

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional



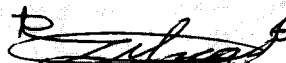
Escuela Superior de Física y Matemáticas



CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 14 del mes de Agosto del año 2017, el que suscribe Rojas Candela Liliana Edith alumno del Programa Académico de Ingeniería Matemática con número de boleta 2009516730 adscrito a la Escuela Superior de Física y Matemáticas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Héctor Alfredo Calderón Benavides y cede los derechos del trabajo titulado Estudio Microestructural y Fisicoquímico con Análisis de Imágenes y Multivariado en diferentes unidades de Monjas al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección titataesmmd@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Rojas Candela Liliana Edith
Nombre y firma del alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

**“Estudio Microestructural y Físicoquímico con
Análisis de Imágenes y Multivariado en Diferentes
Variedades de Manzana como Herramienta
Matemática de Control de Calidad”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO MATEMÁTICO

PRESENTA:

LILIANA EDITH ROJAS CANDELAS

ASESORES DE TESIS

DR. HECTOR ALFREDO CALDERÓN BENAVIDES

DRA. STEFANY CÁRDENAS PÉREZ



MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2017

Carteles en eventos científicos de la especialidad

1. Mención Honorífica. Rojas- Candelas, L. E.; Cárdenas- Pérez, S.; Chanona- Pérez, J. J.; Méndez-Méndez, J. V. Modelado matemático de curvas de fuerza para la obtención de propiedades micro-mecánicas de células de manzana. Escuela Nacional de Optimización y Análisis Numérico XXIV, Taller de Modelación. Ciencias de la Vida: Medicina, Biología y Ecología. CIMAT. (27 de Abril -2 de Mayo, Guanajuato, México, 2004)(Cartel)
2. Rojas- Candelas, L. E.; Cárdenas- Pérez, S.; Calderón- Benavides, H. A.; Chanona- Pérez, J. J.; Perea Flores, M.J. Técnicas de Microscopía y Análisis de Imagen para el Estudio de la Morfometría del Tejido de Manzanas de 4 Variedades. 3er Ciclo de Conferencias y 2do Seminario ALUMNI-DAAD en Nanociencia y Nanotecnología a la Física de Materiales, Medicina y Biología. (11-12 de Mayo, Ciudad de México, México, 2016)(Cartel)
3. Rojas- Candelas, L. E.; Cárdenas- Pérez, S.; Calderón- Benavides, H. A.; Chanona- Pérez, J. J.; Perea Flores, M.J. Microscopy and Image Analysis Techniques to study the Morphometry of Different varieties of Apple Tissue. 4th international conference on Agricultural and Biosystems Engineering with the subtitle: Automation, Environment and Food Safety (26-30 de June, Aarhus, Dinamarca, 2016) (Cartel)

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quisiera agradecer y dedicar este trabajo a Dios y María que me han dado muchos dones con los cuales puedo desarrollarme profesionalmente y ponerlos al servicio de los demás.

A mi mamá Edith Candelas Ramírez que ha sido un ejemplo de mujer trabajadora e inteligente, que persevera en cada cosa que se propone y que es una gran amiga para mí. A mi padre Norberto Rojas Domínguez por exigirme a hacer todas las cosas con calidad y dando lo mejor de mí, sin dejar de lado mis valores y mis creencias.

A mis queridas hermanas:

Arelí por enseñarme a luchar por lo que quiero y ser una gran compañera en cada paso que doy. Alejandra por cuidarme y enseñarme a trabajar duro por lo que uno quiere. Mariana por motivarme, escucharme, enseñarme a nunca darme por vencida a pesar de que se te cierran puertas y ser un gran ejemplo de profesionista. Adriana por ser la persona que me exige, que me ayudó en mis defectos para poder realizar esta tesis y ser paciente conmigo.

A mis Abuelos Concho y Lolita que siempre me enseñaron a ser yo misma, a ser feliz, hacer las cosas bien y con humildad.

A mis tías Bertha y Margarita que me enseñaron a buscar mis sueños, a no dejarme vencer por las adversidades y nunca alejarme de DIOS. A mi primo Eliseo por sus enseñanzas de vida.

A mis amigas (Brenda, Paloma, Jimena) que me apoyaron en mis decisiones, escucharme y ser amigas de toda la vida.

A mis amigos de ESFM (José, Pau, Azzem, Jorge) que recorrieron conmigo la licenciatura y que son personas entrañables que siguen conmigo apoyándome en cada paso que doy.

A mis amigos de laboratorio (Martha, Roxana, Jorge, Luz, Minerva, Paz) por sus pláticas y comidas, por motivarme a seguir y no dejar de intentarlo.

Al Dr. Chanona por abrirme las puertas a la investigación. Por su paciencia, disponibilidad y constancia para enseñarme.

A mis asesores de tesis Dr. Héctor Alfredo Calderón Benavides y Dra. Stefany Cárdenas Pérez por su importante aporte y participación en el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales por sus correcciones y aportes en la revisión de mi trabajo de tesis.

“Dios es la verdad, quien busca la verdad, busca Dios, sea o no consciente de ello”

Edith Stein

I. INDICE GENERAL

I. INDICE GENERAL	4
II. ÍNDICE DE FIGURAS	6
III. ÍNDICE DE CUADROS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Generalidades de la manzana	10
1.2. Atributos relacionados con la calidad de manzanas	12
1.2.1 Firmeza.....	13
1.2.2 Color de los frutos	14
1.3 Técnicas de microscopía para evaluar la estructura de materiales biológicos.....	16
1.3.1 Microscopio óptico (LM)	17
1.3.2 Microscopía de barrido de electrones en modo ambiental (ESEM).....	18
1.3.2.1 Porosidad	21
1.3.3 Microscopio Confocal de Barrido laser (CLSM)	23
1.4 Herramientas matemáticas para evaluar la variedad de los frutos	25
1.4.1 Análisis de Imágenes.....	26
1.4.1.1 Adquisición de imagen.....	27
1.4.1.2 Pre-procesamiento de la imagen.....	27
1.4.1.3 Segmentación de la imagen	28
1.4.1.4 Medición de las características del objeto	28
1.4.1.5 Clasificación	29
1.4.2 Análisis estadístico descriptivo y multivariado	29
1.4.2.1 Prueba de Tukey	31
1.4.2.2 El coeficiente de correlación de Pearson	32
1.4.2.3 PCA.....	33
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo General	37
4.2 Objetivos Específicos	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39

5.1 Materiales, Equipos y Software	39
5.2 Metodología.....	40
5.2.1 Obtención de las muestras	40
5.2.2 Análisis Físicoquímicos.....	40
5.2.2.1 Peso y Volumen	40
5.2.2.2 Estado de madurez de las manzanas por pruebas físicoquímicas.....	40
5.2.3 Color.....	42
5.2.4 Estudio de microscopía óptica y caracterización de células mediante análisis de imágenes.....	42
5.2.4.1 Algoritmo Mexican Hat	43
5.2.5 Microscopía de barrido de electrones en modo ambiental (ESEM).....	45
5.2.6 Microscopio Confocal de Barrido laser (CLSM)	46
5.2.7 Análisis estadístico descriptivo y multivariado	47
6. Resultados y discusión	49
6.1 Análisis Físicoquímicos	49
6.2 Color	52
6.3 Estudio morfométrico de las células del tejido por microscopía de luz (LM)	54
6.4 Microscopía de barrido de electrones en modo ambiental (ESEM)	58
6.5 Microscopio Confocal de Barrido laser (CLSM).....	62
6.6 Análisis de Componentes Principales (PCA)	65
7. Conclusiones.....	71
8. Referencias	72

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de manzanas	11
Figura 2. Principio del Microscopio de Luz.....	17
Figura 3. Principio del Microscopio electrónico de barrido ambiental	19
Figura 4. Principio del Microscopio Confocal de Barrido Laser.....	24
Figura 5. Imagen de la técnica de análisis de imagen.....	27
Figura 6. Diagrama de flujo del trabajo experimental.....	48
Figura 7. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Golden Delicious (Chihuahua)	54
Figura 8. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Granny Smith	55
Figura 9. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Gala Washington	55
Figura 10. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Red Delicious	56
Figura 11. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Red Delicious	58
Figura 12. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Gala Washington.....	59
Figura 13. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Granny Smith	59
Figura 14. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Golden Delicious (Chihuahua)	60
Figura 15. Imágenes de CLSM que muestran la autofluorescencia de la pared celular de cada variedad con escala 50 μm	63
Figura 16. Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variedades de manzanas estudiadas	68

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros físicoquímicos de las variedades de manzana estudiadas.....	49
Cuadro 2. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de color L^* , a^* y b^* de cada variedad de manzana.....	52
Cuadro 3. Parámetros de imagen de células de cada variedad de manzana.....	56
Cuadro 4. Valores promedio y desviación estándar de la Porosidad de cada variedad de manzana.....	60
Cuadro 5. Matriz de correlación de Pearson de todas las variables estudiadas.....	65
Cuadro 6. Datos relevantes del PCA.....	69
Cuadro 7. Cosenos cuadrados de las observaciones.....	70

RESUMEN

El tejido de manzana se caracteriza a través de un análisis morfométrico. Esto a su vez se realiza mediante análisis de imagen con el programa: ImageJ v1.49. Los parámetros morfométricos de las células obtenidos para la manzana Golden Delicious (Chihuahua) tienen un área promedio de $30400.20 \pm 12021.26 \mu m^2$ y un diámetro promedio de $193.67 \pm 43.24 \mu m$ con una redondez de 0.72 ± 0.12 . En lo que se refiere a Granny Smith se obtiene un área promedio de $43128.05 \pm 1783 \mu m^2$ y un diámetro mayor promedio de $232.99 \pm 53.46 \mu m$ y presentando una redondez de 0.70 ± 0.13 . En cambio para la manzana Red Delicious se obtiene un área promedio de $32151.42 \pm 12033.65 \mu m^2$ y un diámetro promedio de $194.76 \pm 39.77 \mu m$ con una redondez de 0.74 ± 0.12 . En lo que respecta a la manzana Gala Washington se obtiene un área promedio de $34430.37 \pm 13381.13 \mu m^2$ y un diámetro promedio de $204.57 \pm 44.80 \mu m$ con una redondez de 0.72 ± 0.12 . Se encuentra además que mediante un análisis de imagen en la técnica de microscopía como MCBL es posible confirmar los resultados de la forma y estructura microestructural de cada variedad.

Asimismo se realiza un análisis fisicoquímico donde la acidez y los sólidos solubles totales permiten determinar el estado de cada una de las variedades de manzana. La manzana Golden Delicious (Chihuahua) alcanza 3.29 ± 0.31 g de ácido málico/g muestra y de 12.08 ± 1.98 °Brix. En lo que se refiere a Granny Smith se obtienen 6.99 ± 0.957 g de ácido málico/g muestra y 11.7 ± 0.47 °Brix. En cambio para la manzana Red Delicious el resultado es 2.20 ± 0.050 g de ácido málico/g muestra y 11.1 ± 0.05 °Brix. En lo que respecta a la manzana Gala Washington tienen 2.60 ± 0.09 g de ácido málico/g muestra y 13.06 ± 0.057 °Brix. Estos análisis también permiten determinar la firmeza en cada variedad. En la manzana Golden Delicious Chihuahua, la firmeza es alrededor de 20.59 ± 1.85 N. En la variedad Granny Smith se tiene un valor de 24.54 ± 4.77 N, para la manzana Gala fue se determina ua firmeza de 22.92 ± 6.58 N y en la variedad de Red Delicious se obtiene una firmeza de 24.69 ± 4.56 N. Estos resultados pueden utilizarse para poder obtener el RPI que sirve para evaluar la madurez. Otros resultados obtenidos incluyen el volumen desplazado

y el peso de cada variedad, los cuales se resumen a continuación. Para la manzana Golden Delicious Chihuahua se tienen valores de $149.66 \pm 0.57 \text{ cm}^3$ y $137.76 \pm 11.07 \text{ g}$. En la variedad Granny Smith se determinan valores de $199.66 \pm 0.57 \text{ cm}^3$ y $181.47 \pm 10.39 \text{ g}$, para la manzana Gala Washington el resultado es alrededor de $168.33 \pm 16.07 \text{ cm}^3$ y $161.36 \pm 13.16 \text{ g}$ mientras que para la variedad Red Delicious se llega a $238.33 \pm 12.58 \text{ cm}^3$ y $216.14 \pm 15.96 \text{ g}$. Estos datos pueden correlacionarse con los parámetros morfométricos y la porosidad.

Adicionalmente se realizó la caracterización estructural del tejido de manzana mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental para evaluar y comparar el tamaño y densidad de los poros en cada una de las variedades de manzana. Resumiendo, los resultados para la manzana Golden Delicious Chihuahua el número de poros es alrededor de 51.44 ± 45.04 , con una densidad de Poro de $2.23 \pm 1.15 \text{ mm}^{-2}$ mientras que su fracción de área ocupada se encuentra alrededor de 0.04 ± 0.02 . Para la variedad Granny Smith se encuentra un número de poros aproximadamente 63.66 ± 45.47 , una densidad de poro de $3.34 \pm 1.67 \text{ mm}^{-2}$ y la fracción de área ocupada de 0.07 ± 0.04 . En cambio para la manzana Gala Washington el número de poros es de aproximadamente 68 ± 56.70 , su densidad de poro de $2.89 \pm 1.37 \text{ mm}^{-2}$ y la fracción de área ocupada es 0.05 ± 0.02 . Para la variedad de Red Delicious el número de poros es de 94.11 ± 65.30 , la densidad de poro es de $3.20 \pm 1.58 \text{ mm}^{-2}$ y su fracción de área ocupada llega a 0.06 ± 0.03 .

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la manzana

De las diferentes especies de fruta dulce, la manzana es la que ocupa el primer lugar en volumen respecto a las exportaciones e importaciones mundiales. Esto se debe en gran parte a su aptitud para el transporte de larga distancia, al régimen de conservación y, a su capacidad de ser manipulada para la carga y para la palatización.

La producción de manzana en México alcanza cerca de 3 mil mdp (millones de pesos) anuales y la superficie destinada a este cultivo es de 62 mil hectáreas, principalmente en el norte del país. La demanda de manzana en México es del 91.3 % como consumo en fresco, el 8.5% para productos industriales (jugos concentrados y sidras) y el 0.1 % para exportaciones (Financiera Nacional de Desarrollo, Abril 2014). Mientras que la FAO reportó que en el 2013 en México tuvo una producción de 858,608 toneladas con costo de 363.12 millones de dólares lo que representa el número 15° a escala mundial (FAOSTAT, 2013). Los principales estados productores son Chihuahua, Durango, Coahuila y Puebla.

La manzana Golden Delicious (Chihuahua) es un fruto nacional que en México se produce en los estados de Puebla, Chihuahua y Durango (Figura 1a). Proveniente principalmente de Chihuahua, es grande y de color amarillo dorado, es elipsoidal, con la carne blanca amarillenta, fija, jugosa, perfumada y muy sabrosa. El pedúnculo es muy largo y la piel delgada y resistente, cubierta con lenticelas grisáceas. Es un fruto con buena conservación natural y en frío que se recolecta en septiembre-octubre. Dentro de las manzanas Golden existen algunas variedades como por ejemplo:

Arlet (Golden Delicious Idared), Bohemia (Lord Lambourne Golden Delicious), Chantecler(Golden Delicious Reinette Clochard), Delbarestivale delcorf (Golden Delicious Stark Jonagrimes), Elstar (Ingrid Marie Golden Delicious), Jonagold (Golden Delicious Jonathan), Pinova (Clivia Golden Delicious), Tentation delblush, (Grifer (Blushing Golden Delicious), Cripps Pink (Lady Williams Golden Delicious), Mutsu (Indo apple Golden

Delicious) y Golden Chihuahua. Su precio en México se encuentra entre 21-35 pesos por kilo dependiendo del estado en que se compre (InfoAserca, 15 de enero de 2016).



Figura 1 Imágenes de manzanas: a) Golden Delicious (Chihuahua), b) Gala Washington c) Red Delicious y d) Granny Smith

La manzana Red Delicious es otro fruto nacional que se produce en los estados de Puebla, Chihuahua y Durango. Es una manzana de buen tamaño (Figura 1b), de color rojo más o menos intenso, con un punteado amarillo, carne azucarada, jugosa, ligeramente acidulada y muy aromática. Variedad de crecimiento vertical y con tendencia a dar ángulos agudos en la inserción de las ramas. Es autoestéril y de floración semi-tardía. Es un árbol muy exigente desde todos los puntos de vista, particularmente en terreno. Es sensible al moteado, araña roja y pulgón lanígero. Es un fruto de excelente conservación con recolección en septiembre-octubre. Existen dos variedades la manzana Red Delicious y la manzana Clones de Delicious. Su precio en México se encuentra entre 12.10-32.35 pesos por kilo dependiendo del estado en que se compre (InfoAserca, 15 de enero de 2016).

La manzana Granny Smith es una variedad de origen australiano introducida en España (Figura 1c). En Europa goza de un excelente mercado compitiendo con Golden Delicious. Los árboles son vigorosos, precoces en la fructificación y muy productivos; tienen tendencia a dar frutos en la extremidad de las ramas, por tanto es importante saber podarlas; prefiere la formación en palmeta; son algo sensibles al moteado. Se poliniza con Golden y suelen hacerse plantaciones con estas dos variedades exclusivamente. La manzana es de buen tamaño, esférica y simétrica. Tiene color verde intenso que se vuelve más claro en la madurez, con numerosas lenticelas de color blanquecino. Su precio en México se encuentra entre 1.96-2.70 pesos por pieza (InfoAserca, 15 de enero de 2016). La variedad Granny Smith es el resultado de la mezcla de las variedades *Malus sylvestris* y

de *M. domestica*. La manzana Granny Smith se produce en Europa, Nueva Zelanda, Sudamérica, Sudáfrica y Estados Unidos.

La manzana Gala Washington es una variedad de origen neozelandés resultante del cruce de Kidd's Orange con Golden Delicious (Figura 1d), siendo su cultivo recomendable en zonas de regadío españolas. Los árboles son de producción notable y regular, precisando aclareo químico. Los frutos tienen unos calibres medios de 60-80. La manzana es de coloración amarilla y conviene cosecharla a tiempo para evitar la aparición de grietas en la zona del pedúnculo. La manzana Gala es un cruce entre la Golden Delicious y la Kidd's Orange Red neozelandesa. Su precio en México se encuentra entre 2.70-3.80 pesos por pieza (InfoAserca, 15 de enero de 2016). La manzana Gala se produce en Bélgica, Francia, España y Estados Unidos.

1.2. Atributos relacionados con la calidad de manzanas

Las manzanas tienen diferentes atributos de calidad que son importantes para su consumo, almacenamiento y conservación. La firmeza, color y dulzura juegan un papel preponderante en su aceptación para los consumidores. Por ejemplo, la firmeza de una manzana es importante para evaluar su estado de madurez, mientras el color en algunas variedades de manzana cambia drásticamente con el tiempo de almacenamiento y/o maduración. Esto se confirma al probar los frutos y evaluar su dulzor, que está asociado a su contenido de azúcares y a acidez del fruto. Asimismo, el nivel de madurez está íntimamente relacionado con la firmeza, y esto influye en los procesos de degradación a nivel celular y la turgencia del tejido celular, por lo que la microestructura del tejido de manzana es un parámetro importante para evaluar el estado de madurez de las variedades de manzana. A continuación, se describen los parámetros más importantes para evaluar la calidad y la madurez de la manzana.

1.2.1 Firmeza

La firmeza de las frutas es un importante requerimiento de satisfacción del consumidor, el cual se controla por las propiedades mecánicas y estructurales de la fruta (Cen et al. 2013). Hoy en día se desarrollan tecnologías no destructivas para su medición, donde la industria selecciona las frutas de mejor calidad que reúne un mínimo de firmeza para poder venderla en precios altos (Mendoza et al. 2014).

La firmeza específica de la manzana está relacionada con otras características de calidad (rigidez, porcentaje de jugo, contenido de sólidos solubles, valorables acidez, parámetros de color rojo de fondo y lateral). Estas características al ser controladas dan como resultado una mayor crujencia, firmeza y aumento en el jugo de manzana (Rizzolo et al. 2010) (McAtee et al. 2009).

