

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

**“APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE TEXTURA DE
IMÁGENES PARA LA CARACTERIZACIÓN
CUANTITATIVA DE SUPERFICIES BIOLÓGICAS”**



TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

IBQ. ISRAEL ARZATE VAZQUEZ

TESIS DIRIGIDA POR:

DR. JOSÉ JORGE CHANONA PÉREZ

DR. GUSTAVO FIDEL GUTIÉRREZ LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 9:00 horas del día 06 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Alimentos para examinar la tesis de titulada:

Aplicación del análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de superficies biológicas

Presentada por el alumno:

ARZATE

Apellido paterno

VÁZQUEZ

Apellido materno

ISRAEL

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	3	7	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

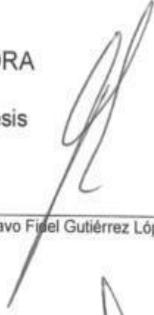
DOCTORADO

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. José Jorge Chanona Pérez


Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López


Dra. Lidia Dorantes Alvarez


Dra. Georgina Calderón Domínguez


Dr. Eduardo Terres Rojas


Dr. Reynaldo Ramón Farrea Rebollo

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Manuel Jesús Piñón López


S. E. P.
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado
e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 08 del mes de junio del año 2011, el (la) que suscribe **Israel Arzate Vazquez** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **B071377**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. José Jorge Chanona Pérez, Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López** y ceden los derechos del trabajo intitulado: **“Aplicación del Análisis de Textura de Imágenes para la Caracterización Cuantitativa de Superficies Biológicas”**, 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 las siguientes direcciones: **alexfe26@yahoo.com.mx;** **jorge chanona@hotmail.com;** **gusfgl@gmail.com;** si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Israel Arzate Vazquez

Nombre y firma alumno (a)

Vo. Bo


Dr. José Jorge Chanona Pérez
Director de Tesis


Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López
Director de Tesis

Image Processing Applied to Classification of Avocado Variety Hass (*Persea americana* Mill.) During the Ripening Process

Israel Arzate-Vázquez · José Jorge Chanona-Pérez · María de Jesús Perea-Flores ·
Georgina Calderón-Domínguez · Marco A. Moreno-Armendáriz · Hiram Calvo ·
Salvador Godoy-Calderón · Roberto Quevedo · Gustavo Gutiérrez-López

Received: 15 November 2009 / Accepted: 2 May 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract This work was undertaken to analyze the ripening process of avocados variety Hass (*Persea americana* Mill.) by image processing (IP) methodology. A set of avocados (10 samples) was used to follow the changes in image features during ripening by applying a computer vision system, extracting color and textural parameters. Other 16 avocados were used to evaluate the firmness and mass loss. Three maturity stages of avocados were established, and a classification was obtained by applying principal component analysis and *k*-nearest neighbor algorithm. During the ripening process (12 days), avocado firmness decreased from 75.43 to 2.63 N, while skin color values kept invariable during 6 days; after that, a decrement in the peel green color (a^*) was observed (-9.68 to 2.32). Image features showed that during ripening the color parameters (L^* , a^* , and b^*), entropy (4.29 to 4.00), angular second moment (0.287 to 0.360), and fractal dimension (2.58 to 2.44) had a similar

path as compared to mass loss, a^* , and firmness ripening parameters, respectively. Relationships between image features and ripening parameters were obtained. The parameter a^* was the most useful digital feature to establish an acceptable percentage of avocado classification (>80%) in three different maturity stages found. Results obtained by means of IP could be useful to evaluate, at laboratory level, the ripening process of the avocados.

Keywords Avocado · Ripening · Image processing · Firmness · Fractal dimension

Introduction

During the ripening of avocados, the skin color changes from green to purple/black (Cox et al. 2004); these changes are mainly caused by the degradation of chlorophyll and the rise in the concentration of carotenoids and anthocyanins (Toivonen and Brummell 2008), resulting the skin color and firmness good indicators to follow the ripening process, although firmness is still the most reliable characteristic to determine maturity index (Hertog et al. 2003). Firmness can be evaluated by invasive (hand tactile test) and destructive methods (penetrometers), even though traditional destructive methods could mean a quality dropping because fruit is so delicate when ripened that it could be easily damaged (Ochoa et al. 2009). For this reason, newer noninvasive techniques have been proposed. Noninvasive methods such as acoustic, spectroscopic, and image processing (IP), including multi- and hyperspectral imaging techniques, have been widely applied to evaluate the quality foods. However, acoustic and spectroscopic methods (near-infrared, nuclear magnetic resonance, and magnetic resonance imaging) could be relatively expensive and laborious, and a

I. Arzate-Vázquez · J. J. Chanona-Pérez (✉) · M. Perea-Flores ·
G. Calderón-Domínguez · G. Gutiérrez-López
Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional
de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional,
Plan de Ayala y Gasco s/n, Col. Santo Tomás,
C.P. 11340 Mexico City, Mexico
e-mail: jchanona@ipn.mx

M. A. Moreno-Armendáriz · H. Calvo · S. Godoy-Calderón
Centro de Investigación en Computación,
Instituto Politécnico Nacional,
Av. Juan de Dios Bátiz s/n, Unidad Profesional
Adolfo López Mateos, Col. Nueva Industrial Vallejo,
C.P. 07738 Mexico City, Mexico

R. Quevedo
Department of Science and Food Technology,
Universidad de Los Lagos,
Av. Fushlocher 1305,
Osorno, Chile

large number of samples, as well as a large laboratory area, could be required; besides, online measurements are not easily carried out in comparison with IP methods (Du and Sun 2004; Butz et al. 2005; Nicolai et al. 2007; Cubero et al. 2011). IP plays an important role in the food quality evaluation by maintaining accuracy and consistency while eliminating the subjectivity of manual inspections. IP have more advantages than other noninvasive techniques such as being cheap, easily adaptable to obtain measurements online, high accuracy, good correlation with visual human inspection, and is very versatile because it allows to obtain a widespread number of features from a simple digital image (Du and Sun 2004). The aim of this work was to evaluate the ripening process of Hass avocados during storage by means of IP methodology.

