

Análisis térmico de semilla de maíz con plaga por microscopía fotopiroeléctrica

Dominguez-Pacheco A.¹, Hernández Aguilar C.^{*}, Zepeda Bautista R. y Martínez Ortiz E.
*Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica Matemáticas, Instituto Politécnico Nacional
 Edificio 5, U. P. Adolfo López Mateos, 07730, México D.F., México*

Cruz-Orea A.

**Departamento de Física, CINVESTAV – IPN
 A. P. 14-740, México D.F., C.P. 07360, México*

(Recibido: 13 de septiembre de 2011; Aceptado: 4 de mayo de 2012)

Diversos materiales homogéneos han sido estudiados mediante técnicas fototérmicas, con la finalidad de caracterizarlos en los parámetros térmicos y ópticos. De estas técnicas la Microscopía Fotoacústica y Fotopiroeléctrica se han aplicado para la obtención de imágenes térmicas a nivel superficial y a profundidad de diversos materiales con la posibilidad de detallar al interior del material, dependiendo de la frecuencia de modulación de la luz que incide sobre la muestra. En el presente estudio se obtuvo la imagen térmica, mediante Microscopía Fotopiroeléctrica, de un objeto biológico que presenta una no-homogeneidad como lo es la semilla de maíz. Las diferencias en las estructuras componentes de la semilla pudo ser observada a través de su imagen térmica, en donde se puede hacer una interpretación de esta mediante una escala de colores que se obtiene de las diferencias de potencial de la señal fotopiroeléctrica al realizarse el barrido sobre el sensor piroeléctrico que está en contacto con la muestra. Estas diferencias de señal fotopiroeléctrica son causadas por variaciones del tipo de material que constituyen localmente la muestra y que presentan diferencias en sus parámetros térmicos. En el caso de este estudio la muestra fue una semilla infectada por plaga palomilla (*Ostrinia nubilalis*) y la imagen térmica muestra el daño producido en el interior de la semilla de maíz por esta plaga.

Palabras Claves: Microscopía fotopiroeléctrica; Imagen térmica; Maíz

Photothermal techniques have been used to characterize the thermal and optical parameters of different homogeneous materials. Among these techniques the photopyroelectric and photoacoustic microscopy have been applied for obtaining superficial and in-depth thermal images of several materials with the possibility to obtain sub-superficial characteristics by changing the modulation frequency of the incident light on the sample under study. In the present research the thermal image of a non-homogeneous material such as a biological object, in this case a maize seed was obtained by photopyroelectric microscopy. The differences in the seed structural components were observed through its thermal image obtained from the photopyroelectric signal when the modulated light is scanned on the pyroelectric sensor, which is in good thermal contact with the sample. A scale of colors is used to represent the different values of the photopyroelectric signal, as a function of the scan coordinates, which allows observing better the seed components. The differences of photopyroelectric signal are caused by the inhomogeneities in the optical and thermal properties of the material which locally constituting the sample. In the case of this study the sample was an infected seed with “Palomilla” (*Ostrinia nubilalis*) plague and the thermal image shows the damage at the interior of the maize seed due to this plague.

Keywords: Photopyroelectric microscopy; Thermal imaging; Maize seed

1. Introducción

El fenómeno fotoacústico, descubierto hace más de 100 años por Alexander Graham Bell fue el comienzo de la Espectroscopía Fotoacústica (EFA) y el inicio del desarrollo de las técnicas fototérmicas (FT) años después. La técnica EFA fue la primera que comenzó a desarrollarse de las técnicas FT y que actualmente se emplean para caracterizar óptica y térmicamente materiales. En las técnicas FT de forma general se hace incidir energía luminosa de forma periódica (o modulada) sobre la muestra de la que se quiere obtener sus parámetros ópticos o térmicos en los diferentes estados que los materiales pueden presentar como sólido, líquido o gaseoso. Esta energía luminosa es absorbida por la muestra y parcialmente es transformada en calor; este calor es

generado en forma de flujo periódico a través de la muestra que origina una onda térmica que se propaga en toda la muestra [1]. Debido a que las variaciones de temperatura en la muestra dependen de sus propiedades térmicas y ópticas, se pueden realizar estudios de los parámetros que la caracterizan como la difusividad térmica, el calor específico, el coeficiente de absorción óptico, etc., obteniéndose los valores de estos parámetros por medio de estas técnicas en sus diferentes modalidades como la espectroscopía fotoacústica (EFA), Microscopía Fotoacústica (MFA), Microscopía Fotopiroeléctrica (MFPE), Lente térmica, etc., [2-8]. Entre las técnicas FT reportadas en aplicaciones agrícolas esta la EFA para el estudio del coeficiente de absorción óptico del pericarpio de maíz y espectros de absorción ópticos [9], para