Además la firmeza disminuye durante la expansión o crecimiento de la fruta, la cual coincide con la reducción de la densidad de las células, el incremento del volumen celular y los espacios de aire. En consecuencia la pared celular no solo mantiene íntegra la estructura durante el crecimiento sino también permite la expansión del tamaño de célula y el espacio de aire extracelular. El rendimiento y la composición de la pared celular difieren más entre cultivares durante las primeras etapas de crecimiento de la fruta (Ng et al. 2013).

En 2013 se realizó un estudio comparando 2 variedades de manzana (Granny Smith y Golden Delicious) en un periodo de almacenamiento de 30 días. En este estudio se reportó que la variedad Granny Smith tiene una mayor firmeza durante el almacenamiento. Además de observar que la acústica y la firmeza son una relación directamente proporcional que disminuye conforme pasa el tiempo (Cen et al. 2013).

En otros estudios en las variedades de Golden Delicious y Delicious relacionaron la firmeza y los sólidos solubles totales de las mismas. Tomaron como herramienta la dimensión fractal, con lo que pudieron concluir que hay una buena relación de la firmeza y los sólidos solubles totales. Además observaron una ventana de oportunidad para poder realizar un modelo que represente el comportamiento y la relación de las mismas (Mendoza et al. 2011).

Y Bhosale et al.(2014) encontró una forma de predecir la firmeza de las manzanas usando la medición de capacitancia basada en la propiedad dieléctrica, donde encontró cambios en la firmeza de la manzana durante su periodo de vida útil y comprobó una correlación aceptable de la firmeza y la capacitancia.

1.2.2 Color de los frutos

El color es uno de los parámetros principales que los consumidores evalúan y utilizan para la aceptación o rechazo de alimentos. Por lo que se ha utilizado en la industria para evaluar la calidad, la detección de defectos, identificación y selección de frutas y verduras. También es ocupado el color, como un factor importante para la clasificación de la fruta para el embalaje y la exportación (Afshari-Jouybari et al. 2011, Garrido-Novell et al.2012, Garrido et al.2015).

Para medir el color de diferentes materiales, se han reportado espacios de color. Un espacio de color puede ser descrito como un método para expresar el color de un objeto. La Commission Internationale de l'Éclairage (CIE), ha definido espacios de color a través de coordenadas cromáticas las cuales son: L^* , a^* y b^* , para comunicar y expresar el color objetivamente en términos de matiz (color), luminosidad (brillo) y saturación (vividez); de la siguiente manera:

L^* =luminosidad

a^* = coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde)

b^* = coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul) .

(Hernández- Hernández et al. 2016) (KONIKA MINOLTA, 2016).

Los espacios de color pueden ser medidos, uno de los instrumentos de medición de color son los colorímetros, los cuales pueden cuantificar éstos atributos de color fácilmente. El colorímetro, determina el color de un objeto dentro del espacio de color y muestra los valores para cada coordenada L^* , a^* , y b^* (KONIKA MINOLTA, 2016).

De acuerdo a lo reportado en una investigación de lechugas se pudo contrastar que en particular, el espacio de color L^* , a^* y b^* proporciona los mejores resultados con un canal, produciendo un 99,2% de clasificación correcta. La clasificación se basó en un

enfoque probabilístico que consistió en estimar la probabilidad de que un color particular pertenece a una clase o la otra, es decir, la planta o el suelo. El trabajo concluyó que el análisis de color es una herramienta que puede servir para índices de exceso de algún color (en su caso verde) específico de la vegetación estudiada. Además de que la etapa de segmentación de color debe ser de seguimiento con técnicas como el análisis de forma y la textura, procesamiento de imágenes hiperespectrales o de reconocimiento de objetos (Hernández- Hernández et al. 2016).

En otro estudio se realizó un método que muestra como la imagen digital y un software de análisis se pueden combinar para la medición de color en alimentos. Lo realizaron a partir de correlacionar los valores de color con un colorímetro y una imagen digital, de forma que evaluaron la eficacia del método usando los parámetros de color L^* , a^* y b^* , posteriormente evaluaron la precisión y calibración a partir de las desviaciones estándar en conjunto con ecuaciones y modelos. Para luego realizar la conversión de valores de color RGB a L^* , a^* y b^* a partir de un modelo cuadrático y modelo de red neural. Con este método obtuvieron que hay una corrección grande entre el colorímetro y la imagen digital y a partir de la modificación de sus datos con las ecuaciones planteadas puede ser utilizado para la evaluación de L^* , a^* y b^* en colorimetría alimentos (Afshari-Jouybari et al. 2011). Fernández-Lara et al. (2015) realizó una investigación de fresas con el objetivo de comparar la composición fenólica de diversos cultivares y poder evaluar las relaciones entre la composición química y el color del fruto a partir de la aplicación de Tristimulus Colorimetría por análisis digital de imágenes. Esta técnica permitió realizar una evaluación de color detallada de la fresa y reveló la relación entre las características genotípicas que afectan a las propiedades de apariencia de la fruta.

Garrido-Novell en su análisis propiamente de manzanas evaluó el color y la evolución de modelado, simulando diferentes condiciones de almacenamiento con RGB y las imágenes hiperespectrales, comparando su capacidad de ordenar las manzanas de color según las condiciones de almacenamiento y utilizando el mismo conjunto de muestras. Con ello concluyeron que las imágenes hiperespectrales tienen el potencial de discriminar diferentes condiciones de almacenamiento en las manzanas. También propone el modelo

cinético de orden cero para poder explicar la evolución del color durante el almacenamiento y sugiere relacionar los parámetros cualitativos con los cuantitativos (Garrido-Novell et al.2012).

En otras investigaciones de manzana se ha estudiado la correlación de la temperatura con el desarrollo del color rojo del fruto que a su vez está relacionado con síntesis de antocianina. Donde realizaron la medición del color con un cromámetro tomando 2 lecturas de cada muestra. Este estudio concluyó que durante el desarrollo del fruto pueden cambiar las temperaturas óptimas para el desarrollo de color rojo, lo que puede afectar el potencial de la síntesis de antocianinas y pueden tener implicaciones para la selección de sitios adecuados para la siembra de cultivares (Garrido et al. 2015).

En estudios de manzana de variedad Granny Smith investigaron el efecto de la temperatura, la velocidad del aire en la cinética de secado y atributos de calidad, en el color de la manzana. El estudio del color de la manzana lo realizaron mediante colorímetro por triplicado. Los resultados experimentales de este estudio mostraron que el color disminuye a mayor temperatura (Vega-Gálvez et al.2012).

El color para los consumidores es prueba de calidad, por lo que se investiga tratamientos para manzanas con el fin de mejorar el color. Uno de los tratamientos es a partir de aminoácidos como Aminoetoxivinilglicina donde concluyeron que este tipo de tratamientos son una herramienta que permite mejorar el color de la manzana en específico de la variedad Crip's Pink (Whale et al. 2008).

1.3 Técnicas de microscopía para evaluar la estructura de materiales biológicos

Los sistemas biológicos presentan desafíos particulares para modelar y más aún en subsistemas micro como tejidos y células. Estos sistemas son típicamente de escala múltiple, compleja y observaciones empíricas, que son a menudo escasas y sujetas a la variabilidad e incertidumbre. Sobre todo cuando se tiene la intención de parametrizar estos modelos para generar predicciones reales, o para proporcionar un comparativo de especies (Clermont et al. 2014). Para ello hoy en día existen diversas técnicas de

microscopía que nos permiten observar, cuantificar y modelar características de las células y el tejido. En la actualidad, se realizan varios estudios de frutas a nivel celular debido a que están íntimamente relacionados con los cambios a nivel macro-estructural.

1.3.1 Microscopio óptico (LM)

El microscopio óptico (LM, light microscope) es una herramienta no invasiva potente para el estudio de las microestructuras de alimentos debido a que su técnica de preparación de muestra es rápida y no origina muchas alteraciones a la muestra (Ramos et al. 2004). Pero tiene una limitada magnificación que a su vez permite la observación de piezas de gran tamaño donde se puede aprovechar complementándolo con técnicas de análisis de imagen (Perea-Flores, 2011).

EL principio del LM se basa en una producción de luz visible que viaja a través de un diafragma y un condensador para enfocar y controlar la intensidad del haz de luz antes de que se transmita a través de la muestra. La luz entra en la lente del objetivo fijado en un revólver y se desplaza hacia arriba del tubo a través de un ocular para formar una imagen invertida virtual ampliada, que se visualiza por el ojo del operador (Fig. 2).

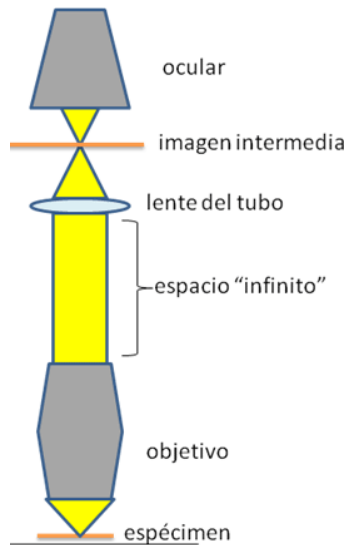


Figura 2. Principio del Microscopio de Luz

Este tipo de microscopía es utilizada para observar las estructuras de la superficie y de secciones (Aguilera et al. 1998). El LM se utiliza para observar la forma de distribución de las células de diversos sistemas. Esta herramienta fue utilizada por diversos autores como Perea-Flores (2011) que propone el estudio de las propiedades de semillas de *Ricinus communis* a nivel celular mediante el LM para observar la forma, distribución y tamaño de las células. Con ello logró definir la morfometría de las células de la semilla estudiada. A su vez otro investigador Lewicki et al. (2005) realizó un estudio de microscopía en tejido de papa en diferentes estados de maduración, donde resaltaron los diferentes cambios que tiene el tejido en procesos como el escaldado, convección seca, secado por vapor y secado por congelación. Estos cambios los observaron a través del LM.

En el trabajo de Oey et al. (2007) se enfocaron en la relación del efecto de la turgencia con los parámetros morfométricos de las células de las var. Borkh y Jonagored que se obtuvieron a través del LM y el análisis de imagen. Concluyeron que durante el proceso osmótico las células se pliegan y se deforman pero después del proceso las células recuperan su forma redondeada original. Esto lo atribuyen a un proceso de difusión que ocurre en la ósmosis o la relajación de tensiones estructurales. Además encontraron que las deformaciones celulares en longitud y anchura están estrechamente relacionadas con las medidas mecánicas.

1.3.2 Microscopía de barrido de electrones en modo ambiental (ESEM)

El microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM, environmental scanning electron microscope) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones escaneada y lentes electromagnéticas que se enfocan y dirigen el haz sobre la superficie de la muestra. Un punto de electrones enfocado (sonda) es escaneado sobre una pequeña superficie de la muestra. Los electrones del haz interactúan con la capa de superficie de la muestra y producen varias señales (información) que se recogen con detectores apropiados (Fig. 3).

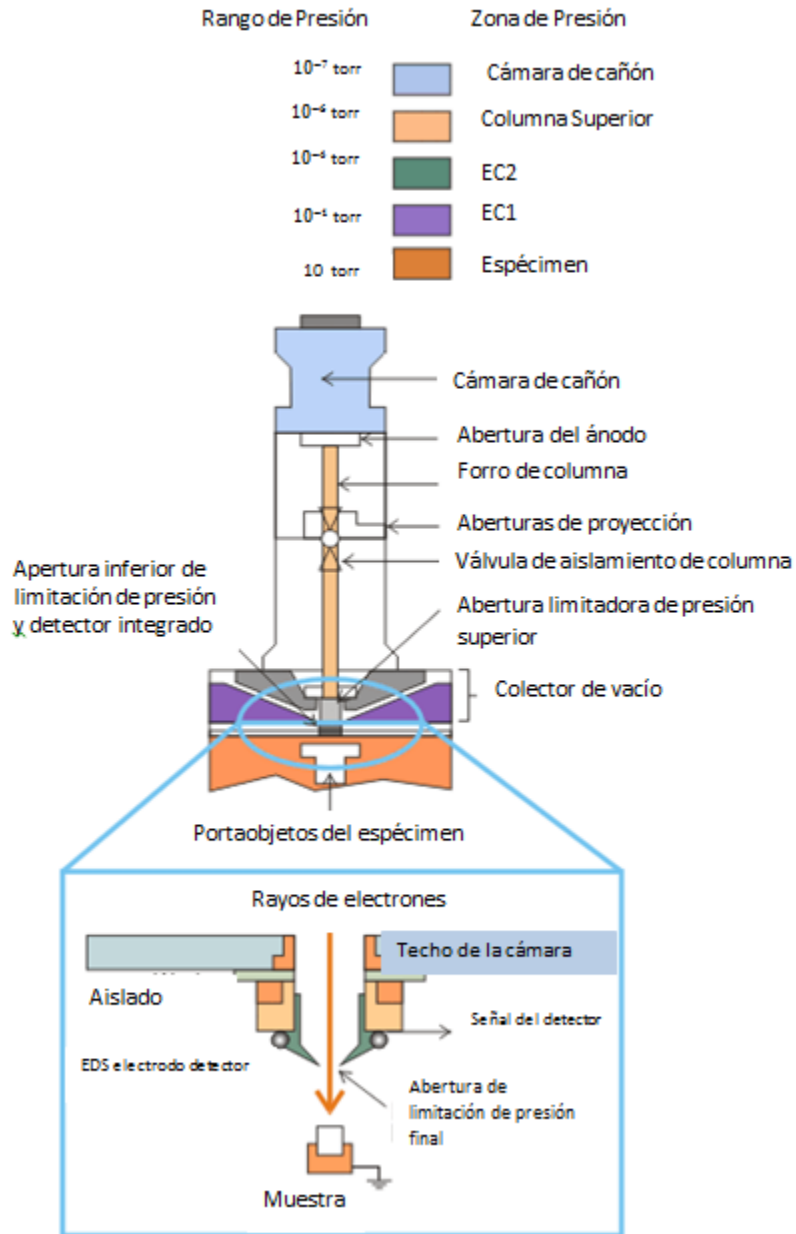


Figura 3 Principio del Microscopio electrónico de barrido ambiental (Tomado de AZO, 2017 y modificado)

ESEM puede ser operado a una presión más alta de modo que los especímenes se pueden caracterizar bajo condiciones ambientales. Sin embargo, una mayor presión operativa provoca una disminución de la resolución de la imagen (Zhou y Wang, 2006). La característica principal del ESEM es que trabaja en condiciones de presión atmosférica y en lugar de operar con vacío puede utilizar vapor de agua, aire, oxígeno, helio o nitrógeno

(Stokes, 2003). El ESEM ha sido ocupado para obtener imágenes de tejido y poder cuantificar los espacios intercelulares (Cen et al.2013). Además ha sido una herramienta útil para el estudio de la porosidad y la distribución del tamaño de poro (Santacruz-Vázquez et al.2008).

Ma et al. (2006) a través del estudio del cambio de dimensión en los pinos usando ESEM, concluyeron que el análisis de imagen que realizaron proporciona una valiosa información cuantitativa y cualitativa sobre el comportamiento microestructural debido a la humedad contenida.

Chen et al. (2006) estudió la microestructura de manzanas mediante ESEM, realizaron experimentos para evaluar los cambios microestructurales en las manzanas durante su almacenamiento.

Otros investigadores han utilizado el Microscopio Electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés). Este microscopio tiene una funcionalidad similar al ESEM, con la diferencia que el ESEM es más apropiado para muestras biológicas ya que no utiliza alto vacío, por lo tanto no requiere preparación de muestra y no hay daño significativo de la misma. Allan-Wojtas et al. (2003) ocupó el SEM para poder evaluar y relacionar atributos de la manzana como la crujencia, esponjosidad, dureza y jugosidad. Todos estos atributos se relacionaron con las características de microestructura de la manzana. Con estas correlaciones pudieron cuantificar y entender las diferencias en la textura de la manzana. Así mismo se pueden identificar los cambios de microestructura.

1.3.2.1 Porosidad

La porosidad es un término relativo usado para expresar la relación de proporción de vacío o hueco dentro de una muestra (Aprajeeta et al. 2015). Esta propiedad nos permite entender con mayor detalle las propiedades de una membrana (Ziel et al. 2008), la determinación de calidad de textura y firmeza (Aprajeeta et al. 2015).

En un estudio de frutas y vegetales se encontró una variable que se modifica ante el proceso de secado que es la porosidad y la definió como la relación entre el volumen de poros y el volumen total de producto (Ramos et al. 2003). Otros autores encontraron que el volumen de poros se puede determinar por medición apropiada de dispositivos (porosimetría), que supongan la intrusión de un no humectante líquido (mercurio, nitrógeno) en la red de poros. También se puede determinar indirectamente midiendo el grueso y la densidad sólida. La medición de volumen aparente se puede lograr sin contacto (cromatografía, láser y visión estéreo) o con el contacto de la dimensión geométrica (Madiouli et al.2012).

En otra investigación de contracción y porosidad en bananas, piñas y mangos definió la porosidad como la fracción de volumen de aire en la muestra (Yan et al. 2008).

En el trabajo de Wang et al. (1996) realizaron un estudio de los cambios estructurales de la papa durante el secado. Donde concluyeron que la contracción durante el secado afectaba a la densidad y a la porosidad. Además que la porosidad se incrementa de manera constante debido a la disminución de humedad durante las primeras etapas de secado.

Mayor et al. (2005) ha observado que se incrementa la contracción y la porosidad de materiales de comida durante el proceso de secado. Además de que la contracción afecta a las propiedades físicas de los materiales, tales como densidad y la porosidad. La porosidad esta también relacionada con la estabilidad química de productos secos; la degradación del azúcar y oxidación de lípidos (Mayor et al. 2005).

En un estudio propiamente de manzana observaron los cambios estructurales en el tejido y la porosidad en la var. Granny Smith durante una deshidratación osmótica. Estos cambios los observaron mediante el LM y el ESEM. Cuantificaron la porosidad de la fruta

(ε) a través de los valores de la densidad aparente (ρ_b) que se determina midiendo el volumen de la muestra por el desplazamiento, usando un picnómetro con agua como líquido de referencia y densidad de sólido-líquido (ρ_s) que se mide en la pulpa de la muestra, ésta se homogeneiza a fin de eliminar los poros y el aire. Y a partir de estos valores se calcula la porosidad de la fruta (ε) de acuerdo a Nieto et al. (2004) y Yan et al. (2008)

$$\varepsilon = \frac{\rho_s - \rho_b}{\rho_s} \quad (1)$$

En el proceso de deshidratación osmótica observaron que el contacto de célula con célula aumento por lo que el espacio intercelular disminuyo y con ello la porosidad también disminuyo, pero al final del tratamiento hubo una recuperación de la porosidad aunque los valores fueron menores para la fruta fresca (Nieto et al. 2004).

En el caso de Schulze et al. (2012) investigaron las condiciones y el enriquecimiento de glicósidos de quercetina de algunas variedades de manzana, la cual se evaluó mediante la información proporcionada por la distribución de poros y el comportamiento de sólidos solubles con una técnica de impregnación al vacío. Unas de las variedades que ocuparon fueron Granny Smith y Golden Delicious. En este estudio pudieron observar de manera general que el volumen de poros aumenta de la parte interior a la exterior. A pesar de que la mayor porosidad es la región cerca de la cáscara de la manzana, la afluencia de líquido fue menor que en la base de la manzana. Atribuyeron este fenómeno debido a la penetración capilar, que es una función de la tensión interfacial del líquido y el diámetro de los poros.

En otra investigación determinaron el efecto de tratamiento de impregnación de vacío en la respiración de manzana, fresa, melocotón y sandía en temperaturas 5 y 10°C. Sus resultados arrojaron que en el análisis de porosidad de la manzana presentó el mayor valor de porosidad, seguido de la fresa (Giraldo, 2006).

