1.26	18.29	122.74	0.99	20.01	63.39	0.89	22.61	655.09	1.89
CA3.S1	11.64	216.47	0.92	18.31	27.60	0.85	20.01	60.15	0.88	22.62	479.94	1.60
SJ1.S1	11.66	247.14	0.99	18.32	41.53	0.88	20.04	50.15	0.87	22.64	545.62	1.71
SJ2.S1	11.65	339.04	1.24	18.32	68.61	0.92	20.05	55.01	0.88	22.64	473.21	1.59
SJ3.S1	11.66	105.38	0.62	18.32	17.78	0.84	20.04	44.83	0.87	22.64	292.06	1.29
B1.S2	11.66	266.49	1.05				20.06	73.62	0.90	22.65	2378.39	4.73
B2.S2	11.66	254.53	1.02							22.66	413.43	1.49
B3.S2	11.66	113.51	0.64				20.06	40.68	0.86	22.66	480.86	1.61
CA1.S2	11.66	268.34	1.05	20.04	41.55	0.89	18.32	51.59	0.86	22.64	376.07	1.43
CA2.S2	11.66	259.49	1.03	20.04	50.74	0.91	18.32	61.58	0.87	22.64	361.93	1.41
CA3.S2	11.66	45.92	0.46	18.32	17.40	0.84	20.05	44.62	0.86	22.65	285.06	1.28
SJ1.S2	11.66	267.76	1.05				20.05	41.45	0.86	22.66	442.56	1.54

SJ2.S2	11.66	244.93	0.99	18.33	58.72	0.90	20.04	88.67	0.92	22.66	523.40	1.68
SJ3.S2	11.66	254.71	1.02	18.34	48.14	0.89	20.06	61.29	0.89	22.67	557.52	1.73

* (tR): tiempo de retención

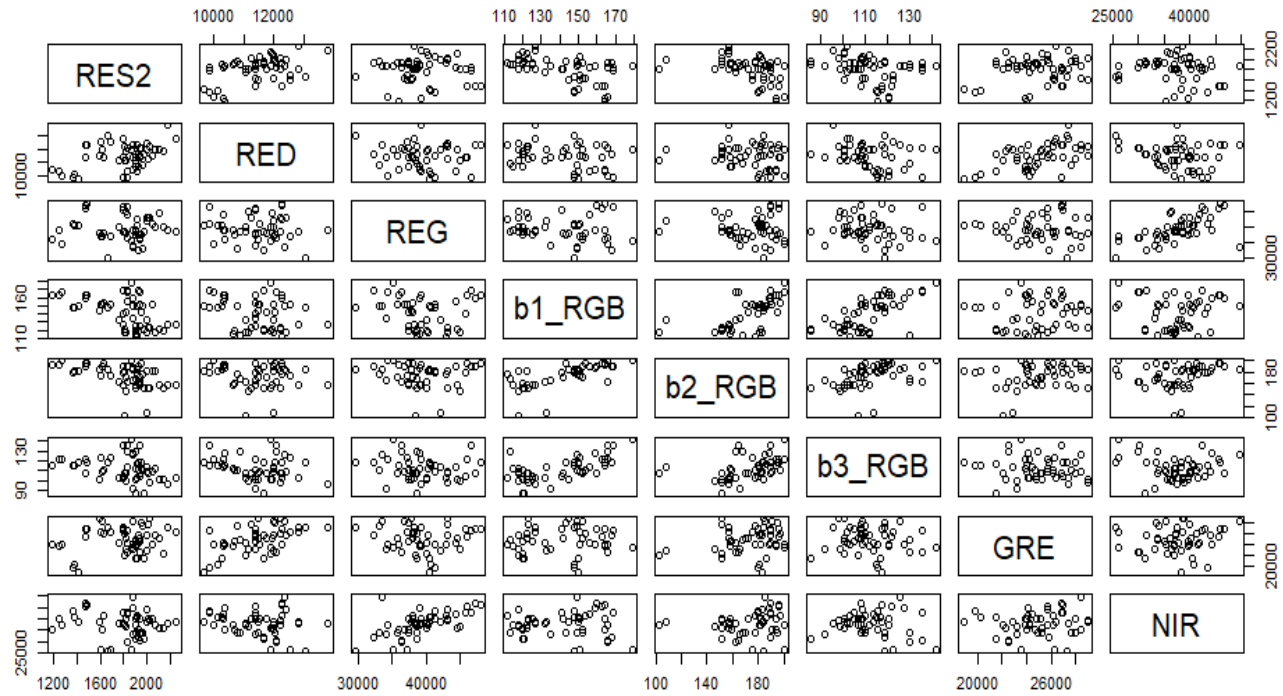


Anexo J: Gráfica de correlación de los dos modelos.