¹fartur@hotmail.com

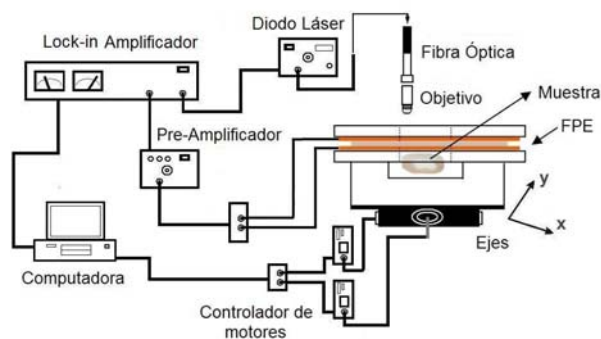


Figura 1. Instrumentación de Microscopia FPE

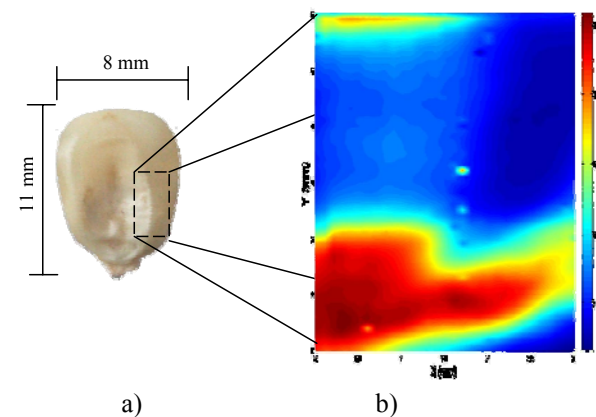
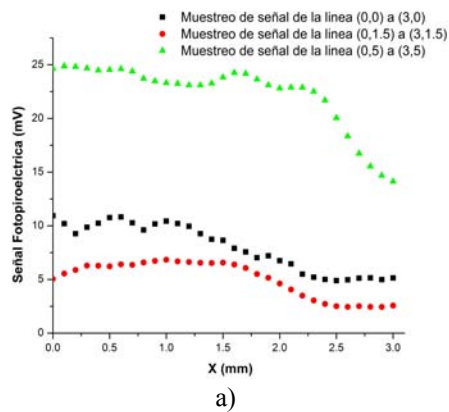


Figura 2. Imagen óptica (a) e imagen térmica (b) de la semilla de maíz (área escaneada 3 x 6 mm).

caracterización óptica de semillas de trigo [10]; así como para determinar niveles de clorofila a y b de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) [11-12]. Otros autores reportan el uso de la técnica EFA como una manera de diagnosticar enfermedades de semillas de trigo, empleando como fuente de excitación un láser de He-Ne [13]. Del conjunto de técnicas experimentales FT, las microscopias en distinta configuración han sido aplicadas, como la MFA para la obtención de imágenes térmicas de semillas de arroz, reportado por Susuki *et al.* (2005)[14], quienes emplearon como fuente de excitación un láser de Argón, a una frecuencia de modulación 90 Hz. Domínguez *et al.* (2010)[15] demostraron que la técnica de MFA es sensible para obtener imágenes térmicas con diferente contenido de humedad de semillas de rábano (*Raphanussativus*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*). La técnica de MFPE tiene la posibilidad de emplearse bajo dos configuraciones: directa e inversa [17]. En la directa, el haz de luz modulado incide sobre la muestra, la cual está en contacto térmico con el sensor piroeléctrico, así el calor generado en la muestra es difundido y detectado por este sensor. En el caso de la configuración inversa se hace incidir un haz de luz modulado sobre el sensor que genera un calentamiento periódico que es transmitido hacia la muestra, que está en