1.3.3 Microscopio Confocal de Barrido laser (CLSM)

El Microscopio confocal de barrido laser (CLSM, confocal laser scanning microscopy) permite observar características morfológicas tales como disposición espacial y la forma de las células, el número de espacios intercelulares, turgencia y la nano composición de las paredes celulares. Estas características están relacionadas con la calidad de la fruta. Esto debido a que el CLSM tiene la habilidad de obtener secciones ópticas de diferentes planos focales del tejido o muestra, generando imágenes en 3 dimensiones (Dürrenberger et al. 2000). La característica principal de la microscopía confocal es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. El microscopio confocal añade el principio de iluminar el espécimen punto por punto y elimina la luz proveniente de los planos no enfocados. El trayecto de la luz comienza con el rayo láser (luz azul) que es filtrado por un agujero y un espejo dicroico; luego es enfocado mediante un lente objetivo sobre el espécimen y estimula la fluorescencia presente en el mismo (luz verde). La fluorescencia es recolectada por el objetivo y dirigida al espejo dicroico que la refleja y dirige hacia un detector. Un segundo filtro con agujero se coloca frente al detector y sólo deja pasar la luz proveniente del plano de enfoque (línea continua, Fig. 4). La fluorescencia fuera de foco de las zonas que están por encima y por debajo del plano de enfoque (en líneas discontinuas) no pasa por el agujero y por lo tanto no formará parte de la imagen (Dürrenberger et al. 2001). Este microscopio permite obtener imágenes de alta resolución volumétrica, y el estudio de estructuras frágiles, además de realizar un seccionamiento óptico y observar la distribución en el tejido de ciertas sustancias como la celulosa (Aguilera et al. 2000).

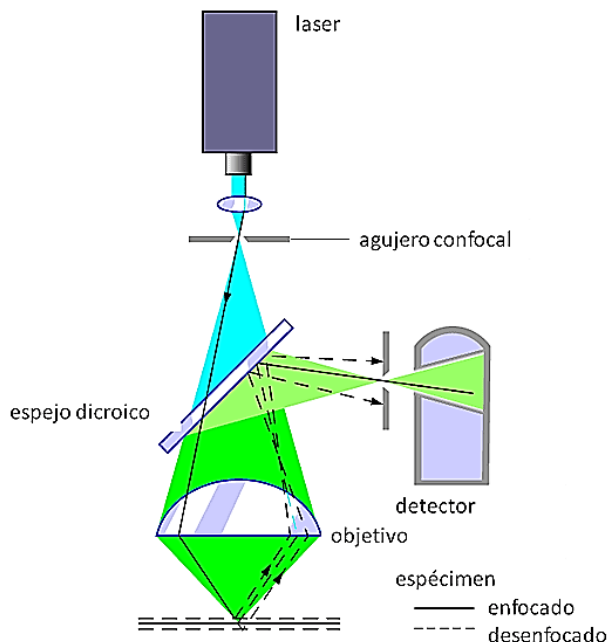


Figura 4 Principio del Microscopio Confocal de Barrido Laser

El CLSM es ocupado en diversas frutas como el membrillo japonés donde observaron la forma geométrica de las células y los espacios intercelulares, así como, sus cambios durante la madurez de la fruta (Thomas et al. 2003).

Algunos autores como Fernández (1999) ocuparon el CLSM para diversas frutas como manzana, naranja donde tomó imágenes tridimensionales de las membranas cuticulares de cada uno de los frutos para visualizar compuestos fenólicos, flavonoides de cutícula y la distribución espacial de la autofluorescencia de sus cutículas. Este tipo de estudios permiten observar cómo se va dando la madurez de los tejidos en un tiempo determinado.

En otros estudios propiamente de manzana se ha estudiado la variación en la proporción de formación de grietas bajo la cutícula de las manzanas con el CLSM, que está relacionado con la permeabilidad de la membrana, que es un factor determinante de la tasa de pérdida de agua de las frutas (Maguire et al. 2012).

Actualmente existen diversas investigaciones de microscopía confocal que estudian a las manzanas como es el caso de Pieczywek et al. (2012), que desarrollaron un método para clasificar las células y los espacios intercelulares en el tejido de parénquima de manzana

de dos variedades de manzana (Golden delicious y Champion). Tomaron ciertos parámetros geométricos como son área, perímetro, ortogonalidad, la rugosidad de la forma y la angulosidad. Realizaron un análisis estadístico a partir del análisis discriminante y obtuvieron una satisfactoria clasificación con las 4 variables (área, perímetro, rugosidad y circularidad). A partir de esta clasificación encontraron que las 2 variedades pueden ser similares cuando se analiza el tamaño de células y espacios intercelulares.

La microscopía confocal también ha servido en algunos estudios de manzana para comparar con otros tipos de técnicas no destructivas como la tomografía de coherencia óptica para la visualización de la estructura de la cáscara de manzana. Este estudio concluyó que el tiempo de almacenamiento es indirectamente proporcional a el espesor de la epidermis y el tamaño de las grietas en la cera (Verboven et al. 2013).

1.4 Herramientas matemáticas para evaluar la variedad de los frutos

Actualmente en diversas áreas biológicas ocupan herramientas matemáticas para describir los sistemas en cuestión. Al describir el comportamiento real del sistema nos permite encontrar las características principales y la predicción de una respuesta bajo diferentes condiciones.

El lenguaje matemático tiene algunas ventajas para poder describir estos sistemas por ejemplo:

- El lenguaje es preciso y conciso
- Tiene reglas bien definidas
- La computadora puede utilizarse para cálculos numéricos

Uno de las herramientas que se ocupan para describir sistemas biológicos a partir de la experimentación es el método estadístico. El cual permite aproximar modelos del sistema y sus procesos. Para poder revalidar estos resultados la estadística se apoya del análisis de gráficas, correlación de resultados y mediciones propias del sistema (Vázquez- Cruz et al.

2014). Dentro de los sistemas biológicos están las frutas y una de sus variables que se investiga es la calidad. La calidad puede ser descrita por diversas características que tiene el fruto por ejemplo: color, azúcares totales, porosidad, etcétera. En los últimos años, la calidad se ha convertido en un aspecto cada vez más importante en la producción de fruta. Por lo cual se necesitan técnicas de gestión de calidad de la fruta, así como modelos matemáticos que permiten sintetizar e incrementar el conocimiento sobre el sistema (López-Cruz et al. 2005).

1.4.1 Análisis de Imágenes

A lo largo de los años la industria agropecuaria ha intentado automatizar la selección de fruta con el fin de disminuir los costos de producción y aumentar la calidad (Blasco et al. 2007). Actualmente técnicas de análisis de imagen se usan como métodos no invasivos para evaluar la inocuidad de alimentos como frutas y productos procesados (Chanona, 2014). Recientemente las técnicas de análisis de imagen han permitido caracterizar cuantitativamente el tamaño, la forma, el color y las propiedades de textura. Debido al desarrollo en técnicas de análisis de imagen nos permite evaluar la calidad de los alimentos con sistemas más eficientes (Arzate-Vázquez, 2005).

En un estudio de clasificación de la papa mediante el reconocimiento de patrones, describe cada uno de los pasos que se deben realizar en un análisis de imagen (Pedreschi et al. 2004). Estos pasos se muestran la figura 5.

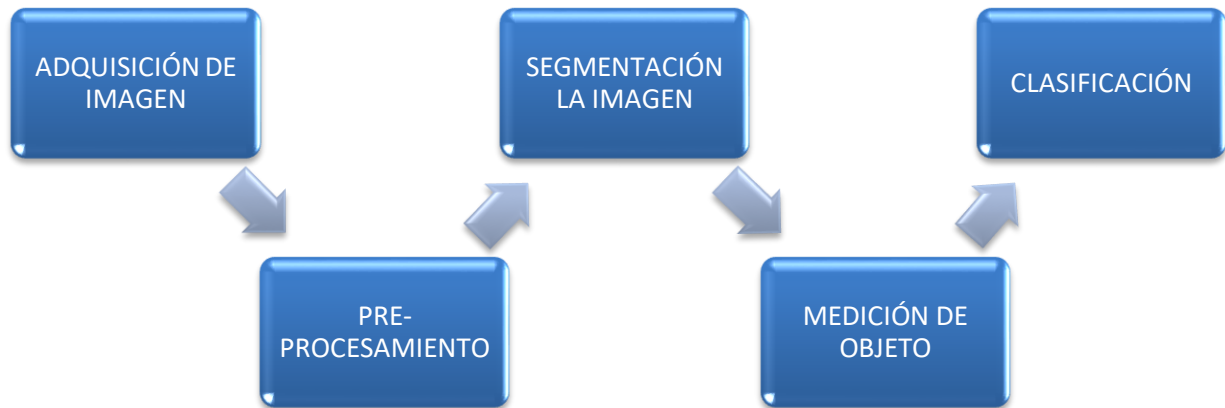


Figura 5. Imagen de la técnica de análisis de imagen

1.4.1.1 Adquisición de imagen

La adquisición de imágenes es el primer paso importante en el análisis. Nos permite evaluar la calidad de un fruto. La calidad de la imagen depende de los siguientes factores esenciales la intensidad y la orientación relativa de la fuente de iluminación. Estos factores determinan la escala de grises de los píxeles de la imagen. Es importante recalcar que si se adquiere una imagen de alta calidad ayuda a reducir tiempo en las siguientes etapas del análisis, lo que conlleva a que se reduzca los costos. Una imagen digital de un objeto es capturada y almacena en computadora, este procedimiento puede realizarse a través de una cámara digital, escáner o a través de un sistema de captura acoplado a un microscopio (Ramírez-Hernández, 2012).

1.4.1.2 Pre-procesamiento de la imagen

El objetivo de esta etapa es mediante un filtro digital donde se puede remover el ruido y disminuir distorsiones, además de realzar las características más importantes de la imagen. Aparte en este paso la imagen de color es convertida en una imagen en escala de grises, llamada la imagen de intensidad. Existen dos tipos de pre-procesamiento:

- Pre-procesamiento por pixel

- Pre-procesamiento local

Esta etapa es importante para el futuro procesamiento y con esto crear una imagen mejor a la original (Alonso-Hernández, 2016).

1.4.1.3 Segmentación de la imagen

La imagen de intensidad obtenida en el paso anterior es usada para identificar regiones perfectamente delimitadas para separarlas del fondo y extraer la parte de la imagen que contiene la información de interés. La imagen segmentada se encuentra en su forma binaria, que contiene píxeles solo en blanco y negro.

Las 2 propuestas que son más utilizadas para esta etapa son:

- Segmentación basada en umbrales o "thresholding"
Segmenta objetos sólidos que posee un contraste diferente del fondo. Separa objetos de un mismo tono de gris del fondo (Ramírez-Hernández, 2012).
- Segmentación basada en regiones
Separa regiones o grupos de píxeles que tengan tonos similares en escala de grises de una sección de la imagen (Arzate-Vázquez, 2006).

1.4.1.4 Medición de las características del objeto

En esta etapa se realiza la extracción de las características del objeto estudiado, se concentra en la medición de propiedades de tipo geométrico, que puede clasificarse en 4 clases:

- Tamaño
Son los parámetros para medir el tamaño de un objeto, los cuales son: área, perímetro, longitud y diámetro
- Forma

La medición de esta clase es fácil utilizando el análisis de imagen debido a que son mediciones físicas (Du et al. 2006).

- Color

El color es un atributo evaluado para calidad del alimento en cuestión. Este tributo es importante como para el productor como el consumidor. Este análisis se describió en el apartado 1.2.2

- Textura

La textura representa la disposición espacial de los niveles de gris de los pixeles en una región. La textura cuantifica alguna característica de la variación del nivel de gris dentro del objeto (Du et al. 2004).

1.4.1.5 Clasificación

En esta última etapa del análisis de imagen consiste en separar los objetos identificados de las imágenes dentro de un número de clases determinado en base a las características que se midieron. Las clasificaciones se puede realizar mediante el análisis estadístico y geométrico del espacio vectorial de las características (como por ejemplo el PCA) o el uso de redes neurales (Predeshi et al. 2004).

1.4.2 Análisis estadístico descriptivo y multivariado

Actualmente en la industria existen diversos adelantos tecnológicos y científicos que conllevan a aumentar la calidad de su producto. La experimentación en las industrias junto con el análisis computacional y matemático contribuye al aprendizaje y a la mejora de los productos y procesos.

La aplicación de modelos estadísticos se presenta como una herramienta para entender y optimizar los procesos y productos en la industrial. El modelo que permite el análisis de los datos experimentales con dos o más poblaciones y con dos o más tratamientos se conoce como análisis de la varianza (ANOVA, Analysis of variance) (Wackerly et al. 2010).

El objetivo de este modelo matemático-estadístico es comparar si los valores de un conjunto de datos son significativamente diferentes a los valores de otros conjuntos de datos. A menudo es de interés efectuar varias comparaciones por pares (todas las posibles) entre los tratamientos. Esta prueba de hipótesis se puede mostrar de la siguiente manera:

$$H_0: \mu_i - \mu_j = 0, \quad (2)$$

$$H_1: \mu_i - \mu_j \neq 0, \text{ para toda } i \neq j. \quad (3)$$

Dentro del ANOVA existen diferentes métodos para comparaciones por pares que den credibilidad a la tasa de error tipo I es decir, concluir que dos medias difieren cuando en realidad son iguales. Por ejemplo:

- Procedimiento de Tukey: permite la formación de intervalos de confianza del $100(1 - \alpha)\%$ para todas las comparaciones por pares.
- Procedimiento de Duncan: Su aplicación es secuencial, en el sentido de no utilizar un único valor crítico para todas las diferencias de medias.
- Prueba de Dunnett: comparación de tratamientos con un control.

Este tipo de análisis ha sido incorporado en diversos estudios para realizar tratamientos de datos y análisis estadísticos.

En particular en el estudio de Hou et al. (2016) incorporo el ANOVA para investigar los efectos de diferentes tipos de cultivares de manzana en el parénquima mediante los parámetros de morfología y atributos de textura. Con esta herramienta concluyeron que en cultivares de manzana aparecieron diferentes propiedades de textura debido a diferentes propiedades de morfología celular o de porosidad y que influyó en la microestructura del tejido de cada cultivar.

En otro estudio igual de manzanas ocuparon ANOVA para comparar los cambios morfológicos de las células entre los días de almacenamiento a partir de un análisis de imágenes del CLSM. Donde concluyeron a partir del ANOVA que existe un

comportamiento de disminución de tamaño en las células mientras pasa los días de almacenamiento (Cen et al. 2013). También Kubik (2013) en su investigación de la evaluación de la microestructura de las manzanas (Golden Delicious, Jonathan, Jonagored, Ontário, Spartan por mencionar algunas) realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas de los parámetros de perímetro, área y circularidad de las células de cada cultivar. Con este análisis concluyó que son diferentes los cultivares Golden Delicious y Jonared, Golden Delicious y Ontario.

1.4.2.1 Prueba de Tukey

El método de Tukey es una prueba de comparaciones múltiples. Sirve para probar las diferencias entre las medias de tratamientos. Creando intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores, mientras controla la tasa de error por familia (Montgomery, 2003).

Realiza una prueba de hipótesis donde supone lo siguiente:

$$H_0: \mu_i = \mu_j, \quad (4)$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j, \text{ para toda } i \neq j \quad (5)$$

El estadístico de prueba que se ocupa en el método de tukey es:

$$Q_{\alpha, m, v} = \frac{\bar{X}_i - \bar{X}_j}{\sqrt{CME/J}} \quad (6)$$

Donde la distribución depende de 2 grados de libertad que uno está asociado al numerador (m) y el otro está asociado al denominador v . Mientras que α es el valor crítico de cola superior de la distribución de rango estudentizado (Devore, 2008).

Este método fue ocupado en el estudio de Cárdenas et al. (2017) donde evaluaron las propiedades mecánicas de las células y del tejido de manzana (Golden Delicious) relacionados con el color de la cáscara y parámetros microestructurales. La prueba de

Tukey fue utilizado para encontrar las diferencias significativas de ciertos parámetros, con lo cual les permitió correlacionar posteriormente unas variables con otras. Además de poder ampliar el conocimiento de la estructura y funcionalidad de las células de manzana.

En otro estudio se utilizó esta prueba para investigar los efectos del tipo de manzana sobre la estructura y la morfometría. Encontrando diferencias significativas en ciertos parámetros con un cultivar y otro (Ting et al. 2016).

1.4.2.2 El coeficiente de correlación de Pearson

El coeficiente de correlación tiene como finalidad medir la fuerza de relación de las variables estudiadas mediante un número llamado coeficiente de correlación (Medenhall et al. 2010)

El coeficiente se define de la siguiente manera:

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y} = \frac{S_{xy}}{S_{xx} S_{yy}} \quad \text{el cual toma valores en el intervalo} \quad -1 \leq r \leq 1 \quad (7)$$

$$\text{Donde } S_{xy} = \frac{S_{xy}}{n-1}, \quad S_x^2 = \frac{S_{xx}}{n-1} \quad \text{y} \quad S_y^2 = \frac{S_{yy}}{n-1}, \quad (8)$$

Estas expresiones S_x y S_y son las desviaciones estándar para las parejas de variables que se están comparando, mientras que S_{xy} se define como la covarianza entre las parejas de variables que se están comparando.

- Cuando el valor del coeficiente de correlación tiene un valor positivo y cercano a 1 (0.88 ó 0.99), se afirma que existe una relación directa entre las variables analizadas.
- Cuando el valor del coeficiente de correlación tiene un valor negativo y cercano a -1 (-0.5 a -0.99), se afirma que existe una relación indirecta entre las variables analizadas.

- Cuando el valor del coeficiente de correlación tiene un valor positivo y cercano a 0 (0.1 ó -0.1), se afirma que no existe una relación directa entre las variables analizadas. (Medenhall et al. 2010)

Este coeficiente ha sido ocupado por Vélez-Rivera et al. (2013) en donde realizaron un análisis multivariado en las etapas del mango con un sistema de visión por computadora, además de mediciones ópticas y propiedades fisicoquímicas. Calcularon una matriz de correlación de Pearson con las siguientes variables de los mangos: acidez titulable, sólidos solubles totales, RPI, firmeza, CIELAB y parámetros de color HSB. Obtuvieron la correlación existente entre el análisis de imagen con los cambios fisicoquímicos que ocurren en la pulpa y en la piel de los mangos específicamente en el color de la cáscara. Esto permitió clasificar el mango en los diferentes niveles de madurez.

Cárdenas-Pérez et al. (2017) también realizó una matriz de correlación en su estudio propiamente de manzana Golden Delicious donde sus variables fueron: módulo de Young, firmeza, diferencia de color en la cáscara, entropía y dimensión fractal. Donde observó que existe una fuerte relación entre la cinética de firmeza con la microestructura del tejido y con los cambios en el módulo de Young, mientras que el color tiene una relación débil con estos factores. Con ello pudieron obtener un modelo que predice los valores del Módulo de Young a partir de los parámetros firmeza y entropía.