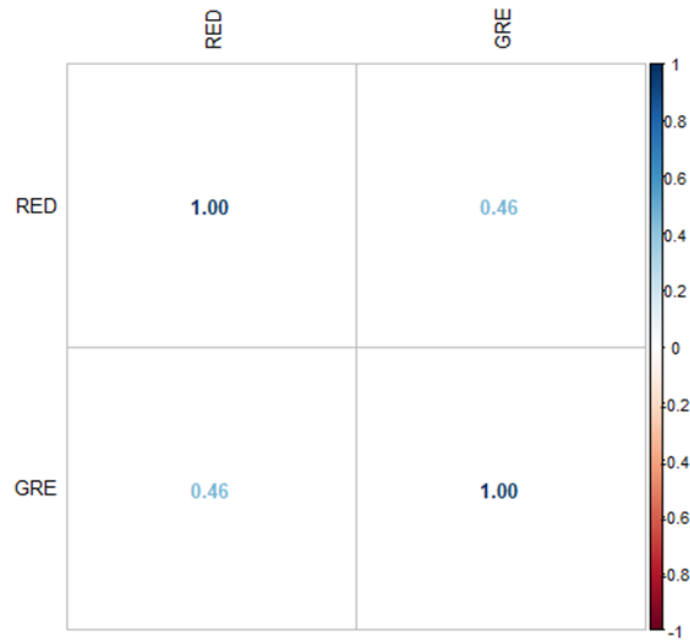


Anexo K: Matriz de gráficos de dispersión del modelo 1

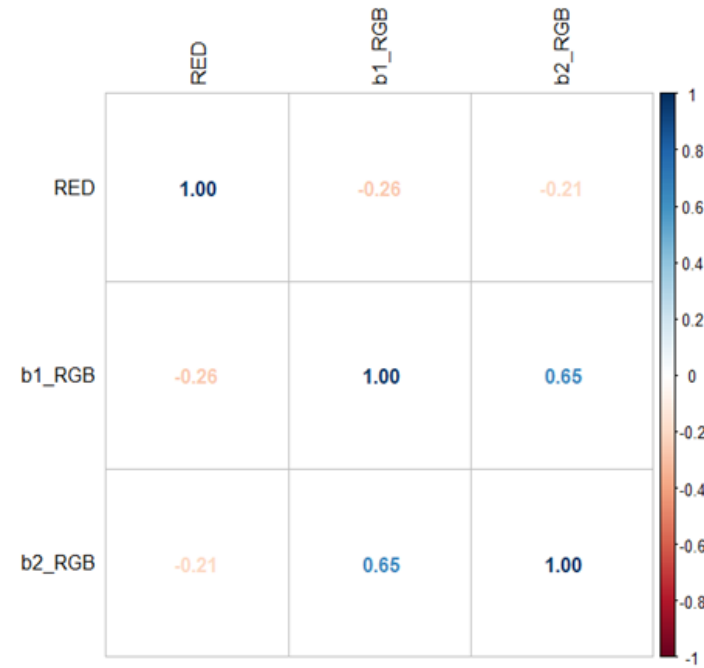
Analisis de Correlacion Carotenoides (Metodo 2)