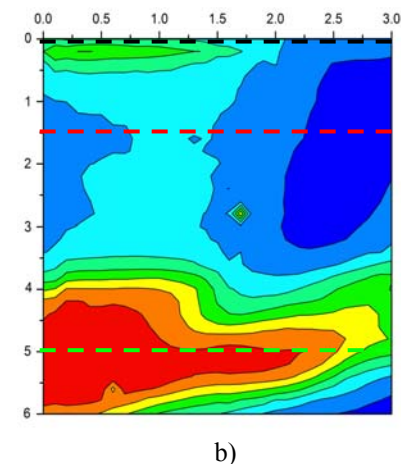


Figura 3. (a) Muestra las curvas de la señal fotopiroeléctrica obtenida de los barridos sobre la muestra en 3 diferentes líneas sobre el eje x, (b) Imagen térmica de contorno en donde se observa las diferencias de materiales de componentes estructurales que constituyen la semilla.

contacto térmico al otro lado del sensor. En esta configuración inversa la señal FPE únicamente depende de las propiedades térmicas de la muestra. Con la técnica de MFPE se puede obtener la imagen térmica de la muestra al realizar un barrido sobre esta y con base en los datos obtenidos de cada punto se forma la imagen térmica. Una característica de la MFPE es que se pueden obtener imágenes térmicas de materiales no homogéneos tanto superficialmente como a profundidad [18]. En el caso de materiales biológicos que son analizados mediante las técnicas FT por su característica muy importante de ser no destructivas, abren un gran panorama para la caracterización de materiales en las áreas agrícola y de alimentos sin que destruyan el objeto en estudio. Por ello en esta investigación se planteó como objetivo demostrar la posibilidad de obtener imágenes a profundidad de semilla de maíz dañadas por plaga palomilla (*Ostrinia nubilalis*) mediante la MFPE. Así como la implementación de un procedimiento diferente al reportado en la literatura científica que permitiría al sector industrial de semillas caracterizarlas mediante imágenes térmicas. De tal manera que la técnica de MFPE podría ser aplicada con grandes

ventajas en estudios de alimentos y objetos con estructura compleja como muestras biológicas manejadas en el sector agrícola.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material Biológico

El material biológico que se utilizó para la realización de este estudio fue semilla de maíz híbrido Intervarietal 65 (HV-65), proporcionado por el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP), producido en Zumpango, Edo. de México en el ciclo agrícola Primavera Verano 2008 (PV-2008).

2.2. Montaje experimental

El montaje experimental utilizado en el presente estudio corresponde a la técnica de MFPE en la configuración inversa, el cual se muestra en la Figura 1. La celda fotopiroeléctrica está constituida por un sensor piroeléctrico PDVF de $9\mu\text{m}$ de espesor que es colocado sobre una plataforma motorizada que hace un barrido en los ejes x-y. La fuente de excitación fue un diodo láser de 650 nm de longitud de onda a una potencia de 100 mW, acoplado a una fibra óptica. El haz del diodo laser fue enfocado mediante un objetivo de microscopio de 100X, lográndose un diámetro de focalización de $40\mu\text{m}$. Este haz fue modulado directamente por medio del oscilador interno del amplificador lock-in a una frecuencia de 1 Hz. El haz de luz láser se enfoca sobre la superficie del sensor piroeléctrico, lo que genera un calentamiento periódico que se transmite hacia la muestra, que está en contacto térmico con el otro lado del sensor que está cubierto de una fina capa de pasta térmica para obtener un mejor contacto con la muestra. La señal FPE que se produce pasa por una etapa de pre-amplificación antes de ser enviada al amplificador lock-in. Se realiza un barrido del haz incidente sobre cierta área de la muestra por medio de la plataforma x-y, que es controlada por una computadora que también adquiere y graba los datos del amplificador lock-in. La señal es registrada, en amplitud y fase, en función de la posición del haz incidente para obtener a través de estos datos la imagen térmica de la semilla mediante software. El área escaneada en este experimento fue $3 \times 6 \text{ mm}$ a una resolución de $100\mu\text{m}$.