1.4.2.3 PCA

El Análisis de Componentes Principales (PCA, Principal Component Analysis) es un método algebraico y/o estadístico que sintetiza y da una estructura a la información contenida en una matriz de datos. Además identificar patrones en los datos, y expresar éstos resaltando sus similitudes y diferencias. (Jolliffe, 2002)

El método consiste en buscar combinaciones lineales de las variables originales que representen lo mejor posible a la variabilidad presente en los datos. La forma en que se

construyen los componentes y su relación con unas u otras variables originales, sirven para entender la estructura de correlación inherente de los datos. (Jolliffe, 2002)

Sea $X = (X_1, \dots, X_p)'$ un vector aleatorio p- dimensional con vector de medias $\mu = E(X)$ y matriz de covarianzas $\Sigma = D(X) = Cov(X, X)$. Se define la primera componente principal de X como una variable Z_1 tal que (Jolliffe, 2002)

$$Z_1 = v_1'X = v_{11}X_1 + \dots + v_{p1}X_p \text{ con } v_1 = (v_{11}, \dots, v_{p1})' \in \mathbb{R}^p \quad (9)$$

$$Var(Z_1) = \max\{Var(v'X): v \in \mathbb{R}^p, v'v = 1\} \quad (10)$$

La primera componente principal es una combinación lineal normalizada de las variables de X y, de entre todas las combinaciones lineales normalizadas, es la que tiene mayor varianza. Además la primera componente principal X adopta la forma: (Jolliffe, 2002)

$$Z_1 = v_1'X \quad (11)$$

Siendo λ_1 el mayor autovalor de $\Sigma = D(X)$ y v_1 un autovector asociado a λ_1 de norma uno

$$(v_1'v_1 = 1) \text{ y } Var(Z_1) = \lambda_1 \quad (12)$$

Para lo que respecta la segunda componente principal de X es una variable aleatoria Z_2 tal que

$$Z_2 = v_2'X = v_{12}X_1 + \dots + v_{p2}X_p \text{ con } v_2 = (v_{12}, \dots, v_{p2})' \in \mathbb{R}^p \quad (13)$$

$$Var(Z_2) = \max\{Var(v'X): v \in \mathbb{R}^p, v'v = 1, v_1'v = 0\} \quad (14)$$

Donde la segunda componente es otra combinación lineal de las variables X y de entre todas las combinaciones lineales formadas por vectores unitarios ortogonales a v_1 es la que tiene la mayor varianza. Esta componente principal X adopta la forma: (Jolliffe, 2002)

$$Z_2 = v_2'X \quad (15)$$

Siendo λ_2 el mayor autovalor de $\Sigma = D(X)$ y v_2 un autovector asociado a λ_2 de norma uno ($v_2'v_2 = 1$) y ortogonal a v_1 ($v_1'v_2 = 0$).

$$\text{Además } \text{Var}(Z_2) = \lambda_2 \quad (16)$$

Por lo anterior podemos definir las p componente de X como las variables aleatorias (Z_1, \dots, Z_p) tales que (Jolliffe, 2002)

$$Z_1 = v_1'X, \dots, Z_p = v_p'X \quad v_1, \dots, v_p \in \mathbb{R}^p \quad (17)$$

$$\text{Var}(Z_1) = \max\{\text{Var}(v'X): v \in \mathbb{R}^p, v'v = 1\} \quad (18)$$

$$\text{Var}(Z_2) = \max\{\text{Var}(v'X): v \in \mathbb{R}^p, v'v = 1, v_1'v = 0\} \quad (19)$$

⋮

$$\text{Var}(Z_j) = \max\{\text{Var}(v'X): v \in \mathbb{R}^p, v'v = 1, v_1'v = 0, \dots, v_{j-1}'v = 0\} \quad (20)$$

⋮

$$\text{Var}(Z_p) = \max\{\text{Var}(v'X): v \in \mathbb{R}^p, v'v = 1, v_1'v = 0, \dots, v_{p-1}'v = 0\} \quad (21)$$

Por lo tanto las componentes principales adoptan la forma:

$$Z_j = v_j'X \quad j \in \{1, \dots, p\} \quad (22)$$

Siendo $\lambda_1 \geq \dots \geq \lambda_p \geq 0$ los p autovalores ordenados de $\Sigma = D(X)$ y v_1, \dots, v_p sus autovectores asociados normalizados, esto es, $\{v_1, \dots, v_p\}$ es una base ortonormal de autovectores las componentes son correlacionadas $\text{Cov}(Z_j, Z_k) = 0$ si $j \neq k$ y (Jolliffe, 2002)

$$\text{Var}(Z_j) = \lambda_j \quad j \in \{1, \dots, p\} \quad (23)$$

2. JUSTIFICACIÓN

Las ciencias exactas como son las matemáticas y la física son pilares para el desarrollo de todas las ciencias aplicadas, la bioingeniería es una rama del conocimiento que aplica fuertemente herramientas matemáticas a los fenómenos físicos que ocurren en los biosistemas. Una forma de aplicar estas herramientas es traducir la complejidad de los sistemas biológicos a valores numéricos útiles para evaluar la estructura y calidad de frutos de importancia comercial para el país, tal como es el caso de las manzanas. Así, las manzanas han sido estudiadas a través de parámetros fisicoquímicos y su microestructura, pero los estudios son de manera aislada y descriptiva. Hoy día la capacidad de las técnicas de microscopía conjuntada con el análisis de imágenes permite aportar información cuantitativa que puede ser útil para diversas ramas de la ingeniería. Aunado a esto las técnicas estadísticas como el análisis multivariado permiten analizar los datos de diferentes variables de manera conjunta y elucidar cuáles son los parámetros más importantes o de mayor relevancia que describen adecuadamente la variabilidad de las muestras y las clasifica. Estas herramientas analíticas usadas en conjunto pueden ser auxiliares en la evaluación de la calidad de los frutos. Sin embargo, estas herramientas no han sido conjuntadas en un mismo estudio desde un punto de vista matemático y que permitan encontrar correlaciones entre las propiedades microestructurales y fisicoquímicas en diferentes variedades de manzana. Así, este trabajo al emplear herramientas estadísticas y de análisis de imagen para evaluar las microestructura y parámetros fisicoquímicos de sistemas biológicos, pueden proveer un método integral y útil para la evaluación de la calidad de frutos y la clasificación de las variedades de manzana analizadas en el presente estudio. Todo ello puede considerarse como parte importante de las herramientas que se utilizan en ingeniería matemática para diseñar estrategias para mejorar los procesos y la calidad de los productos, incluidos los de origen alimentario o biológico.

3. HIPÓTESIS

Las propiedades fisicoquímicas determinadas a nivel macroscópico tienen correlación con las propiedades mecánicas y microestructurales de las variedades de manzana estudiadas. Si es así, será posible establecer un método para clasificar las manzanas, basado en las propiedades evaluadas a nivel macroscópico pero en concordancia con la microestructura de los frutos. En consecuencia, las correlaciones encontradas pueden ser útiles para la conservación, evaluación y clasificación de la calidad de los frutos estudiados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Estudiar y comparar, a través del análisis de imagen, la microestructura del tejido de manzana de diferentes variedades, nacionales e internacionales a través de distintas técnicas de microscopía, parámetros fisicoquímicos, de imagen y estadísticos.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar por medio de métodos fisicoquímicos básicos y técnicas de microscopía el estado de madurez de cuatro variedades de manzana (Gala, Golden Delicious, Red Delicious y Granny Smith) con el fin de realizar un estudio comparativo entre las variedades de manzana estudiadas.
- Realizar el análisis de los datos fisicoquímicos y de las imágenes obtenidas por medio de microscopía óptica, confocal y de barrido de electrones.
- Analizar la microestructura del tejido de manzana de las variedades estudiadas, a través de métodos estadísticos clásicos y multivariados para proponer un método

de clasificación de las diferentes variedades de manzana basado en herramientas matemáticas y que pueda ser útil para la industria alimentaria.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales, Equipos y Software

Materiales

- Materia Prima: .Se obtuvieron del mercado local (Superama) y seleccionaron frutos en estado madurez de consumo, de tamaño similar, sin defectos, golpes, plagas o cualquier alteración visible a simple vista. Las variedades de manzana que se seleccionaron para el estudio fueron: Golden Delicious (Chihuahua, México), Red Delicious (Chihuahua, México) Granny Smith (Washington, USA), Manzana Gala (Washington, USA).

Reactivos

- Agua destilada para la elaboración de las diferentes soluciones utilizadas durante la experimentación.
- Gotas de fenolftaleína
- NaOH 0.1N
- Calcoflúor 0.01 %
- Azul de Evans

Equipos

- Analizador de textura (CT3 Texture Analyzer, EE.UU.).
- Colorímetro (CHROMA METER CR-400, Konica Minolta, Japón)
- Microscopio óptico (Eclipse Ni, Nikon, Japón) que está conectado a una cámara digital (DS- Vi1 , Nikon, Japón) y un sistema de captura de imágenes (DS-L3, Nikon, Japón)
- Microscopio electrónico de barrido (modo 100% ambiental) (EVO LS10, Carl Zeiss, Alemania)
- Microscopio Confocal de Barrido Laser (LSM 710, Carl Zeiss, Alemania).
- Balanza (AC-100, Denver Instrument, USA)

Software

- Programa ImageJ v.1.46(National Institute of Health, Bethesda,MD, EE.UU.).
- Programa Sigma Plot 12.5 (Systat software Inc. EUA)
- XLSTAT versión 2016.3 (Addinsoft, EUA)

5.2 Metodología

5.2.1 Obtención de las muestras

Se obtuvieron manzanas de las variedades: Golden Delicious (Chihuahua), Red Delicious, Gala Washington y Granny Smith del mercado local específicamente de Superama. Se escogieron cada una de las manzanas libres de daños y en estado de maduración de consumo. Estas variedades se seleccionaron debido a su importancia a nivel internacional.

5.2.2 Análisis Físicoquímicos

5.2.2.1 Peso y Volumen

Se pesaron 5 manzanas de cada variedad en una balanza (AC-100, Denver Instrument, USA) y se reportó el promedio y desviación estándar de cada variedad. Se determinó el volumen de las manzanas mediante la prueba de volumen desplazado, la cual consiste en tomar un vaso de precipitado graduado de 500 ml, donde se vierte una cantidad de agua específica y posteriormente se sumerge la muestra y se mide el volumen desplazado. Se realiza la resta entre el volumen desplazado y el volumen original (Mohsenin, 1978).

5.2.2.2 Estado de madurez de las manzanas por pruebas físicoquímicas

El estado de madurez de los frutos en general es una de las características que se consideran en todas las normas la garantía que tales frutos satisfagan las exigencias del consumidor en lo que a calidad se refiere. Para la evaluación del estado de madurez emplearon los siguientes indicadores físicoquímicos de acuerdo a lo recomendado por Ornelas-Paz et al. (2013): sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT) y firmeza (F) y a través de ellos es posible establecer su índice de madurez o por sus siglas en inglés RPI (Ripening Index) de acuerdo a lo reportado por Vásquez-Caicedo et al. (2005).

La AT se midió usando alrededor de 15 g de pulpa de la manzana libre cascara y hueso, la pulpa fue molida, homogenizada y filtrada a través de una gasa. Del jugo obtenido se tomaron al menos de 10 g y se colocaron en matraz aforado de 100 ml y se completó el aforo con agua destilada. Después esta solución se pasó a un matraz Erlenmeyer y se

agregó 2 gotas de fenolftaleína, la solución se valoró con NaOH 0.1 N colocado en un bureta volumétrica hasta obtener el vire del indicador (color rosado-morado). Se anotó el gasto de NaOH y este se usó para obtener la acidez de la muestra a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez titulable} = \left(\frac{\text{Gasto NaOH ml} \times 0.0067 \times 100}{\text{Peso de la muestra g}} \right) \times 10 \quad (24)$$

Este experimento se realizó en las 4 manzanas por triplicado y se reporta como g equivalentes de ácido cítrico /g de muestra.

Los SST se realizaron por triplicado en cada variedad de manzana tomando una gota del jugo de manzana libre de fibra y colocándolo en un refractómetro digital (Boeco, Alemania) y se reportaron en °Bx.

La firmeza (F) de las manzanas se determinó mediante pruebas de penetración usando un Texturómetro (TexturePro CT V1.6 Build). Se seleccionaron 3 manzanas de cada variedad, las cuales se cortaron 2 rebanas para cada manzana. Los cortes tuvieron un espesor de 2 cm, fueron obtenidos de la zona perimetral del mesocarpio. Se colocaron en cada rebanada 3 puntos con una distancia de 2 cm donde se evaluaron la prueba. En total se realizaron 18 muestras de cada variedad de manzana. La medición de firmeza se realizó mediante una sonda cilíndrica de 6 mm diámetro. Con una velocidad de prueba de 0.5 mm/s y con un objetivo (la profundidad máxima de penetración) de 9 mm. Las condiciones para la prueba se basaron en estudios previos de firmeza en manzanas (Varela et al. 2007; Rowe et al. 2014; Hou et al. 2016). La F se determinó como la máxima fuerza requerida para atravesar el fruto expresado en Newton (N).

Con los parámetros anteriormente descritos se determinó el índice de madurez en cada variedad de manzana de acuerdo a la ecuación reportada por Vásquez-Caicedo et al. (2005)

$$\text{RPI} = \ln\left(100 \times \left|F\right| \times \frac{\text{AT}}{\text{SST}}\right) \quad (25)$$

Esto con la finalidad de encontrar exactamente el estado de madurez en que se encuentran y como un punto de referencia.

5.2.3 Color

Este parámetro se midió con un colorímetro (CHROMA METER CR-400, Konica Minolta, Japón) y para ello se tomaron 5 manzanas de cada variedad, se les dibujo en la parte superior los números: 0, 1, 2, 3, que fueron las caras donde se colocó el colorímetro y se realizaron las mediciones. Se realizaron 3 lecturas para cada manzana en la zona ecuatorial del fruto. Se obtuvieron los parámetros de “L*”, “a*” y “b*” del espacio de color CIE Lab.

5.2.4 Estudio de microscopía óptica y caracterización de células mediante análisis de imágenes.

La evaluación morfométrica se realizó mediante un microscopio óptico (Eclipse, Ni Nikon, Japón) que está conectado a una cámara digital (DS- Vi1, Nikon, Japón) y un sistema de captura de imágenes (DS- L3, Nikon, Japón). Para obtener las imágenes del tejido de manzana se cortaron las muestras de la parte perimetral del parénquima en la forma de un cubo rectangular y luego se extrajeron rebanadas delgadas utilizando hojas de afeitar de doble filo (Oey et al. 2007) y después se colocaron en un porta objetos y se observaron en el microscopio con el objetivo 20x sin tinción. Se capturaron por lo menos 20 imágenes de cada variedad estudiada. Las imágenes se almacenaron en formato RGB/TIFF a 1600 × 1200 píxeles y fueron convertidas a escala de grises y posteriormente a imágenes binarias para segmentar las células usando el algoritmo Mexican Hat del software ImageJ v. 1.46, el principio del funcionamiento de este algoritmo se explica en la sección 5.2.4.1. Finalmente, la forma y el tamaño de las células se analizaron desde las imágenes binarias y se obtuvieron los siguientes parámetros morfométricos:

- Área: Número total de píxeles que caen dentro del contorno del elemento analizado, multiplicado por el área de un píxel. Se realizó el cambio de píxeles a μm^2 midiendo y usando la escala de calibración de las imágenes para obtener un

factor de conversión o resolución de la imagen de $0.641 \mu\text{m}^2/\text{px}$. Para las medidas de longitud se hizo el mismo procedimiento y la resolución fue de $0.641 \mu\text{m}/\text{px}$.

- Perímetro: La longitud total de los límites de un cuerpo y este fue calculado a partir de sus proyecciones horizontales y verticales.
- Diámetro de Feret (Diámetro máximo): Se definió como la distancia más larga entre dos puntos cualesquiera a lo largo del límite de selección.
- Redondez : Se definió mediante el siguiente relación:

$$4 \times \frac{\text{Area}}{\pi(\text{Máximo Diámetro})^2}, \quad (26)$$

- Relación de aspecto (AR): Fue determinada como el cociente de la distancia mayor entre la distancia menor entre dos puntos a lo largo del límite de selección y se usó la siguiente relación:

$$\text{AR} = \frac{\text{Diámetro mayor}}{\text{Diámetro menor}}, \quad (27)$$

Todas las etapas del análisis de imágenes se realizaron en ImageJ v. 1.47 (National Institutes Salud, Bethesda, MD, USA).

5.2.4.1 Algoritmo Mexican Hat

El algoritmo Mexican Hat utilizado en el software ImageJ v. 1.46 fue aplicado en las imágenes de microscopía de luz para poder facilitar la segmentación de las células y extraer los parámetros morfométricos. Este algoritmo consiste en utilizar el operador “Laplaciano tipo Gaussiano”. Este operador es una herramienta para el procesamiento de imágenes, cuya finalidad es difuminar la imagen, suavizando el ruido, para ello se modifica cada pixel en función de los pixeles que le rodean, convolucionando la imagen (Facello et al. 2003; Fernández, 2014).

El Laplaciano tipo Gaussiano alimenta la imagen de entrada con función $f(x,y)$, donde la imagen es deconvulsionada a través de un kernel Gaussiano: (Bretzner et al. 1998)

$$g(x, y, t) = \frac{1}{2\pi} e^{-(x^2+y^2)/(2t)}, \quad (28)$$

A una determinada escala t para dar una representación "escala-espacio":

$$L(x, y, t) = g(x, y, t) * f(x, y). \quad (29)$$

Así, el operador Laplaciano viene dado por:

$$\nabla^2 L = L_{xx} + L_{yy} \quad (30)$$

Y este normalmente da una fuerte respuesta positiva para regiones oscuras de extensión \sqrt{t} y negativa para regiones claras de tamaño similar. El principal problema al aplicar este operador a escala única es que su respuesta es muy dependiente de la relación entre el tamaño de la región y el tamaño del kernel Gaussiano usado para preparar la imagen. Para detectar automáticamente regiones de tamaño desconocido es necesaria una aproximación a varias escalas. Una manera sencilla de obtener esta aproximación es considerar el Laplaciano de escala normalizada:

$$\nabla^2 \text{norm} L(x, y; t) = t(L_{xx} + L_{yy}). \quad (31)$$

Que sirve para detectar los máximos/mínimos de la representación escala-espacio, que son puntos simultáneamente máximos/mínimos locales de $\nabla^2 \text{norm} L$ con respecto tanto a espacio como a escala. Además este operador da una fuerte respuesta de manchas que son más brillantes o más oscuras que sus antecedentes. Una propiedad importante de estos detectores de características es que los niveles de escala seleccionados proporcionan información sobre los tamaños característicos de las características de la imagen (Bretzner et al. 1998). Esto nos permite encontrar una imagen de las células sin tanto ruido y con la mayor claridad para poder segmentar y cuantificar la forma y el tamaño de cada célula.

Este tipo de filtro ha sido utilizado para la separación de componentes en una imagen de mapas del fondo cósmico de microondas (Tenorio et al. 2004), también se ha ocupado en

el procesamiento de imágenes para un proceso de endocitosis (Fernández, 2014), al igual en otras investigaciones se ha tomado para la detección de características tales como manchas y esquinas en una misma imagen (Bretzner et al. 1998).

5.2.5 Microscopía de barrido de electrones en modo ambiental (ESEM)

La metodología empleada para observar la microestructura del tejido de cada variedad se preparó mediante cortes longitudinales de la porción del pericarpio de la manzana desde 3 manzanas distintas. Los cortes fueron fijados sobre una porta muestra y se observaron directamente en el ESEM (EVO LS10, Carl Zeiss, Alemania) sin recubrimiento conductivo a un voltaje de aceleración de 1.60 kV. Las micrografías fueron capturadas en formato RGB y almacenadas TIFF y luego fueron convertidas a escala de grises y posteriormente a imágenes binarias por segmentación manual, manejando un umbral de segmentación (threshold) de 40.5 ± 7.04 a 255 para poder separar las zonas oscuras del fondo, lo que para este trabajo se definió como los poros del tejido. Estas áreas fueron cuantificadas y se obtuvo el número de píxeles de cada área segmentada como poro para obtener la fracción de área ocupada por los poros en relación al total de píxeles de la imagen o área total (Ziel et al. 2008) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Fracción de área ocupada} = \frac{\text{zona de poros (suma de los espacios con poros)}}{\text{Área total de la imagen}} \quad (32)$$

Cabe aclarar que la fracción de área ocupada o porosa no corresponde directamente al tamaño de un poro sino a una porosidad local o relativa. Asimismo, se obtuvo el número de poros y densidad de poros, los cuales han sido sugeridos como una medida para la evaluación de la porosidad relativa de un material. La densidad de poros se obtuvo del número total de poros entre el área total de la imagen en μm^2 (Sánchez-Pardo et al. 2012).