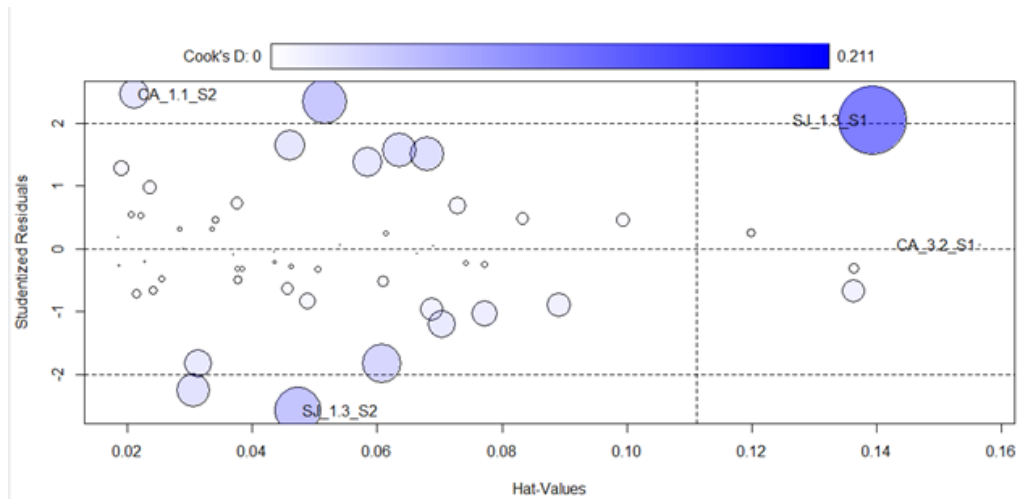
Anexo L: Matriz de gráficos de dispersión del modelo 2.



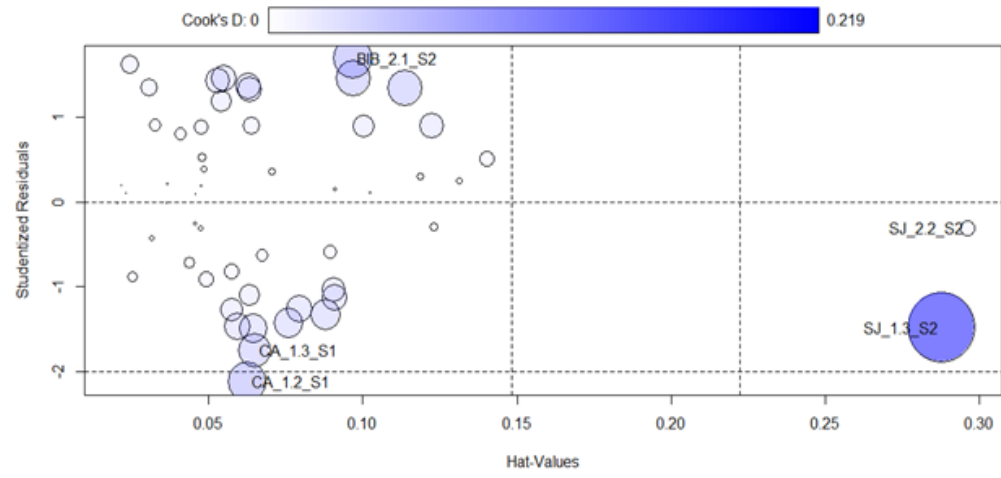
Anexo M: Gráfica de multicolinealidad del modelo 2.



Anexo N: Gráfica de multicolinealidad del modelo 1.



Anexo O: Gráfico de influencia del modelo 1.



Anexo P: Gráfico de influencia del modelo 2.

Variable X								Variable Y	
								Hojas liofilizadas	Extracto
Ind	b1_RGB22S1	b2_RGB22S1	b3_RGB	REG	RED	NIR	GRE	RESPUESTA 1	RESPUESTA 2
BIB_1.1_S1	179	200	142	35200	11904	26176	23552	1.398	1863.529
BIB_1.2_S1	120	151	86	38656	11648	31360	21440	1.436	1898.039
BIB_1.3_S1	166	162	130	36288	12100	30000	22528	1.452	1832.157
BIB_2.1_S1	121	151	86	38656	11648	31360	21440	1.278	1972.308
BIB_2.2_S1	166	164	136	36288	12096	30208	22528	1.244	1944.615
BIB_2.3_S1	149	185	126	33536	12352	49600	28416	1.19	1883.077
BIB_3.1_S1	151	175	123	37120	12544	26304	26304	1.459	1687.547
BIB_3.2_S1	148	184	119	29696	13056	25536	27328	1.362	1663.369
BIB_3.3_S1	151	175	123	37120	12544	26304	26304	1.423	1606.038
BIB_1.1_S2	152	191	109	36736	11968	35264	28480	1.517	1615.094
BIB_1.2_S2	145	184	101	37824	11456	38464	28992	1.545	1587.925
BIB_1.3_S2	154	197	110	38080	11392	41152	26112	1.558	1633.208
BIB_2.1_S2	169	190	136	46592	9856	42432	26816	1.803	1831.111
BIB_2.2_S2	169	190	136	46592	9856	42432	26816	1.874	1792.593