3. Resultados y Discusión

La muestra biológica estudiada fue térmicamente gruesa, lo que significa que su grosor l_s es mucho mayor que la longitud de difusión térmica $\mu_s = (\alpha_s/\pi f)^{1/2}$ [7], donde f es la frecuencia de modulación de la luz incidente y α_s la difusividad térmica de la muestra. En este caso el grosor de la muestra fue $l_s = 0.4 \text{ cm}$ y la longitud de difusión térmica, calculada a partir del valor de $\alpha_s = 4.44 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ para

almidón [8], fue de $\mu_s = 0.0375 \text{ cm}$, lo que define que las muestras estudiadas son térmicamente gruesas.

Mediante la técnica de MFPE se obtuvo la imagen térmica de la semilla de maíz dañada por plaga palomilla (*Ostrinia nubilalis*). La imagen óptica y térmica de la semilla de maíz se muestra en la Figura 2a y 2b. En la imagen térmica se pueden observar los diversos matices de colores que la conforman. Esta escala representa la amplitud de la señal del sensor piroeléctrico en función de la posición en la muestra, que corresponden a las diferentes componentes estructurales en la semilla. En la Figura 2 se muestra una comparación de la imagen obtenida por MFPE y una imagen óptica obtenida por medio de un scanner de la misma semilla. En esta comparación se observa que en la imagen óptica no se percibe el daño en la semilla a diferencia de la imagen por MFPE donde claramente se observa el hueco producido por la plaga.

Las diferencias que se observan en la señal FPE son debidas a la inhomogeneidad de la semilla y a las diferencias en los parámetros térmicos de los tejidos que componen a la misma (endospermo, pericarpio, germen, etc.). Para observar estas diferencias en los parámetros térmicos se graficaron los datos de diferentes líneas de barrido de la semilla (Ver Figura 3a y 3b).

La semilla sufrió un daño debido a la infestación por plaga palomilla (*Ostrinia nubilalis*), pudiéndose distinguir en la imagen térmica este daño producido en el interior de la semilla por plaga sin necesidad de destruirla. En este caso la plaga al alimentarse del material interno de la semilla produjo un hueco, que puede ser observado en la imagen térmica obtenida. Estas diferencias de matices en colores denotan cambios en las propiedades térmicas con respecto al resto de la muestra. Esto se debe a que la semilla está constituida en su mayoría por almidón, que tiene como valor de difusividad térmica $\alpha_s = 4.44 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, mientras que el hueco producido por la plaga que contiene aire, tiene una difusividad térmica de $\alpha_s = 0.2 \text{ cm}^2/\text{s}$. Cuando una muestra es térmicamente gruesa, como el caso del presente estudio, se espera que la amplitud de la señal FPE se comporte de acuerdo a lo reportado por Chirtoc and Mihailescu, en 1989 [20]: $S_{amp} = A_0 e^{-a_s x}$ y tomando el logaritmo natural en esta ecuación se tiene $\ln S_{amp} = \ln A_0 - a_s x$, lo que denota un comportamiento lineal de $\ln S_{amp}$ en función de x , cuya pendiente es a_s .

En la Figura 4 se muestra la gráfica obtenida del muestreo que se realizó linealmente sobre la semilla. Se observa que esta contiene dos pendientes diferentes, lo cual permite obtener la relación entre ellas. Las pendientes están directamente relacionadas con la variación de la señal fotopiroeléctrica, que presenta cambios en relación con el material que fue muestreado [3]. Teniendo R_m como la relación de las pendientes de las gráficas de las líneas muestreadas.

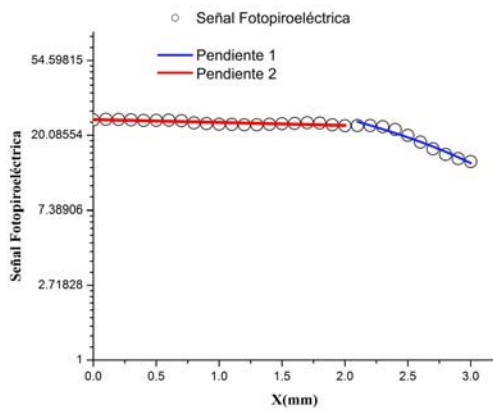


Figura 4. Muestra la diferencia entre las pendientes del barrido de la señal fotopiroeléctrica