5.2.6 Microscopio Confocal de Barrido laser (CLSM)

Para el caso de los estudios de microscopía confocal de barrido laser (CLSM, confocal laser scanning microscopy) se tomaron 3 manzanas de cada variedad a partir de éstas realizaron desde 4 cortes longitudinales en el pericarpio con grosor de 45 μm . Estos fueron teñidos con 1 ml con azul de Evans por media hora y posteriormente fueron lavados 5 veces con agua destilada. Como el tejido de manzana contiene clorofila, que es un compuesto que genera autofluorescencia en una longitud de onda de excitación para la clorofila “a” de 430 nm y de emisión de 670 nm y para la clorofila “b” de 460nm y de emisión de 660 nm. (Vitta et al. 2009). Esta auto-fluorescencia se debe inhibir para poder teñir las paredes celulares de cada variedad, por lo que se ocupó azul de Evans que tiene una longitud de onda de excitación de 550 nm y de emisión de 625 nm, esto permitió inhibir la autofluorescencia de la clorofila y además sin interferir con los máximos de emisión de los fluorocromos en las tinciones. Esto se puede realizar debido a que el azul de Evans traslapa los espectros de emisión y absorción de la clorofila, por lo que se desactiva la autofluorescencia de las clorofilas (Osterman et al. 2009).

Debido a que la pared celular está compuesta de celulosa y hemicelulosa éstas fueron marcadas con 1 ml de calcoflúor White M2R al 0.01% (fluorescent brightener 28 F3543, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por 5 minutos de acuerdo a lo reportado por Hernández-Hernández et al. (2014), cabe recordar que el calcoflúor es un marcador fluorescente que tiene una gran afinidad a la celulosa permitiendo teñir adecuadamente la celulosa y hemicelulosa del tejido (Bessadok et al. 2009). Posteriormente se realizaron 5 lavados de agua destilada para cada muestra, luego fueron montados en portaobjetos y vistas en el CLSM (LSM 710, Carl Zeiss, Alemania). Este equipo cuenta con canales espectrales o modo lambda y fueron usados para detectar las señales de fluorescencia de la celulosa y para esto se usó el software Zen del CLSM. Se capturaron alrededor de 10 campos para obtener imágenes en RGB que fueron almacenadas en formato TIFF a 512 x 512 píxeles.

5.2.7 Análisis estadístico descriptivo y multivariado

Los datos obtenidos en las determinaciones fisicoquímicas, color y análisis de imágenes para las cuatro variedades de manzana fueron expresados como un valor promedio con su desviación estándar respectiva. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante comparación múltiple con un ANOVA (**AN**alysis **Of** **VA**riance) de una vía usando la prueba de Tukey y el programa SigmaPlot versión 11.0. Asimismo, se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Los parámetros obtenidos en las determinaciones fisicoquímicas (SST, AT, F, RPI, peso, volumen desplazado y densidad aparente), análisis de imágenes de microscopia de luz (Área, perímetro, redondez, diámetro de Feret y circularidad) y barrido de electrones (Número poros, densidad de poro y fracción de área ocupada) para las cuatro variedades de manzana estudiadas, fueron arregladas en una matriz de 16 variables x 4 variedades para establecer que variables tenían mayor correlación entre sí mediante un análisis de Pearson que se corrió de manera simultánea el Análisis de Componentes Principales (PCA, principal components analysis) que fue utilizado para clasificar las diferentes variedades de manzana. El PCA es una herramienta estadística multivariable que reduce el número de variables basado en la varianza del conjunto de datos y representa los datos como variables transformadas llamadas componentes principales para su posterior análisis. Esta técnica permite correlacionar las variables así como la contribución de las mismas proveyendo información sobre la distribución de los datos. (Jolliffe, 2002; Veléz-Rivera et al. 2013). De esta manera, el PCA se utilizó para seleccionar las variables con mayor importancia del sistema y así poder clasificar las variedades de manzanas estudiadas.

Para ambos análisis estadísticos, una diferencia de $p < 0.05$ se considera significativa. Los estudios estadísticos se llevaron a cabo con el programa XLSTAT v2009.3.02 (Addinsoft, EUA).

Finalmente, un resumen de la metodología desarrollada en la presente tesis se presenta a continuación como diagrama de flujo (Figura 6).

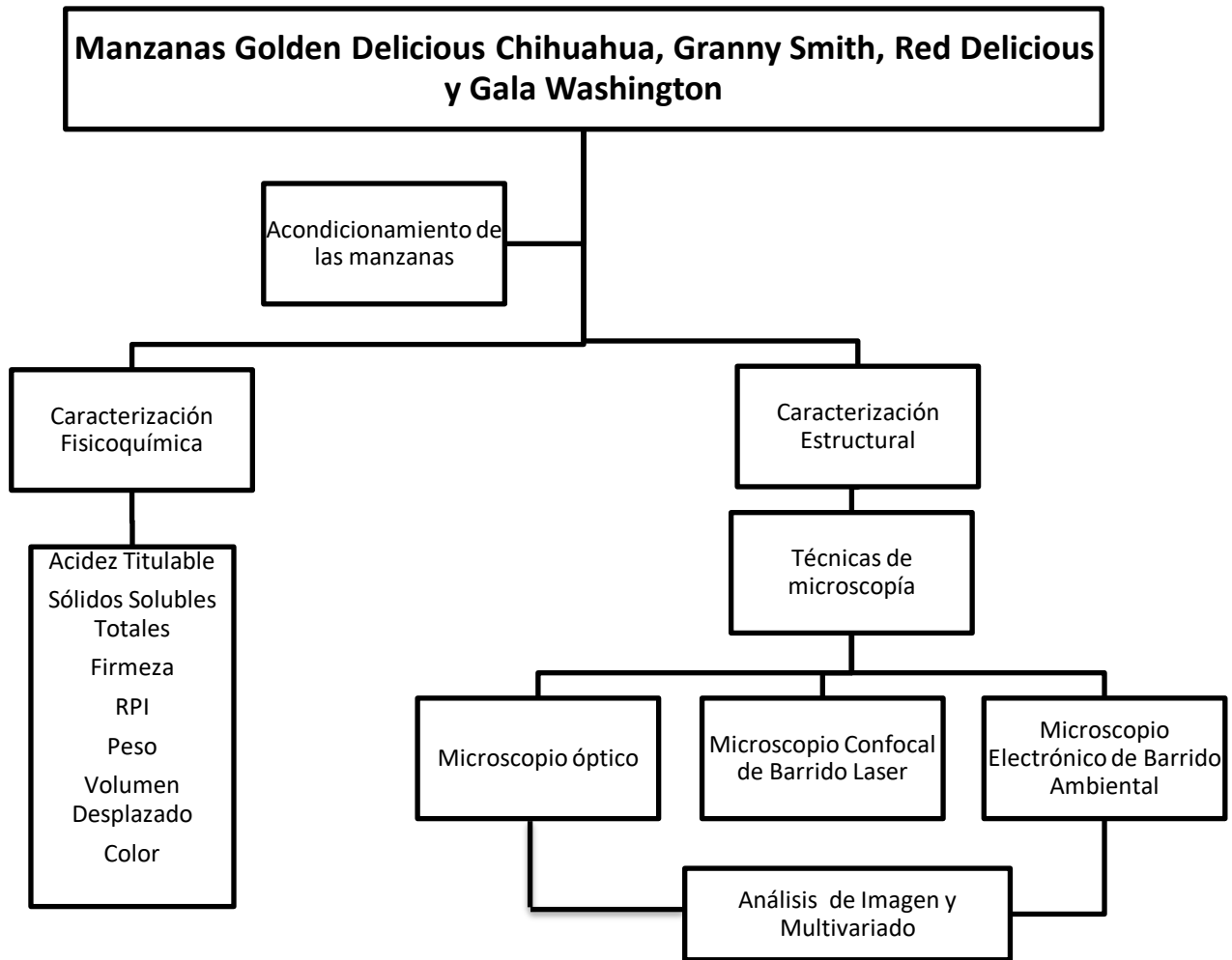


Figura 6 Diagrama de flujo del trabajo experimental

6. Resultados y discusión

6.1 Análisis Físicoquímicos

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de los análisis físicoquímicos realizados a las diferentes manzanas estudiadas, con el fin de evaluar el estado de madurez de las mismas. Las manzanas que se analizaron fueron seleccionadas por inspección visual y al tacto y para tener muestras en un estado de maduración para consumo, es decir, presentaba una firmeza al tacto aceptable y un color típico para consumo, es decir no verdes o sobre maduras, y sin defectos por daños mecánicos o plaga.

Cuadro 1. Parámetros físicoquímicos de las variedades de manzana estudiadas.

	Golden D	Granny S	Gala W.	Red D.
Acidez Titulable (g de ácido málico / g de la muestra)	3.29±0.30	6.99±0.95 ^{a, b}	2.60±0.09 ^b	2.20±0.05 ^a
Sólidos solubles Totales (°Brix)	12.08±1.98	11.7±0.47	11.1±0.05	13.06±0.057
Firmeza (N)	20.59± 1.85 ^{a, b}	24.54±4.77 ^b	22.92±6.584	24.69±4.56 ^a
RPI	6.33	7.29	6.28	6.03
Peso (g)	137.76±11.07 ^{a, d, e}	181.47±10.39 ^{c, d}	161.36±13.16 ^{b, e}	216.14±15.96 ^{a, b, c}
Volumen desplazado (cm ³)	149.66±0.57 ^{a, d}	199.66±0.57 ^{c, d, e}	168.33±16.07 ^{b, e}	238.33±12.58 ^{a, b, c}

*Letras iguales en el mismo renglón tienen diferencia significativa ($p < 0.05$), valores expresados como promedio aritmético ± desviación estándar.

En el parámetro de acidez titulable podemos observar que las manzanas Golden, Gala y Red tienen un comportamiento similar que va de 3.29 a 2.20 g de ácido málico / g de la muestra, mientras que la manzana Granny tiene un comportamiento muy diferente con un valor de 6.99 g de ácido málico / g esto debido a que es una manzana que generalmente es más ácida que las demás. En algunos estudios de manzanas de otras especies por ejemplo en la var. Borkh reportaron una acidez titulable de 6.45±0.17 g de ácido málico / g de la muestra (Rizzolo et al. 2010) que fue similar al valor que se encontró en el presente estudio para la variedad Granny Smit. Mientras Calvo (2002) reportó un

valor de 3.05 g ácido málico/g de la muestra de acidez titulable en la manzana Red Delicious. Como podemos observar los valores obtenidos de la acidez titulable para las manzanas estudiadas en este trabajo fueron similares a los reportados en la literatura.

En los que se refiere al parámetro de sólidos solubles totales las manzanas Granny y Gala tienen un comportamiento similar con un valor que de 11.1 °Brix a 11.7 °Brix, mientras que las demás variedades oscilan entre 12.06 °Brix a 13.06 °Brix. En algunos trabajos reportaron sólidos solubles totales (SST) para la var. Fuji y se encontraron valores de 13.42 ± 1.21 °Brix (Guo et al. 2016) lo cual es similar al valor encontrado en este estudio para la var. Red Delicious. En la var. "Crip's Pink" se encontró para SST un valor de 14.4 °Brix (Whale et al. 2008). En otros cultivares como la manzana de var. Borkh reportaron 11.69 ± 0.19 °Brix (Rizzolo et al. 2010). En la var. Jonagold han reportado una media de SST 12.7 °Brix (Mendoza et al. 2011) que fue similar al valor que se encontró en este estudio para la var. Golden Delicious. En lo que se refiere al trabajo de Iglesias et al. (2008) se reportó un valor entre 11.1 °Brix en la var. Gala. Abbott et al. (2004) realizaron un análisis de (SST) para las variedades de Golden Delicious y Grany Smith, donde se obtuvieron 13.5 °Brix y 15.3 °Brix respectivamente. En lo que se refiere a la var. Red Delicious han reportado un valor de 13.74 °Brix (Mancera-López et al. 2007).

Con los datos referidos en el Cuadro 1 encontramos que la variedad con mayor firmeza es Red Delicious seguida de la variedad Granny Smith. Mientras que la variedad con menor firmeza es Golden Delicious. En otros trabajos se han reportado diversos valores de firmeza para las manzanas que estudiaron aquí, por ejemplo la manzana Golden Delicious tiene un valor alrededor de 45.0 N esto debido a que se utilizó un penetrómetro, con una sonda de tamaño de 11.1 mm con forma de esfera (Allan-Wojtas et al. 2003). En otro reporte se registró el mismo parámetro para la manzana Golden Delicious con un valor de 12.3 N y para la manzana Granny Smith un valor de 13.9 N, en este caso si utilizaron texturómetro pero varió en la forma de corte de la manzana ya que fue una rebanada horizontal, con una máxima penetración de 3 mm que es menos de la mitad de lo que se realizó en este estudio (Abbott et al. 2004). Por su parte Mendoza et al. (2011) reportaron

para la manzana Golden Delicious un valor alrededor de 56.6 N pero su sonda tenía un tamaño de 11.1 mm con una velocidad de prueba de 2 mm/s. Otra investigación reportaron que de la variedad Golden Delicious tenía un valor de firmeza de 14.18 N y Red Delicious 13.74 N, pero realizaron las pruebas con un penetrómetro (Mancera-López et al. 2007). Para la variedad Gala Royal encontraron una firmeza de 62 N, realizaron esta prueba con un penetrómetro (Rowe et al. 2014). Como se puede observar existen diferencias notables de los resultados obtenidos en este estudio en relación con las otras investigaciones referidas, esto se puede deber a que se utilizaron diferentes equipos de medición, diferentes tipos de sonda y parámetros para realizar la evaluación de la firmeza de diferentes variedades de manzana. Esto sugiere que es necesario establecer o usar un método oficial para evaluar la firmeza en la manzana.

En los datos obtenidos para el parámetro de RPI para cada manzana se observa que hay una gran similitud entre las variedades Golden Delicious, Gala Washinton y Red Delicious. Mientras que la variedad Granny Smith es la que tiene un número mayor en comparación con las anteriores. En la literatura no existen valores de RPI para manzana, porque este ha sido usado más frecuentemente en otros frutos climatéricos como el mango variedad Manila (Vélez-Rivera, 2013). Sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo están en concordancia con los reportados por Cárdenas-Pérez, (2016) que propuso el uso del RPI para evaluar el estado de madurez de manzanas variedad Golden Delicious, este trabajo reporta valores de RPI que oscilaron entre 6.69 ± 0.14 en el día 1 a 5.54 ± 0.06 en el día 40 de almacenamiento.

En el análisis de peso encontramos que la manzana con mayor peso es la variedad Red Delicious con 216.14 ± 15.96 y la que le sigue es la Granny Smith. La manzana con menor peso es la Golden Delicious (Chihuahua). En algunas investigaciones reportaron el peso de las manzanas Golden Delicious alrededor de 188.2 y Red Delicious 215.8 (Mancera-López et al. 2007). Hou et al. (2016) reportaron el parámetro de peso de las siguientes variedades de manzana Fuji con 228.2 ± 4.0 , Golden Delicious 224.8 ± 3.1 y Jonagold 251.8 ± 38.1 . Con los datos anteriores podemos concluir que los valores para la variedad

de Red Delicious son similares los valores obtenidos con los reportados en otros estudios, mientras que la variedad Golden Delicious hay una amplia variabilidad entre las investigaciones previas y en los valores obtenidos. En los que respecta a las variedades Granny y Gala no hay similitud entre ellas u otra variedad antes mencionada.

En el parámetro del volumen desplazado observamos que la variedad Red Delicious tiene un valor mayor volumen que las demás manzanas mientras que la variedad Golden Delicious (Chihuahua) es la que tiene un a valor menor de volumen, esto está asociado principalmente a las diferencias típicas de cada variedad estudiada.

6.2 Color

En el Cuadro 2, se muestran los resultados del espacio de color de cada variedad, esto con el fin de establecer el color de cada variedad manzana estudiada en el presente trabajo.

Cuadro 2. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de color L*, a* y b* de cada variedad de manzana.

	Golden D C	Granny S	Gala W.	Red D.
L	67.85±1.89 ^a	65.37±2.67 ^c	66.26±3.08 ^b	36.12±4.69 ^{a,b,c}
a*	-15.10±-1.42 ^{b,d}	-16.120±0.74 ^{a,c}	13.22±3.15 ^{c,d}	31.083±1.45 ^{a,b}
b*	48.30±0.50 ^{a,b}	39.75±2.74 ^c	33.73±2.73 ^b	14.87±2.87 ^{a,c}

*Letras iguales en el mismo renglón tienen diferencia significativa ($p < 0.05$)

En la coordenada cromática L* que detecta la luminosidad de color observamos que la var. Red Delicious tiene un valor menor que las demás variedades, mientras que las manzanas faltantes oscilan entre 65 a 67. En lo que respecta la coordenada a* encontramos que las variedades Golden Delicious (Chihuahua) y Granny Smith tienen valores similares, así mismo las variedades Gala Washington y Red Delicious. Esto se debe a que la coordenada a* es el gradiente del (-) al rojo (+). En la coordenada b* los valores tienen diferencias significativas debido a que esta coordenada el gradiente del azul(-) al amarillo(+).

Algunos autores como Dobrzański et al. (2002) observaron el color de la var. Champion, en donde los valores para L* oscilaron entre 40 hasta 72, en el parámetro de b* de -5 a 43

y el parámetro a^* de -10 a 53. Reportaron estos valores debido a que las manzanas que ocuparon fueron almacenadas durante cinco meses además realizaron sus mediciones con un colorímetro (Braive 6016). Guo et al. (2006), reportaron para la var. Fuji los valores para L^* 56.96, para a^* -4.77 y para b^* de 3.85. Utilizando un colorímetro triestímulo. En la var. Granny Smith, Lancaster et al. (1994) reportaron los valores para L^* 47.6, para a^* 3.5 y b^* 16.2 los valores reportados en la literatura son muy diferentes debido a que la manzana la almacenaron a una temperatura 4°C, además su muestra estuvo expuesta a altas intensidades de luz. Otra variedad que estudiaron fue Regal Gala y obtuvieron los siguientes valores para L^* 35.8, para a^* 9.2 y para b^* 1.6. En lo que respecta a la var. Oregon Red Delicious reportaron los valores de L^* 33.9, para a^* 7.1 y para b^* 0.8. Las mediciones de color las hicieron con un analizador de color triestímulo portátil (ChromameterII; Minolta, Ramsey, N. J.) (Lancaster et al. 1994). Como se puede observar la variación de color en las variedades de manzana es amplia, depende del tipo de cultivar y el estado de madurez de las mismas, así como las condiciones de evaluación como la cantidad de luz, la temperatura de la muestra y en los datos reportados en el presente trabajo se puede decir que los valores encontrados están en los intervalos reportados en la literatura.

6.3 Estudio morfométrico de las células del tejido por microscopía de luz (LM)

En las Figuras 7, 8, 9 y 10 se muestran imágenes de la microestructura de cada variedad de manzana, donde se puede observar la organización, tamaño y forma de las células del tejido. En la Figura 7 podemos observar las células de la variedad Golden Delicious (Chihuahua) donde encontramos que tiene una forma ovalada, en algunas casi redondas y pequeña con respecto a las demás variedades de este estudio.

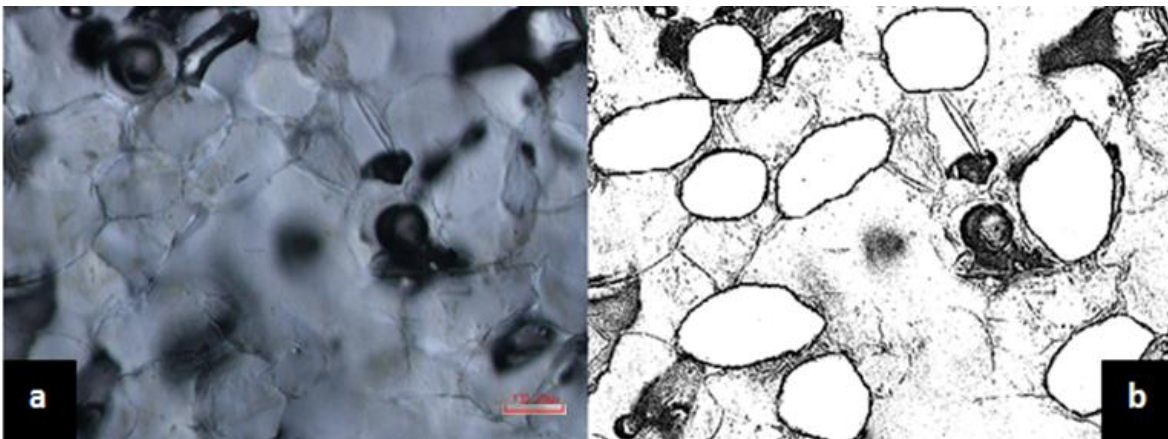


Figura 7. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Golden Delicious (Chihuahua): a) Imagen en campo claro del tejido b) Imagen segmentada con algoritmo Mexican Hat. Barra en rojo representa 100 μ m. Magnificación 20x.