BIB_2.3_S2	141	180	105	45696	11392	42880	26944	1.835	1798.519
BIB_3.1_S2	163	196	122	46016	11392	45504	25664	1.494	1476.923
BIB_3.2_S2	164	196	118	47872	12288	45888	26944	1.462	1483.154
BIB_3.3_S2	160	190	108	47168	12288	46656	26880	1.507	1470.769
CA_1.1_S1	166	200	121	34304	9994	37056	24192	1.598	1274.182
CA_1.2_S1	164	194	116	35904	10368	35392	24000	1.641	1186.909
CA_1.3_S1	164	194	121	39232	10304	39680	23936	1.611	1245.091
CA_2.1_S1	159	188	128	39040	10368	44352	24128	2.115	1876.364
CA_2.2_S1	150	186	117	40512	10240	40448	21504	2.036	1911.273
CA_2.3_S1	156	189	114	44288	10304	41792	24448	2.265	1835.636
CA_3.1_S1	148	180	116	41216	9856	43392	19776	1.798	1369.600
CA_3.2_S1	150	183	118	40448	9664	38208	18816	1.764	1411.200
CA_3.3_S1	148	181	115	40640	10112	40832	20224	1.807	1376.000
CA_1.1_S2	168	189	119	32384	11648	31488	25792	2.104	1925.818
CA_1.2_S2	149	177	110	33088	10752	33920	27632	1.909	1963.636
CA_1.3_S2	152	170	108	35712	11456	33600	25280	1.895	1943.273
CA_2.1_S2	113	168	130	38540	10880	33792	24952	1.78	1901.176

CA_2.2_S2	115	158	112	39104	10624	36928	23912	1.825	1907.451
CA_2.3_S2	120	159	110	37440	10688	35104	24640	1.804	1929.412
CA_3.1_S2	132	162	102	39952	11072	37680	24256	1.776	1754.340
CA_3.2_S2	142	172	107	37952	11776	40224	25152	1.685	1824.151
CA_3.3_S2	125	158	105	37376	11392	39616	24768	1.659	1942.264
SJ_1.1_S1	127	157	102	38272	12824	38568	26392	1.71	2254.815
SJ_1.2_S1	120	151	101	40064	11880	35664	22288	1.792	2145.185
SJ_1.3_S1	127	157	96	39272	13824	37568	27392	1.676	2176.000
SJ_2.1_S1	123	152	98	43008	12232	38928	28968	1.737	2026.154
SJ_2.2_S1	122	157	101	44480	11944	36112	25248	1.748	2112.308
SJ_2.3_S1	123	152	108	43008	11232	39928	27968	1.718	2012.308
SJ_3.1_S1	125	158	101	37376	11392	39616	24768	1.565	1897.600
SJ_3.2_S1	118	146	99	44992	11136	36344	23160	1.621	1820.800
SJ_3.3_S1	127	157	103	38272	12824	37568	27392	1.503	1801.600
SJ_1.1_S2	135	166	92	34112	11392	33280	23168	1.124	1877.736
SJ_1.2_SS2	122	182	108	38528	12224	37248	26112	1.143	1802.264
SJ_1.3_S2	118	103	107	38464	11072	36928	22016	1.091	1811.032

SJ_2.1_S2	118	181	112	40320	11968	37184	25728	1.411	2076.863
SJ_2.2_S2	133	108	114	42112	11968	38208	22848	1.484	1998.431
SJ_2.3_S2	151	182	109	41344	11520	40000	24000	1.536	2051.765
SJ_3.1_S2	112	177	103	42880	12288	41600	24128	1.396	1915.636
SJ_3.2_S2	118	183	109	43072	12416	43840	25728	1.408	1994.182
SJ_3.3_S2	143	195	119	37440	12032	33536	28032	1.535	1950.545

Anexo Q: Tabla de resultados de datos de reflectancia de cada banda y los métodos 1 y 2.