Obteniéndose la siguiente relación.

$$Rm = \frac{m_1}{m_2}, \quad m = \alpha_s, \quad \alpha_s = \sqrt{\frac{\pi f}{\alpha_s}} \therefore Rm = \frac{\sqrt{\frac{\pi f}{\alpha_1}}}{\sqrt{\frac{\pi f}{\alpha_2}}} = \sqrt{\frac{\alpha_2}{\alpha_1}}$$

Se tiene que $(Rm)^2 = \alpha_{medio2} / \alpha_{medio1}$, Despejando la difusividad del medio2

$$\alpha_{medio2} = (Rm)^2 * (\alpha_{medio1})$$

$$\alpha_{medio2} = 4.66 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Entonces se puede obtener la difusividad térmica del medio2 mediante Rm , que se obtiene directamente de las pendientes experimentales del gráfico 4 y teniendo como referencia la difusividad térmica del aire, que es el medio1 ($\alpha_s = 0.2 \text{ cm}^2/\text{s}$). De esta forma la difusividad térmica obtenida del medio2 es cercana a la difusividad térmica reportada para almidón ($\alpha_s = 4.44 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$) que es el componente mayoritario en la semilla estudiada.

Los datos obtenidos por MFPE se graficaron en 3D para poder observar las diferencias existentes en los componentes de la muestra en superficie, a partir de la señal FPE, que representa las diferencias en los parámetros térmicos de los materiales que componen la semilla de maíz infectada. En la Figura 5 se muestra la señal FPE que representa la imagen térmica de la semilla en donde es posible observar los defectos a profundidad causados por la plaga graficados en 3D. La profundidad a la cual se monitorea la muestra depende de la longitud de difusión térmica μ_s .

Esta investigación podría ser de utilidad para el sector agrícola, ya que es importante tener mejor calidad de semilla para garantizar su mejor establecimiento y en consecuencia mayor producción. Contar con nuevas técnicas para caracterizar las semillas permite seleccionar las que presenten menor deterioro. Pingali y Pandey (2001) [20] identificaron los diversos factores bióticos y abióticos,

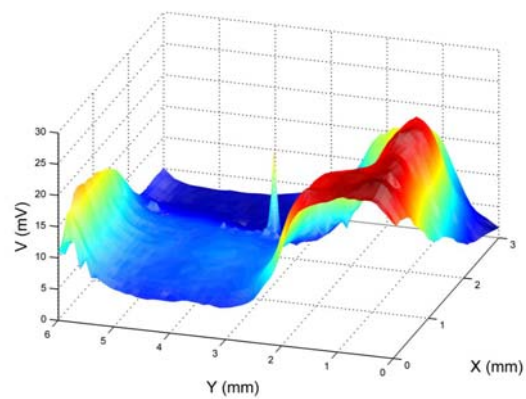


Figura 5. Imagen obtenida de la profundidad de penetración de la onda térmica en 3D en la semilla.

causantes de pérdidas en la producción y almacenamiento. Entre los factores abióticos están la infertilidad del suelo y como factor biótico están los insectos pos-cosecha; estos factores en conjunto son responsables del 70 al 95% de las pérdidas de la cosecha cuando las condiciones de cultivo y almacenamiento son deficientes [21]. La infestación y el daño por insectos pueden iniciar en el campo y se considera como las más importantes en pos-cosecha [22].

4. Conclusiones

El análisis de este tipo de materiales biológicos se puede realizar con la técnica de MFPE y no solo obtener una representación gráfica del muestreo de la señal FPE en la superficie, sino también la detección de diferentes defectos a profundidad teniendo como resultado información relevante del material y de las estructuras que lo constituyen. Esto podría ser útil en diversos estudios aplicados a la agricultura y al procesamiento de alimentos a través del análisis que se puede realizar de la diferencia de los parámetros térmicos de las estructuras que componen la semilla sin destruirlas en el proceso.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los organismos de México, CONACYT a través del proyecto No. 103632, al IPN a través de las becas COFAA, EDI y PIFI. También reconocemos a la Ing. Esther Ayala, del Departamento de Física del CINVESTAV-IPN por su apoyo técnico.