En cambio en la Figura 8 muestra las células de la variedad Granny Smith, donde se puede observar que tienen un tamaño mayor y sus células presentan una amplia gama de formas en comparación con las imágenes de las variedades Golden Delicious (Chihuahua).

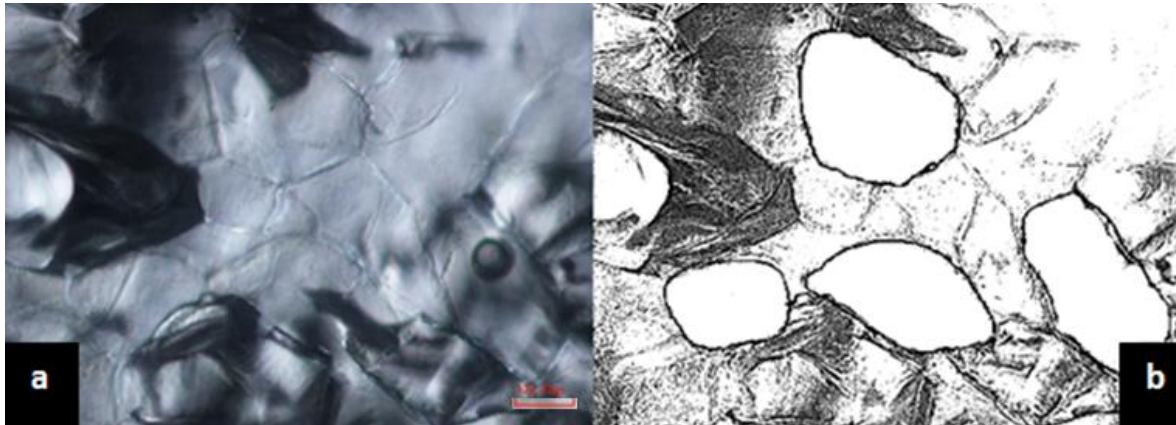


Figura 8. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Granny Smith: a) Imagen en campo claro del tejido b) Imagen segmentada con algoritmo Mexican Hat. Barra en rojo representa 100 μ m. Magnificación 20x.

Por otro lado, en la variedad Gala Washington (Figura 9 se puede observar que la gran mayoría de las células son grandes y unas pocas son pequeñas, otras son alargadas o semiredondas. Esta variedad se asemeja a la manzana Granny Smith al tener células más grandes que la variedad Golde Delicious (Chihuahua).

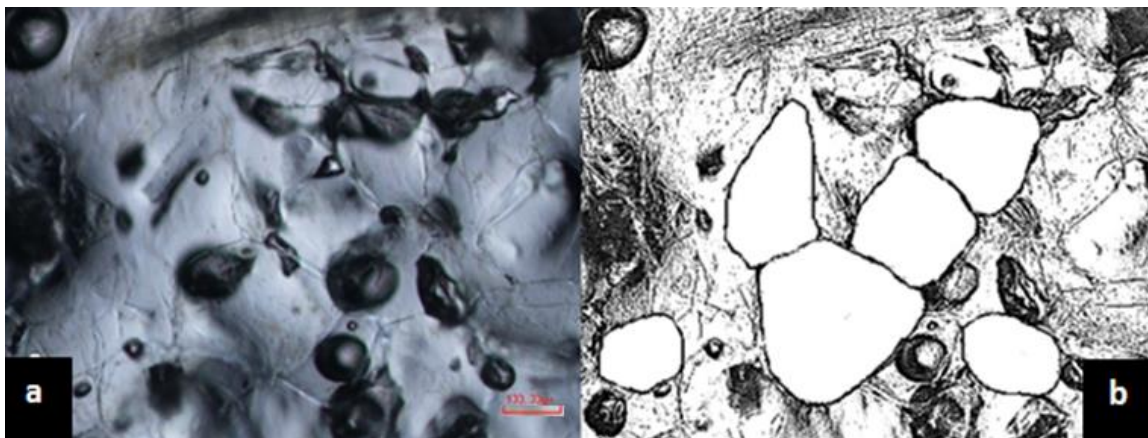


Figura 9. Imagen de microscopía de luz del tejido de manzana de la variedad Gala Washington: a) Imagen en campo claro del tejido b) Imagen segmentada con algoritmo Mexican Hat. Barra en rojo representa 100 μ m. Magnificación 20x.

En lo que se refiere a la variedad Red Delicious (Figura 10) se observa que sus células son más homogéneas y de menor tamaño comparado con las variedades Granny Smith y Gala, pero tiene una mayor similitud con las células del tejido de la variedad Golden Delicious (Chihuahua).

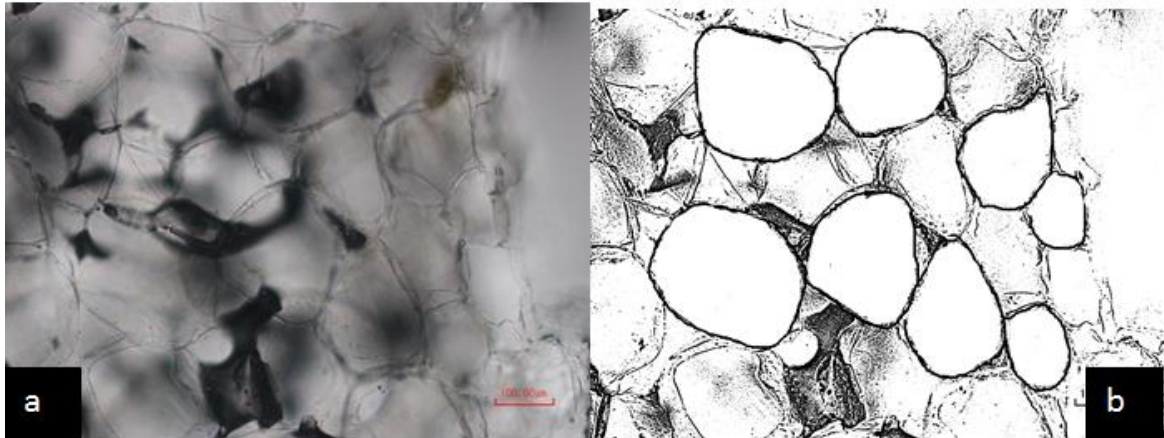


Figura 10. Imagen de microscopia de luz del tejido de manzana de la variedad Red Delicious: a) Imagen en campo claro del tejido b) Imagen segmentada con algoritmo Mexican Hat. Barra en rojo representa 100 μ m. Magnificación 20x.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de los parámetros morfométricos de las células del tejido de las diferentes manzanas estudiadas, con el fin de evaluarla forma y tamaño de las mismas.

Cuadro3. Parámetros de imagen de células de cada variedad de manzana, \pm indica desviación estándar

	Golden D	Granny S.	Gala W.	Red D.
Área (μm^2)	30400 \pm 12021 ^{a,d}	43128 \pm 17823 ^{a,b,c}	34430 \pm 13381 ^{c,d,e}	32151 \pm 12034 ^{b,e}
Perímetro (μm)	667 \pm 157 ^{a,d}	800 \pm 200 ^{a,b,c}	702 \pm 159 ^{c,d,e}	657.03 \pm 148.53 ^{b,e}
Redondez	0.72 \pm 0.13 ^{b,e}	0.70 \pm 0.13 ^{a,d,e}	0.72 \pm 0.12 ^{c,d}	0.74 \pm 0.12 ^{a,b,c}
Diámetro (μm)	194 \pm 43 ^{a,d}	233 \pm 53 ^{a,b,c}	205 \pm 45 ^{c,d,e}	195 \pm 40 ^{b,e}
AR	1.44 \pm 0.30 ^{c,d}	1.49 \pm 0.33 ^{a,b,c,e}	1.43 \pm 0.29 ^b	1.38 \pm 0.25 ^{a,d,e}

*Letras iguales en el mismo renglón tienen diferencia significativa ($p < 0.05$)

Como se puede observar existen diferencias entre los tamaños celulares de cada variedad, teniendo la Golden Delicious (Chihuahua) y la Red Delicious con valores similares de área, diámetro y redondez. Contrariamente la variedad Granny Smith mostro los valores de área y diámetro más grandes, seguidos de la Gala, esto se asoció también con la forma de las células que tendieron a ser menos circulares por lo que el tamaño celular se ve incrementado. En otras investigaciones se reportó el área de la célula de la Manzana Golden Delicious en $18,990 \pm 689 \mu m^2$ y en la manzana Granny Smith en $28,332 \pm 1120 \mu m^2$. En lo que se refiere al diámetro se los resultados fueron en Golden $150.2 \pm 2.9 \mu m$ y en Granny Smith $184.3 \pm 3.8 \mu m$ (Cen et al. 2013). El autor Kubik et al. (2013) reportaron el perímetro de las células de diversas variedades de manzana como la variedad Jonathan donde encontraron un valor medio de $460.593 \mu m$, en la variedad Jonagared se encontró un valor medio de $597.892 \mu m$, en la variedad Ontário de $622.270 \mu m$ y en la Spartan de $559.753 \mu m$.

Aunque difieren con nuestros resultados se mantiene la conclusión de que las células de Granny Smith es la más grande comparada con la variedad Golden.

6.4 Microscopía de barrido de electrones en modo ambiental (ESEM)

En las Figuras 11-14 se muestran las imágenes de ESEM del tejido de las variedades de manzana estudiadas y que sirvieron para analizar la porosidad de su parénquima. Se puede observar en la Fig 11 la variedad Red Delicious tiene mayor número de poros en comparación con las otras variedades, además de presentar una distribución y tamaño de poro más homogéneo, así como células más redondas y menos elongadas (Cuadro 3), por lo que estas características microestructurales le confieren el mayor valor de firmeza de entre las variedades estudiadas (Cuadro 1).

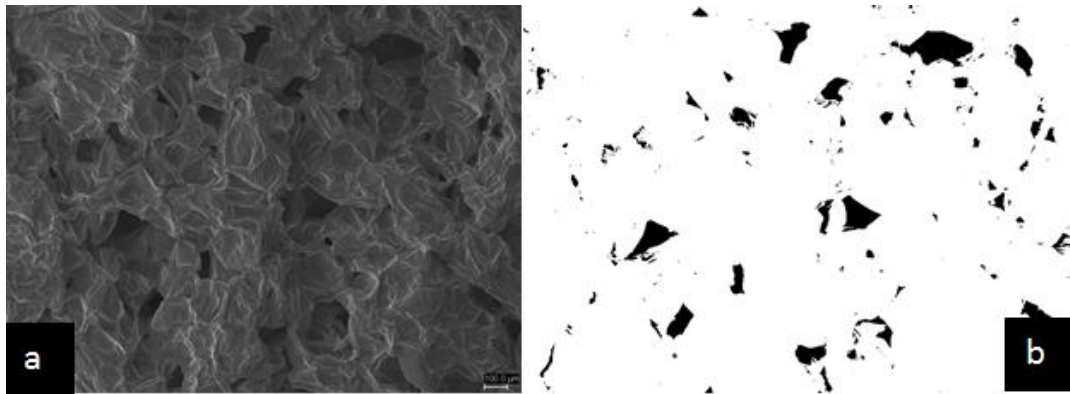


Figura 11. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Red Delicious: a) Imagen con ESEM, b) Imagen segmentada con Thershold. Magnitud 50x

En la Figura 12 se muestra una imagen seleccionada del tejido parenquimático de la variedad Gala Washington donde se observa que su microestructura tiene una distribución de poros con mayor variabilidad de forma y tamaño, presentando espacios vacíos más grandes que la variedad Red Delicious, esto se puede asociar a menores valores de firmeza observados en la variedad Gala Washington (Cuadro 1).

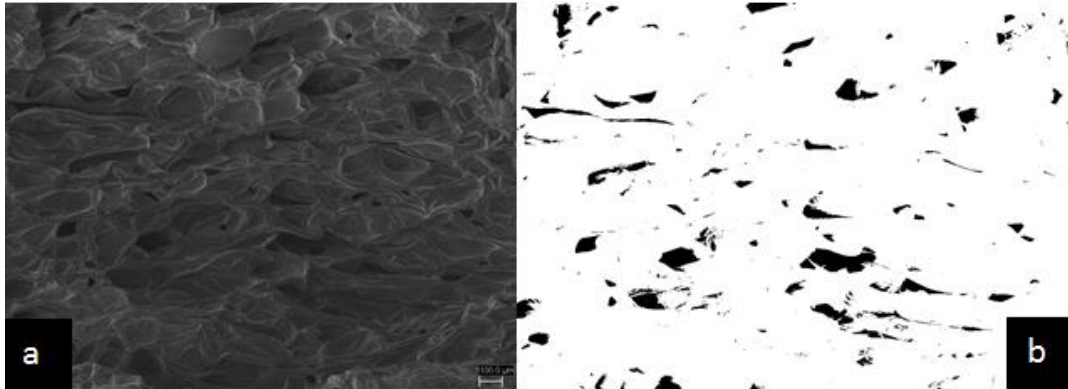


Figura 12. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Gala Washington: a) Imagen con ESEM, b) Modificada con el software Image J. con Threshold. Magnitud 50x

En la figura 13 se presenta la muestra de la variedad Granny Smith donde se observa que los poros son más grandes e irregulares así como una distribución heterogénea debido a que en ciertas zonas hay una mayor concentración de poros del tejido.

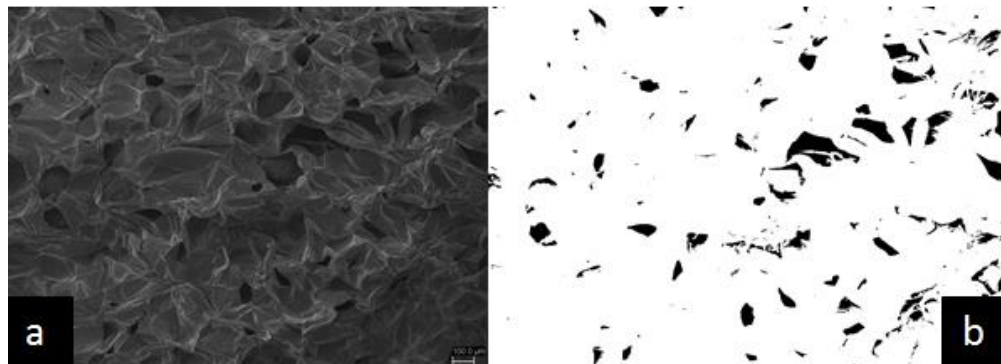


Figura 13. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Granny Smith: a) Imagen con ESEM, b) Modificada con el software Image J. con Threshold. Magnificación 50x

En la siguiente Figura nos muestra la variedad Golden Delicious, en la cual podemos observar que hay una gran variabilidad de formas de poros, heterogéneamente distribuidos y con un número menor que las demás variedades estudiadas.

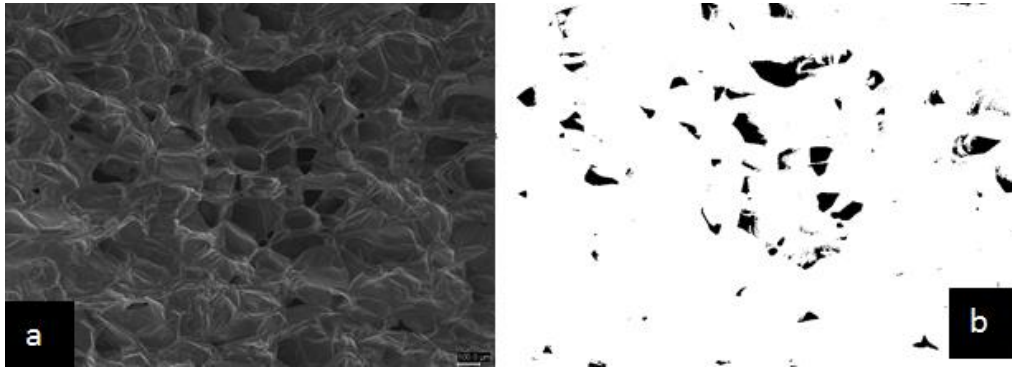


Figura 14. Imagen obtenida con ESEM en un corte longitudinal con una escala 100 μm de la variedad Golden Delicious (Chihuahua): a) Imagen con ESEM, b) Modificada con el software Image J. con Threshold. Magnificación 50x

En el Cuadro 4 se muestran los resultados del análisis de imagen en ESEM para evaluar la porosidad de cada una de las variedades de este estudio. Las manzanas se encontraban en un estado de maduración para consumo.

Cuadro 4. Valores promedio y desviación estándar de la Porosidad de cada variedad de manzana.

	Golden D C	Granny S	Gala W.	Red D.
Número de Poros	51.44± 45.04	63.66±45.47	68±56.7	94.11±65.30
Densidad de Poro mm^{-2}	2.23±1.15	3.34±1.67	2.89±1.37	3.20±1.58
Fracción de Área ocupada	0.04±0.02	0.07±0.04	0.05±0.02	0.06±0.03

*A través de una análisis ANOVA se observó que no existe diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los valores mostrados en la Cuadro 4 se puede observar que en el parámetro de número de poros la manzana que tiene un valor mayor es la var. Red Delicious pero la var. Golden Delicious (Chihuahua) es la que obtuvo un valor menor que las demás manzanas. En cambio en la densidad de poro la var. Granny Smith fue la que tuvo un valor mayor mientras que el valor menor fue Golden Delicious. En lo que respecta al parámetro de fracción de área ocupada la variedad que obtuvo un mayor valor fue la var. Red Delicious y con menor valor la var. Golden Delicious.

Al realizar un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) se encontró que no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores de cada parámetro entre cada variedad debido a que mostraron una amplitud de rangos muy grande.

En algunos trabajos como Nieto et al. (2004) reportaron una porosidad del 24% en la variedad Granny Smith. Cuantificaron a través de los valores de ρ_b y ρ_s que son la densidad aparente (ρ_b) que la determinaron midiendo el volumen de la muestra por el desplazamiento, usando un picnómetro con agua como líquido de referencia. La densidad de sólido-líquido (ρ_s) la obtuvieron midiendo la pulpa de la muestra, donde se homogeneiza a fin de eliminar los poros y el aire (Nieto et al. 2004). En otro estudio analizaron la porosidad de la variedad Elstar en diferentes secciones de la manzana hasta el hueso. Lo realizó mediante imágenes con MEBA. Donde reportó los siguientes porcentajes en el exterior de porosidad de 16.1, en medio 26.7% y en el interior 31.7%. (Schulze et al. 2012).

6.5 Microscopio Confocal de Barrido laser (CLSM)

En la figura 15a se muestra la var. Golden Delicious donde observamos que sus células son redondas y pequeñas lo que confirma los datos mostrados en el cuadro 3. De la misma forma la Figura 15d se muestra que la var. Red Delicious tiene células igual redondeadas y pequeñas, además de que las células se encuentran muy juntas unas con otras. También con la fijación del calcofluor nos proporcionó una mejor definición de la pared celular de esta variedad. En la variedad Gala Washington observamos en la Figura 15b que las células son más alargadas de y que se encuentran muy juntas unas con otras sin tantos espacios intercelulares, pero las células de esta variedad son más grandes que la Red Delicious.

En la manzana Granny Smith encontramos en la figura 15c que la forma y el tamaño de las células son irregulares y se encuentra dispersas en el tejido por lo que tiene más espacios intercelulares que las anteriores. Con estas conclusiones de la variedad Granny Smith se validan los datos mostrados en el Cuadro 3 y obtenidos de las Figuras 7, 8, 9 y 10 donde definimos a esta manzana con células más grandes pero menos redondas.

Por último la variedad Golden observada en la Figura 16a tiene una buena definición de la pared celular con la tinción pero tiene ciertos puntos o cúmulos, la forma que predomina en las células es redonda y se encuentran encimadas unas con otras.

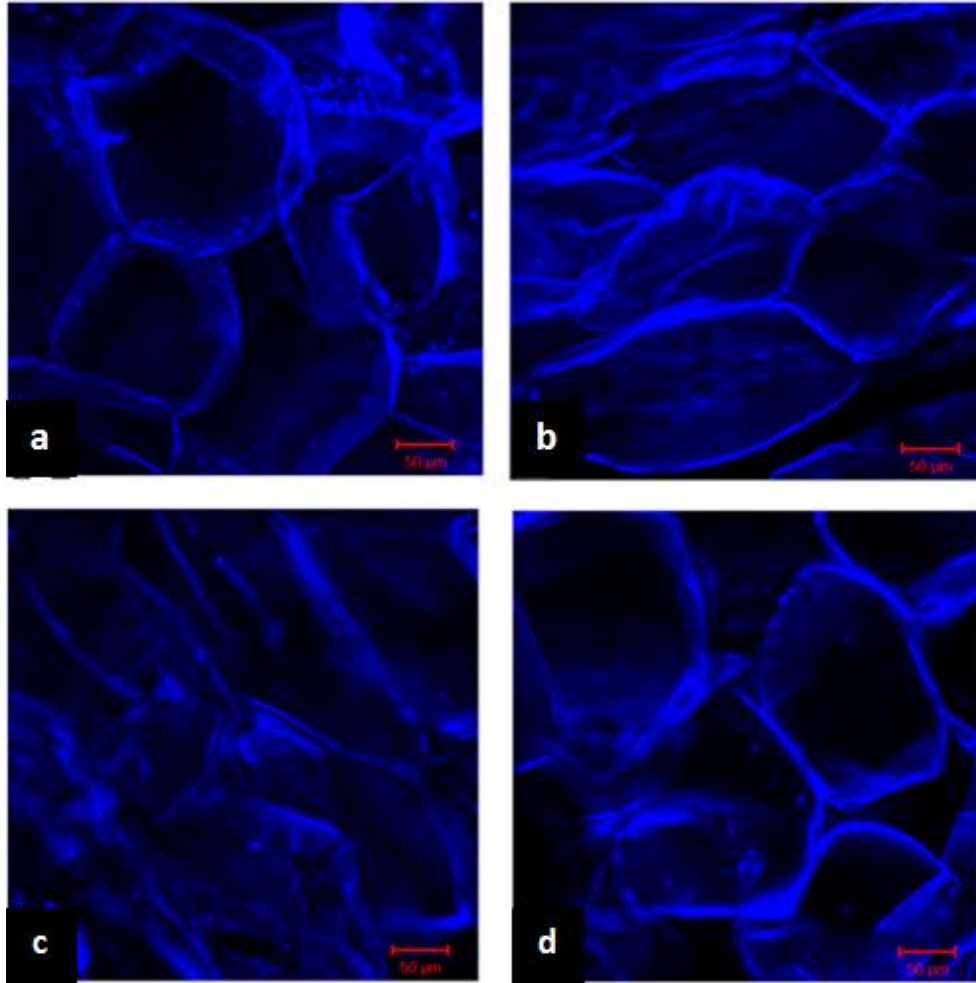


Figura 15. Imágenes de CLSM que muestran la autofluorescencia de la pared celular de cada variedad con escala 50µm: a) Golden Delicious (Chihuahua), b) Gala Washington c) Granny Smith y d) Red Delicious

En un estudio que tomaron imágenes con (CLSM) y reportaron que las células de Golden Delicious son pequeñas pero con mayor área de los espacios intercelulares que la variedad Champion. Además que las células de estas variedades presentaron una forma elipsoidal (Pieczywek et al. 2012). Otros investigadores como Cen et al. (2013) trabajaron con las variedades Granny Smith y Golden Delicious, donde observaron en sus imágenes en CLSM que el tejido de la variedad Granny Smith tiene espacios intercelulares más estrechos que los de la variedad Golde Delicious. También reportaron la variedad que tiene las células más grandes es Granny Smith. En otro estudio aislaron las células de ciertas variedades de manzanas y las observaron en CLSM. Reportaron que la variedad

Scifresh/Jazz tiene células angulares y más grandes mientras que la variedad Sciros/Pacific Rose que tiene células más redondas (McAtee et al. 2009).

6.6 Análisis de Componentes Principales (PCA)

El Análisis de Componentes Principales (PCA, Principal Component Analysis) es una técnica de análisis matemático multivariado que permite establecer correlaciones entre diferentes variables y agrupar muestras empleando los valores de las variables utilizadas (Ballabio et al. 2012). El PCA muestra la estructura de datos multivariantes proyectándolos en un hiperespacio reducido definido por los primeros componentes principales significativos. Estas son combinaciones lineales de las variables originales con el primer componente principal que tiene la varianza más grande, el segundo componente principal la segunda mayor varianza, y así sucesivamente. El PCA se llevó a cabo en las cuatro variedades de manzanas estudiadas en esta tesis, cada una descrita por los 16 parámetros que se evaluaron por medio de una matriz de correlación de Pearson en el Cuadro 6. Las únicas variables que no se ocuparon fueron las de color debido a que las manzanas que se estudiaron tienen colores diferentes, además de que la tesis se enfocó en un estudio de manzanas en estado de maduración de consumo. Pero esta variable de color es ocupada para determinar la calidad de la manzana pero se realiza en diferentes estados de almacenamiento.

Cuadro 5. Matriz de correlación de Pearson de todas las variables estudiadas.

Variables	AR	ÁREA	PERÍMETRO	REDONDEZ	DF	C	F	AT	SST	RPI	PESO	VD	DA	DP	FAO	# DE POROS
AR	1															
ÁREA	0.7767	1														
PERÍMETRO	0.8230	0.9967	1													
REDONDEZ	-0.9993	-0.7833	-0.8280	1												
DF	0.8370	0.9947	0.9991	-0.8429	1											
C	-0.9416	-0.6417	-0.7020	0.9287	-0.7079	1										
F	-0.0531	0.5839	0.5223	0.0457	0.4977	0.1577	1									
AT	0.9141	0.9020	0.9321	-0.9076	0.9299	-0.8989	0.2834	1								
SST	-0.6050	-0.3836	-0.4003	0.6304	-0.4375	0.3497	0.2543	-0.3015	1							
RPI	0.9398	0.9247	0.9526	-0.9376	0.9547	-0.8853	0.2730	0.9923	-0.4119	1						
PESO	-0.4261	0.2037	0.1390	0.4270	0.1054	0.4264	0.8995	-0.0470	0.6195	-0.0923	1					
VD	-0.3957	0.2111	0.1518	0.4002	0.1161	0.3653	0.8828	-0.0018	0.6716	-0.0580	0.9948	1				
DA	-0.0560	-0.1911	-0.2037	0.0249	-0.1677	0.3157	-0.3362	-0.3822	-0.7594	-0.2665	-0.4787	-0.5660	1			
DP	0.0894	0.6963	0.6393	-0.0993	0.6190	0.0459	0.9873	0.3952	0.1120	0.3973	0.8186	0.7993	-0.2749	1		
FAO	0.3641	0.8688	0.8287	-0.3729	0.8134	-0.2239	0.9089	0.6282	-0.0583	0.6362	0.6484	0.6397	-0.2811	0.9601	1	
# DE POROS	-0.7064	-0.1104	-0.1833	0.7026	-0.2116	0.7247	0.7424	-0.3991	0.6241	-0.4299	0.9321	0.9049	-0.2488	0.6344	0.3959	1

Donde AR: relación de aspecto, DF: Diámetro de Feret, C: Circularidad, AT: acidez titulable, SST: Sólidos solubles totales, RPI: Índice de madurez, VD: Volumen desplazado, DA: Densidad aparente, DP: Densidad de poro, FAO: Fracción de área ocupada y # de Poro: Numero de poros. Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación $\alpha=0.05$

En esta matriz podemos observar las variables que tienen correlaciones altas con valores alrededor de 0.9, sin embargo también podemos observar variables con valores de alrededor 0.7. La relación de aspecto está fuertemente correlacionada con redondez, circularidad, acidez titulable y RPI. También existe una correlación AR con área, perímetro, diámetro de Feret y el número de poros. En lo que respecta al área tiene una fuerte correlación con el perímetro, diámetro del Feret, acidez titulable y RPI. Con una correlación menor tenemos a la relación de aspecto (AR), redondez, densidad de poro y fracción de área ocupada. Para el perímetro existe una fuerte correlación con área, diámetro del feret, AT y RPI. También existe una correlación con AR, redondez, circularidad, diámetro de poro, fracción de área ocupada. En lo que se refiere a la redondez tiene una fuerte correlación con AR, circularidad, diámetro de Feret, AT y RPI. Con una menor correlación en área, perímetro, diámetro de Feret y número de poros. Para el diámetro de Feret las variables con fuerte correlación son área, perímetro, AT y RPI, y una menor correlación fue encontrada para AR, redondez, circularidad, densidad de poro y fracción de área ocupada. En referencia a la circularidad las variables con una fuerte correlación son AR y redondez. Además tiene una correlación con perímetro, diámetro de feret, AT, RPI y número de poros. Como podemos observar los parámetros morfométricos están correlacionados entre ellos y ocasionalmente con parámetros fisicoquímicos y de porosidad. Para la firmeza encontramos que tiene una fuerte correlación con el peso y fracción de área ocupada, mientras que con una correlación menor se encuentra el volumen desplazado. En la acidez titulable observamos que tiene una fuerte correlación con los parámetros morfométricos (AR, área, perímetro, redondez, diámetro de Feret) aunque con menor correlación el parámetro de circularidad. Además tiene una correlación fuerte con RPI. En lo que se refiere para los sólidos solubles totales encontramos que sólo tiene una correlación débil con la densidad aparente y con el número de poros. Para el RPI encontramos que tiene una fuerte correlación con los parámetros morfométricos (AR, área, perímetro, redondez, diámetro de Feret y circularidad). Además existe una fuerte relación con AT y el peso. En lo que respecta al peso tiene una fuerte correlación con la firmeza, volumen desplazado y número de poros.

Mientras que con menor correlación está la variable del fracción de área ocupada. Para el volumen desplazado observamos que tiene una fuerte correlación con el peso y el número de poros, además tiene una menor correlación con la fracción de área ocupada y la firmeza. En lo que se refiere a la densidad aparente no tiene una fuerte correlación con ninguna de las variables pero existe una pequeña relación con los sólidos solubles totales. En la densidad del poro encontramos correlaciones con el área, perímetro, diámetro de Feret y fracción de área ocupada. Para el número de poros observamos que tiene una mayor correlación con el volumen desplazado y peso. Mientras que tiene un correlación menor pero existente con AR, redondez, circularidad y AT. En lo que respecta a la fracción de área ocupada tenemos que tiene una correlación fuerte con la firmeza y de menor correlación con área, perímetro, diámetro de Feret, peso volumen desplazado, densidad aparente y densidad de poro.

Los parámetros morfométricos tienen una correlación directamente proporcional con la acidez Titulable.

El RPI está fuertemente relacionado con los parámetros morfométricos eso es debido a que el RPI toma en cuenta la firmeza que a su vez está relacionada con la forma de las células. Si una célula como el cultivar Granny Smith que son muy grandes pero no tan redondas tiene una firmeza mucho menor que las que tienen unas células de forma más redonda y pequeñas. En lo que respecta al parámetro de Firmeza está fuertemente relacionado con los parámetros de porosidad debido a que si el fruto tiene menor porosidad este tendrá una mayor firmeza porque la porosidad es una fracción de hueco vacío el cuál puede absorber líquido.

En lo que se refiere a los parámetros de peso y volumen desplazado están correlacionados con la porosidad donde si la manzana tiene mayor peso y volumen desplazado también tiene un mayor número de poros.

En un espacio bidimensional (Fig. 16), se muestra la proyección de los datos con los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) que explican 89.86% de la varianza total. En el gráfico de componentes principales, las variedades Granny Smith y Red Delicious muestran que son cultivares más diferentes que los otros cultivares estudiados. Esto debido a que tienen parámetros que la identifican como el tamaño y la forma de las células. Así como el parámetro del análisis fisicoquímico del RPI que es representativo de estas variedades. En lo que respecta a los otros cultivares como Gala Washington y Golden Delicious se asemejan en los valores de redondez y área de las células.

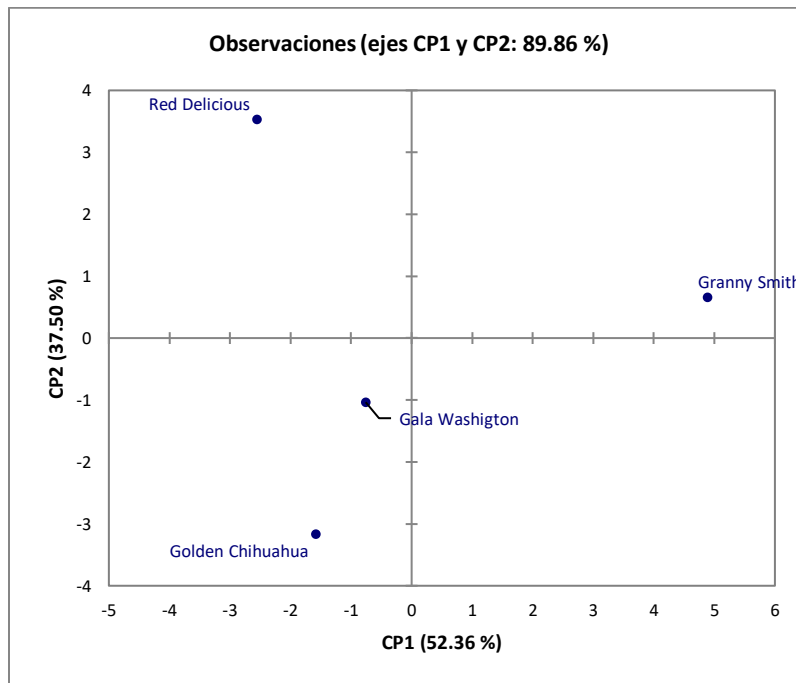


Figura 166. Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variedades de manzanas estudiadas. Donde CP1: Primer componente principal y CP2: Segundo componente principal

En el Cuadro 6 muestra el porcentaje de contribución, las cargas factoriales y los cosenos cuadrados de las variables, así como sus valores propios, porcentaje de varianza y acumulado calculado a partir del PCA. En este cuadro podemos observar las variables que tiene una contribución importantes para el CP1 (área, perímetro, diámetro de Feret, Acidez Titulable, RPI), mientras que la firmeza, peso, volumen desplazado y número de poros tienen una mayor contribución en el CP2 y bajas cargas factoriales en el CP1. Para el CP3 las variables con mayor contribución son sólidos solubles totales, densidad aparente y circularidad y bajas cargas factoriales en el CP1. En lo que respecta a los valores propios la suma del CP1 y del CP2 un valor de 14.378 de las 16 variables analizadas, mientras que la suma del porcentaje de la varianza de los dos componentes principales fue de 89.86% lo cual estadísticamente aceptable (Jolliffe, 2002)

Cuadro 6. Datos relevantes del PCA

VARIABLES	Contribuciones de las variables			Cargas factoriales			Cosenos cuadrados de las variable		
	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
AR	9.8148	2.8845	0.2869	0.9068	-0.4160	-0.0682	0.8223	0.1731	0.0047
ÁREA	11.1534	0.7913	1.1164	0.9667	0.2179	0.1346	0.9344	0.0475	0.0181
PERÍMETRO	11.5645	0.3881	0.4841	0.9843	0.1526	0.0886	0.9689	0.0233	0.0079
REDONDEZ	9.8548	2.8896	0.0618	-0.9086	0.4164	0.0317	0.8256	0.1734	0.0010
DF	11.6132	0.2378	0.7887	0.9864	0.1194	0.1131	0.9729	0.0143	0.0128
C	7.9182	2.9790	9.7338	-0.8145	0.4228	0.3973	0.6634	0.1787	0.1579
F	1.6551	13.7239	2.3356	0.3724	0.9074	0.1946	0.1387	0.8235	0.0379
AT	11.3077	0.0248	3.1546	0.9733	-0.0386	-0.2262	0.9473	0.0015	0.0512
SST	2.3147	6.0702	27.2412	-0.4404	0.6035	-0.6647	0.1939	0.3642	0.4419
RPI	11.7098	0.1117	0.7567	0.9905	-0.0818	-0.1108	0.9810	0.0067	0.0123
PESO	0.0018	16.6595	0.0158	-0.0124	0.9998	-0.0160	0.0002	0.9996	0.0003
VD	0.0014	16.4417	0.8242	0.0106	0.9932	-0.1156	0.0001	0.9865	0.0134
DA	0.5352	3.6449	45.4041	-0.2117	-0.4677	0.8582	0.0448	0.2187	0.7365
DP	2.9606	11.4550	3.9860	0.4980	0.8290	0.2543	0.2480	0.6873	0.0647
FAO	6.1962	7.2773	2.7280	0.7205	0.6608	0.2104	0.5191	0.4366	0.0442
# DE PORO	1.3988	14.4207	1.0821	-0.3423	0.9302	0.1325	0.1172	0.8653	0.0176
VP	8.3779	6.0001	1.6220	8.3779	6.0001	1.6220	8.3779	6.0001	1.6220
(%) Varianza	52.3616	37.5007	10.1376	52.3616	37.5007	10.1376	52.3616	37.5007	10.1376
Acumulado	52.3616	89.8624	100.0000	52.3616	89.8624	100.0000	52.3616	89.8624	100.0000

Donde AR: relación de aspecto, DF: Diámetro de Feret, C: Circularidad, AT: acidez titulable, SST: Sólidos solubles totales, RPI: Índice de madurez, VD: Volumen desplazado, DA: Densidad aparente, DP: Densidad de poro, FAO: Fracción de área ocupada, # de Poro: Numero de poros, CP1: Primer componente principal, CP2: Segundo componente principal y CP3: tercer componente principal. Los valores en negrita corresponden para cada variable al factor para lo cual el coseno cuadrado es el mayor

En el Cuadro 7 se muestran los valores del coseno cuadrado para cada cultivar estudiado. Como podemos observar las manzanas Golden Delicious y Red Delicious dan una importante contribución en CP2, mientras que para el cultivar Granny Smith lo es para el CP1 y en lo que respecta a la manzana Gala Washington da una importante contribución al CP3.

Cuadro 7. Cosenos cuadrados de las observaciones

	CP1	CP2	CP3
Golden Delicious			
Chihuahua	0.1764	0.7050	0.1186
Granny Smith	0.9774	0.0179	0.0047
Red Delicious	0.3385	0.6497	0.0118
Gala Washigton	0.0940	0.1756	0.7304

CP1: Primer componente principal, CP2: Segundo componente principal y CP3: tercer componente principal.

Los valores en negrita corresponden para cada variable al factor para lo cual el coseno cuadrado es el mayor

En algunos estudios de manzana encontraron que hay una correlación positiva el área del poro con el perímetro y el diámetro de Feret de las células de las variedades Fuji, Golden Delicious y Jonagold (Hou et al. 2016). Mientras Ting et al. (2016) en un estudio de 4 variedades de manzana durante un almacenamiento prolongado encontró una similitud en el parámetro de porosidad entre las variedades Golden Delicious y Fuji, en el parámetro de textura encontró similitudes entre las variedades Jazz y Fuji. Mientras que en las propiedades morfológicas y de porosidad las variedades que se relacionaron fueron Golden Delicious y Braeburn. A partir de estos resultados concluyeron que la porosidad disminuye a medida que aumenta la cantidad de fuerza necesaria para romper la cáscara de la manzana y la carne.