Referencias

- [1]. A. Rosencwaig and S. Gersho, J. Appl. Phys. **47**, 64 (1976).
- [2]. X. X. Minghua and L. V. Wang, Rev. Sci. Instrum., **77**, 041101 (2006).
- [3]. I.F. Faria, Jr., C.C. Ghizoni and L. C. M. Miranda, Appl. Phys. Lett. **47**, 1154, doi:10.1063/1.96359 (1985).
- [4]. Bicanic, D. (Ed.) Springer Series in Optical Science. In Photoacoustic and Photothermal Phenomena III; Springer: Berlin, **69**, 596 (1992).

- [5]. Mandelis, A.; Zver, M.M. *J. Appl. Phys.* **57**, 4421 (1985).
- [6]. Neamtu, C., Dadarlat, D. and Bicanic, D., *Instrumentation Science & Technology*, **34**, 183 (2006).
- [7]. Marinelli, M.; Zammit, U.; Mercuri, F.; Pizoferrato, R.; Scudieri, F.; Dadarlat, D. *Phys. Rev. B* **49**, 9523 (1994).
- [8]. J.L. Fernández Muñoz, O. Zelaya, A. Cruz-Orea, *Anal. Sci.* **17**, 338 (2001).
- [9]. Muñoz Hernández, R.A., Calderón, A., Cruz Orea, A., Tomás, S.A., Sánchez Sinencio, F. and Peña Rodríguez, G. *High Temperatures-High Pressures* **32**, 379 (2000).
- [10]. C. Hernández Aguilar, M. Mezzalama, N. Lozano, A. Cruz-Orea, E. Martínez, R. Ivanov and A. Domínguez-Pacheco. *Eur. Phys. J. Special Topics* **153**, 519 (2008)
- [11]. C. Aguilar, A. Cruz-Orea, C.A. Carballo, R. Ivanov, A. Michtchenko, E. San Martín, *J. Phys. IV (France)* **125**, 853 (2005)
- [12]. C. Hernández-Aguilar, A. Domínguez-Pacheco, A. Cruz-Orea, R. Ivanov, A. Carballo- Carballo, R. Zepeda-Bautista, and L. Galindo Soria, *Int. Agrophysics*, **23**, 327 (2009).
- [13]. Denise V. Rezende, O. A. C. Nunes and A. C. Oliveira, *Int. J Thermophys.* **30**:1616-1625 DOI 10.1007/s10765-009-0655-6 (2009).
- [14]. Suzuki, C. Kunito, T. Aono, T. Liu, C-T. Oyaizu, H., *J Appl. Microbiol.*, **98**, 1062 (2005).
- [15]. Arturo Domínguez Pacheco, Claudia Hernández Aguilar, Alfredo Cruz-Orea, Efraín Martínez Ortiz and Esther Ayala-Maycotte, *Journal of Physics: Conference Series* **214** 012060 (2010).
- [16]. B. R. Briseño-Tepepa, J. L. Jiménez-Peréz, R. Saavedra, R. González-Ballesteros, E. Suaste and A. Cruz-Orea, *Int. J. Thermophys.*, DOI 10.1007/s10765-007-0262-3 (2008).
- [17]. J. Caerels, C. Glorieux, and J. Thoen. *Rev. Sci. Instrum.* **69**, 2452 doi:10.1063/1.1148973 (1998).
- [18]. A. Rosencwaig, *Science*, **218**, 223 (1982).
- [19]. SIAP. <http://www.siap.gob.mx> (2009).
- [20]. M. Chirtoc and G. Mihailescu, *Phys. Rev. B* **40**, 9606 (1989).
- [21]. Pingali, P. L. and Pandey, S. 2001. World maize needs meeting: Technological opportunities and priorities for the public sector. In: Pingali, P. L. (ed.). CIMMYT (1999-2000).
- [22]. Silverio García Lara y David J. Bergvinson, *Agricultura Técnica en México*, **33**, 181 (2007).
- [23]. Savidan, A. and Bergvinson, D. J. 2000. Insects in stored maize. In: EMBRAPA (ed.) XXI International Congress of Entomology. Iguassu Falls, Brazil. p. 89.