7. Conclusiones

- En los parámetros fisicoquímicos se encontró que la variedad Granny Smith presenta un valor alto en la acidez titulable, sin embargo, la variedad que tuvo valores más altos en peso y el volumen desplazado fue la Red Delicious. En los demás parámetros todas las variedades estudiadas se mantenían en un mismo rango.
- Las evaluaciones realizadas en las diferentes variedades de manzanas mediante microscopía de luz, microscopía confocal y análisis de imágenes permitieron determinar la forma cualitativa y cuantitativa de la estructura de las células de manzana. Este análisis mostró que de las variedades estudiadas la manzana Granny Smith es la variedad que tiene las células de gran tamaño pero con formas irregulares y poco circulares.
- Los estudios de microscopía de barrido de electrones en modo ambiental nos mostró la distribución de porosidad en las variedades estudiadas, encontrando que la manzana Red Delicious presenta un mayor número de poros mientras que la variedad Golden Delicious tiene una mayor densidad de poro con respecto a todas las variedades estudiadas.
- Con el análisis de componentes principales se logró clasificar las manzanas con respecto a las variables estudiadas, encontrando que los cultivares con características dispersas son la Red Delicious y Granny Smith, mientras que las manzanas que son más semejantes son la Golden Delicious y Gala Washington. Además se pudo correlacionar características macro con las micrométricas en cada cultivar.

8. Referencias

1. Abbott, J., Saftner, R., Gross, K., Vinyard, B., Janick, J. (2004). Consumer evaluation and quality measurement of fresh-cut slices of “Fuji”, “Golden Delicious”, “GoldRush” and “Granny Smith” apples. *Postharvest and Technology*. 33, 127-140.
2. Afshari-Jouybari, H., Farahnaky. (2011). Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry. *Journal of Food Engineering*. 106, 170-175
3. Aguilera, M., Stanley, W. (1999). *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*. 2a. Edition: Food Engineering Series. Gustavo V. Barbosa-Cánova edits. An Aspen Publication (pp. 1-87)
4. Aguilera, J., Stanley, D., Baker, K. (2000). New dimensions in microstructure of food products. *Trends in Food Science and Technology*. 11, 3-9.
5. Allan-Wojtas, P., Stanford, K., McRae, K., Carbyn. (2003). An Integrated Microstructural and Sensory Approach to Describe Apple Texture. *Agriculture and Agri-Food Canada*. 3, 381-390.
6. Alonso-Hernández, J. (2016). Diseño y construcción de un sistema de visión por computadora para la evaluación de la calidad de alimentos. Tesis de Ingeniería Bioquímica. Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
7. Aprajeeta, J., Gopirajah, R., Anandharamkrishnan, C. (2015). Shrinkage and porosity effects on heat and mass transfer during potato drying. *Journal of Food Engineering*. 144, 119-128.
8. Arzate-Vázquez, I. (2005). Evaluación del proceso de maduración de aguacate variedad Hass (*Persea americana Mill*) mediante análisis de imagen. Tesis de Ingeniería Bioquímica. Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
9. Ballabio, D., Consonni, V., Costa, F. (2012). Relationship between apple texture and rheological parameters by means of multivariate analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 111, 28-33.

10. Blasco, J., Aleixos, N., Moltó, E. (2007). Computer vision detection of peel defects in citrus by means of a region oriented segmentation algorithm. *Journal of Food Engineering*. 81, 535-543
11. Bessadok, A., Langenvin, D., Gouanvé, F., Chappey, C., Roudesli, S., Marais, S. (2004). Study of water sorption on modified Agave fibres. *Carbohydrate Polymers*. . 76, 74-85.
12. Bhosale, A., Sundaram, K. (2014). Firmness prediction of the apple using capacitance measurement. *Procedia Technology*. 12, 163-167.
13. Bretzner, L. Lindeberg, T. (1998). Feature Tracking with Automatic Selection of Spatial Scales. *Computer Vision and Image Understanding*. 71, 385-392
14. Calvo, G. (2002). Efecto del 1-Metilciclopropeno (1-Mcp) en Manzanas Cv. Red Delicious cosechadas con tres estados de madurez y conservadas en frío convencional y atmósfera controlada. Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 9-24.
15. Cárdenas-Pérez, S. (2016). Estudio de las propiedades nanomecánicas a nivel celular de frutos climatéricos y su correlación con parámetros fisicoquímicos, bioquímicos y microestructurales. Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
16. Cardenas-Pérez, S., Méndez-Méndez, J., Chanona-Pérez, J., Zdunek, A., Güemes-Vera, N., Calderón Domínguez, G., Rodríguez- González, F. (2017) Prediction of the nanomechanical properties of Apple tissue during its ripening process from its firmness, color and microstructural parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 39, 79-87.
17. Cen, H., Renfu, L., Mendoza, F., Beaudry R. (2013). Relationship of the optical absorption and scattering properties with mechanical and structural properties of apple tissue. *Postharvest Biology and Technology*. 85, 30-38.
18. Chanona-Pérez, J. (2014). Visión artificial para mejorar la calidad. Disponible en <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/69578-vision-artificial-mejorar-la-calidad->. Revisado el 29 de Febrero del 2016.

19. Chen, X., Yu, C., Lin, S., James, B. (2006) In Situ ESEM Examination of Microstructural Changes an Apple Tissue Sample Undergoing Low-Pressure Air-Drying followed by Wetting. *Drying Technology*.24, 965-972.
20. Clermont, G., Zenker, S. (2014).The inverse problem in mathematical biology. *Mathematical Biosciences*. 260,11-15
21. Costa, F., Cappellin, L., Longhi, S., Guerra, W., Magnago, Porro, D., Soukoulis, C., Salvi, S., Velasco, R., Biasioli, F., Gasperi, F. (2011) Assesment of apple (*Malus x domestica* Borkh.) fruit texture by a combined acoustic-mechanical profiling strategy. *Portharvest Biology and Technology*. 61, 21-28.
22. Devore, J. (2008). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. México Cengage, Learning.
23. Dobrzański, B., Rybczynski, R. (2002). Colour change of apple as a result of storage, shelf-life, and bruising. *International Agrophysics* 16, 261–268
24. Du, C., Sun, D. (2006). Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: a review. *Journal food Engineeering*. 72, 39-55.
25. Du, C., Sun, D. (2004). Recent development in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*. 15, 230-249.
26. Dürrenberger, M., Handschin, S., (2000). Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CSLM). *Technol*. 34, 11-17
27. Facello, V., Larese, M., Spada, M. (2003). Detección de Bordes por Derivadas Primera y Segunda. Cátedra de Captura y Procesamiento Digital de Señales e Imágenes. Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas- Universidad Nacional de Litoral.1-7
28. Fernández- Lara, R., Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F., González-Miret, M., Villar-Martínez, A., Dávila-Ortiz, G., Heredia, F. (2015). Assessment of the differences in the phenolic composition and color characteristics of new strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars by HPLC-MS and Imaging Tristimulus Colorimetry. *Food Research International*. 76, 645-653.

29. Fernández Troyano Juan C. "Simulación y herramientas de análisis de imagen. Aplicación en Biología Celular." Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Cantabria. Junio-2014.
30. Fernández S., Osorio, S., Heredia, A. (1999). Monitoring and visualizing cuticles by confocal laser microscopy. *Plant Physiol. Bioche.* 37, 789-794.
31. Garrido, J., Lozano, J., Genovese, D.(2015). Effect of formulation variables on rheology, texture, colour, and acceptability of apple jelly: Modelling and optimization. *LWT-Food Science and Technology.* 62, 325-332.
32. Garrido-Novell, C., Pérez-Marin, D., Amigo, J., Fernández-Navales, J. (2012). Grading and color evolution of apples using RGB and hyperspectral imaging vision cameras. *Journal of Food Engineering.* 113, 281-288.
33. Giraldo, G. (2006). El efecto del tratamiento de impregnación a vacío en la respiración de frutas (manzana, fresa, melocotón y sandía) mínimamente procesadas. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 13, 21-25.
34. Gomez-Ramírez, J., Sanz.(2013). On the limitations of standard statistical modeling in biological systems: A full Bayesian approach for biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 113, 80-91
35. Guo, Z., Huang, W., Peng, Y., Chen, Q., Ouyang, Q. (2016).Color compensation and comparison of shortwave near infrared and long wave near infrared spectroscopy for determination of soluble solids content of "Fuji" apple. *Postharvest Biology and Technology.* 115, 81-90.
36. Hernandez-Hernandez, J., García- Mateos, G., González-Esquivá, J., Escarabajal-Henarejos, D., Ruiz-Canales, A., Molina-Martínez, J. (2016). Optimal color space selection method for plat/soil segmentation in agricultura. *Computers and Electronics in Agriculture.* 122, 124-132.
37. Hou, J., Sun, Y., Chen, F., Yu, L., Mao, Q., Wang, L., Guo, X., Liu, C. (2016). Analysis of Microstructures and Macrottextures for Different Apple Cultivars Based on Parenchyma Morphology. *Microscopy Research and Technique.* 79, 304-312.

38. <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=1556> (Consultada el 29 de marzo del 2017)
39. http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/S (Consultada el 10 de enero de 2016)
40. [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Manzana%20\(abr%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Manzana%20(abr%202014).pdf) Financiera Nacional de Desarrollo. Abril 2014. (Consultado 2015)
41. http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana.htm (Consultada el 10 de enero de 2016).
42. http://www.infoserca.gob.mx/frutasnacional/fna_ca1.asp (Consultada el 10 de enero de 2016)
43. <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab> (Consultado el 31 de marzo de 2016)
44. Iglesias, I., Echeverría, G., Soria, Y.(2008) Differences in fruit color development anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight “Gala” Apple strains. *Scientia Horticulturae*. 119, 32-40
45. Jolliffe, I. T. (2002). *Principal component analysis* (2nd ed.). New York: Springer
46. Kubik, L’ubomir. (2013). Evaluation of apple microstructure. *Journal on Processing and Energy in Agruculture*. 17, 7-11.
47. Lancaster, J., Grant, J., Lister, C., Taylor, M. (1994). Skin Color in Apples Influence of Copigmentation and Plastid Pigments on Shade and Darkness of Red Color In Five Genotypes. *J. Amer. Soc. Hort*. 119, 63-69.
48. Lewicki, P.P., Pawlak G. (2005). Effect of Mode Drying on Microstructure of Potato. *Drying Technology*. 23, 847-869.
49. Liu, W., Han, J. (2013). The optimal Mexican hat wavelet filter de-noising method based on cross-validation method. *Neurocomputing*. 108, 31-35.
50. López-Cruz, L., Ramírez-Arias, A., Rojano-Aguilar, A. (2005). Modelos matemáticos de hortalizas en invernadero: trascendiendo la contemplación de la dinámica de cultivos. *Revista Chapingo. Serie Horicultura*. 11, 257-267.

51. Ma, Q., Rudolph, V. (2006). Dimensional Change Behavior of Caribbean Pine using an Environmental Scanning Electron Microscope. *Drying Technology*. 24, 1397-1403
52. Madiouli, J., Sghaier., Lecomte, D.(2012). Determination of porosity change from shrinkage curves during drying of food material. *Food and Bioproducts Processing*. 90, 43-51.
53. Maguire, K., Lang, A., Banks, N., Hall, A., Hopcroft, D., Bennett, R. (1999). Relationship between water vapour permeance of apples and micro-cracking of the cuticle. *Porthaverst Biology and Technology*. 17, 89-96.
54. Mancera-López, M., Soto-Parra, J., Sánchez-Chávez, E., Yáñez-Muñoz, R., Montes-Domínguez, F., Balandrán-Quintana, R. (2007). Caracterización mineral de manzana "Red Delicious" y "Golden Delicious" de dos países productores. *Tecnociencia Chihuahua. Alimentos*. Vol. 1, No. 2, 6-17
55. Mayor, L., Silva, M.A., Sereno, M. (2005). Microstructural Changes during Drying of Apple Slices. *Drying Technology*.23, 2261-2276.
56. McAtee, P., Hallett, I., Johnston, J., Schaffer, R. (2009). A rapid method pf fruit cell isolation for size and shape measurements. *Plants Methods*. 5, 1-7.
57. Medenhall, W., Beaver, B., Beaver, B. (2010). *Introducción a la probabilidad y estadística*. México. Cengage, Learning.
58. Mendoza, F., Lu, R., Ariana, Diwan., Cen, H., Bailey, B. (2011) Integrated spectral and image analysis of hyperspectral scattering data for prediction of apple fruit firmness and soluble solids content. *Portharvest Biology and Technology*. 62, 149-160.
59. Mendoza, F., Lu, R., Cen, H.(2104). Grading of apples base on firmness and soluble solids contenr using Vis/SWNIR spectroscopy and spectral scattering techniques. *Journal of Food Engineering*. 125, 59-68.
60. Mohsenin, N. (1978). *Physical properties of plant and animal materials*. Gordon and Breach, Science Publishers, Inc. Cap. 3.3 Volume and Density, 66-67
61. Montgomery, D. (2013). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa: Wiley

62. Montes Segura Jose E. (2015). Cambios Físicoquímicos y estructurales en el mango 'Manila' (*Mangifera indica* L.) y pectinas del pericarpio durante su maduración. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de Instituto Politécnico Nacional, México.
63. Ng, J., Schröder, R., Sutherland, P., Hallett, I., Hall, M., Prakash, R., Smith, B., Melton, L., Johnston, J. (2013). Cell wall structures leading to cultivar differences in softening rates develop early during apple (*Malus x domestica*) fruit growth. *BMC Plant Biology*. 13, 1-16
64. Nieto, A., Salvator, D., Castro, M., Alzamora, S. (2004) Structural changes in Apple tissue during glucose and sucrose osmotic dehydration: shrinkage, porosity, density and microscopic features. *Journal of Food Engineering*. 61, 269-278
65. Oey, M.L., Vanstreels, E., De Baerdemaeker, J., Tijssens, E., Ramon, H., Hertog, M.L.A.T.M., Nicolai B. (2007). Effect of turgor on micromechanical and structural properties of apple tissue: A quantitative analysis. *Postharvest Biology and Technology* 44, 240–247.
66. Ornelas-Paz, J., Yahaia, E., Ramírez-Bustamante, N., Pérez Martínez, J., Escalante-Minakata, M., Ibarra-Junquera, V., Acosta-Muñiz, C., Guerrero-Prieto, V., Ochoa-Reyes, E. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*. 138, 372-381.
67. Osterman, H. (2009). The next Step in Near Infrared Fluorescence: IRDye® QC-1 Dark Quencher. LI-COR. 1-7.
68. Pedreschi, F., Mery, D., Mendoza, F., Aguilera, J., (2004). Classification of potato chips using pattern recognition. *Journal of Food Science*. 69, 1-5.
69. Perea- Flores, M., Chanona-Pérez, J., Garibay-Febles, V., Calderón Domínguez, G., Terrés-Rojas, E., Mendoza- Pérez, J., Herrera- Bucio, R. (2011) Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant. *Industrial Crops and Products*. 34, 1057-1065.

70. Pere Flores M. (2011). Efecto del secado por lecho fluidizado en la estructura de semillas de *Ricinus communis* y en la extracción de su aceite como fuente alternativa de biocombustible. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de Instituto Politécnico Nacional, México
71. Pieczywek, P., Zdunek, A. (2012). Automatic classification of cells and intercellular spaces of apple tissue. *Computer and Electronics in Agricultural*. 81, 72-78.
72. Ramírez-Hernández, A. (2012). Procesamiento de imágenes para la evaluación de la estructura de la miga de diferentes tipos de pan blanco consumidos en México. Tesis de Ingeniería Bioquímica. Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
73. Ramos, N., Brandao, C., Silva, M. (2003) Structural Changes During Air Drying of Fruits and Vegetables. *Food Sci Int*. 9, 201-205
74. Ramos, I., Silva, C., Sereno, M., Aguilera, J. (2004) Quantification of microstructural changes during first stage air drying of grapes tissue. *Journal of Food Engineering*. 62, 159-164.
75. Rizzolo, A., Vanoli, M., Spinelli, L., Torricelli, A. (2010). Sensory characteristics quality and optical properties measured by time-resolved reflectance spectroscopy in stored apples. *Postharvest Biology and Technology*. 58,1-12. 94, 89-96.
76. Rowe, P., Künnemeyer, R., McGlone, A., Talele, S., Martinsen, P., Seelye, R. (2014). Relationship between tissue firmness and optical properties of Royal Gala apples from 400 to 1050nm. *Postharvest Biology and Technology*.
77. Sánchez-Pardo, M., Ortiz-Moreno, A., García-Zaragoza, F., Necochea-Mondragón, H., Chanona-Pérez, J. (2012). Comparison of pound cake baked in a two cycle microwave-toaster oven and in conventional oven. *LWT-Food Science and Technology*. 46, 356-362.
78. Santacruz-Vázquez, C., Santacruz-Vázquez, V., Chanona- Pérez, J., Jaramillo-Flores, M. E., Welti-Chanes, J., Gutierrez-López, G. (2008). Fractal Theory Applied to Food Science. 24, 1-13

79. Schulze, B., Peth, S., Hubbermann, E., Schwarz, K. (2012). The influence of vacuum impregnation on the fortification of apple parenchyma with quercetin derivatives in combination with pore structures X-ray analysis. *Journal of Food Engineering*. 109, 380-387.
80. Stoke, D. J. (2003). Recent advances in electron imaging image interpretation and applications environmental scanning electron microscopy. The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond A*. 361, 2771-2787
81. Thomas, M., Guillemin, F., Guillon, F., Thibault, J. (2003). Pectins in the fruits of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Carbohydrate Polymers*. 53, 361-372.
82. Ting, V., Silcock, P., Bremer, P., Biasioli, F. (2016). X-Ray Micro-Computer Tomographic Method to Visualize the Microstructure of Different Apple Cultivars. *Journal of Food Science*. 78, 1735- 1742.
83. Varela, P., Salvador, A., Fiszman, S. (2007) Changes in Apple tissue with storage time: Rheological, textural and microstructural analyses. *Journal Of Food Engineering*. 78, 622-629.
84. Vasquez-Cacedo, A. L., Sruakonstamsiri, P., Carle, R., & Neidhart, S. (2005). Accumulation of all-trans β -carotene and its 9-cis and 13-cis stereoisomers during postharvest ripening of nine Thai mango cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4827-4835.
85. Vazquez-Cruz, M., Espinosa-Calderón, A., Jiménez-Sánchez, R., Guzmán-Cruz, R. (2014). *Mathematical Modeling of Biosystems. Biosystems engineering: Biofactories for Food Production in the century XXI*. México. Springer.
86. Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P., Lemus-Mondaca, R., Di, K. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*. 132, 51-59.
87. Vélez-Rivera, N. (2013). Estudio de la madurez y calidad del mango (*Mangifera indica* L.) 'Manila' mediante sistemas de visión por computadora RGB e

- hipérespectral. Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
88. Vélez-Rivera, N., Blasco, J., Chanona-Pérez, J., Calderón-Domínguez, G., Perea-Flores, M., Arzate-Vázquez, I., Cubero, S., Farrera-Rebollo, R. (2013). Computer vision system applied to classification of “Manila” mangoes during ripening process. *Food bioprocess technol.*
89. Verboven, P., Nemeth, A., Abera, M., Bongaers, E., Daelemans, D., Estrade, P., Herremans, E., Hertog, M., Saeys, W., Vanstreels, E., Verlinden, Leitner, M., Nicolai, B. (2013). Optical coherence tomography visualizes microstructure of apple peel. *Postharvest Biology and Technology.* 78, 123-132.
90. Wackerly, D., Mendenhall, W., Scheaffer, R. (2010). *Estadística matemática con aplicaciones.* CENGAGE, Learning
91. Wang, N., Brennan, J. (1995) Changes in Structure, Density and Porosity of Potato during Dehydration. *Journal of Food Engineering.* 24, 61-76.
92. Whale, S., Singh, Z., Behboudian, M., Janes, J., Dhaliwal, S. (2008). Fruit quality in “Crip’s Pink” apple, especially colour, as affected by preharvest sprays of aminoethoxyvinylglycine and ethepon. *Scientia Horticulturae.* 115, 342-351
93. Yan, Z., Sousa-Gallagjer, M., Oliveira, F. (2008). Shrinkage and porosity of banana, pineapple and mango slices during air-drying. *Journal of Food Engineering.* 84, 430-440.
94. Zhou, W., Wang, Z. (2006). *Scanning Microscopy for Nanotechnology. Techniques and Applications.* 1ª. Edición. Springer Science+Business.
95. Ziel, R., Haus, A., Tulke, A. (2008). Quantification of the pore size distribution (porosity profiles) in microfiltration membrans by SEM, TEM and computer image analysis. *Journal of Membrane Science.* 323, 241-246.