Materials and Methods

Experimental Design and Ripening Parameters

A batch of 70 avocados (*Persea americana* Mill., variety Hass, export quality) harvested from the same crop (Michoacán, México) was used to evaluate their ripening at laboratory scale in darkness conditions, at 20 °C and 75% of relative humidity for 12 days. A set of 10 avocados with similar shape, size, color, and weight (211–265 g) was selected for IP analysis in order to avoid the variability of samples due to different quality levels. Mass loss was evaluated with a digital balance (accuracy 0.1 mg, Explorer OHAUS, USA). The fruits used in IP analysis were weighed (10 samples per day) and the skin color (L^* , a^* , and b^*) measured with a colorimeter (Minolta Chroma Meter CR400, Japan; light source D65) taking four measurements at the equator of five fruits. Color differences (ΔE) were calculated by the equation

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

where $\Delta L^* = L^* - L_0^*$, $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, and $\Delta b^* = b^* - b_0^*$, being L_0^* , a_0^* , b_0^* the color parameter values of first maturation day and L^* , a^* , b^* the color parameter values of the sample during the maturation. Other 60 avocados (5 samples each day) were used to evaluate the avocado firmness for quintuplicate every day during 12 days by using a universal texturometer (Instron 5565, USA). Halves of avocados without peeling and free of seeds were used for the penetration test (speed of 10 mm/min and a conic probe with inferior diameter 2.2 mm, superior diameter 7.1 mm, cone angle 102°, and height 11.3 mm). Firmness was measured as the force (N) needed to pierce the sample at three different positions (center and in two points at 2 cm of center). Color parameters and firmness were used as

criterion to establishing the maturity stages of avocados; based on the time, the avocado firmness reached a value close to zero at the 12 days.

Image Processing

The computer vision system consisted of a square arrangement of four fluorescent lamps (60 cm, TL-D deluxe, natural daylight, 18 W/965, Philips, Mexico, color temperature 6,500 K, D65, with electronic ballast at 60 Hz/120 V) fixed at an angle of 45° and 35 cm above the sample. A digital camera (Cyber-shot DSC-W55, Sony, 7.2 megapixels, China) positioned vertically over the samples and connected to a PC (Dell Precision 380 Pentium 4) was also used to acquire the images. Camera settings were manual mode, exposure level 0.0, no zoom, and no flash. Twenty images (two for each avocado, 1,600 × 1,200 pixels, RGB-JPEG format, high resolution, and superfine quality) were taken each day, setting them in the same position, orientation, and with a matte gray background. Central zones of the avocados images (200 × 200 pixels, TIFF format) without bright spots were cropped and transformed into L^* , a^* , b^* space color and gray level (GL) images by using ImageJ software (version 1.34s). Mendoza et al. (2006) reported that color analysis of curved surface samples using $L^*a^*b^*$ is less affected by the curvature, shadows, and glossiness than other color spaces (RGB, HSV). Capture system calibration was similar to that reported by León et al. (2006). $L^*a^*b^*$ parameters of 35 color charts were also measured with the colorimeter, and the RGB digital images were converted into the $L^*a^*b^*$ color space, splitting the images into separated channels, by using the Color Space Converter plug-in version 4.0 (ImageJ). The average values of each color coordinate were estimated by the frequency histogram tool. $L^*a^*b^*$ values of color charts (colorimeter) were plotted against its corresponding $L^*a^*b^*$ values obtained by IP. In all cases, linear fits were found ($R^2 > 0.91$). In order to verify the capture system, 20 color charts were photographed every day, and the standard errors were $L^* 0.87-0.03$, $a^* 1.28-0.01$, and $b^* 0.53-0.00$.

During ripening L^* , a^* , b^* , angular second moment (ASM), contrast, correlation, inverse difference moment (IDM), entropy, and fractal dimension parameters were extracted from images (200 × 200 pixels). The texture parameters were obtained using the Gray Level Co-occurrence Matrix plug-in as reported by Haralick et al. (1973). Fractal dimensions (FD_{SDNC}) was estimated by the Shifting Differential Box Counting method from GL images (Mapfractalcount plug-in version 1.0, ImageJ). Textural features and FD_{SDNC} meanings have been described previously (Haralick et al. 1973; Mendoza et al. 2007; Quevedo et al. 2008; Farrera-Rebollo et al. 2011). Results are reported as averages and standard errors. Data were also analyzed by ANOVA and Tukey's multiple

comparison test (SigmaStat 3.1, Systat Software, USA) but only to evaluate the changes of color and texture parameters during the ripening.

Classification Process

In this step, 168 images (70%) were randomly selected to build a supervision set required for the learning phase, while the remaining 72 images (30%) were used for the validation test. PCA (MATLAB 7.0 MathWorks, Inc., MA, USA) was used to rank each feature according to its discrimination capability (Jolliffe 2002). Thus, the principal component analysis (PCA) algorithm reorders the feature set according to the discrimination capability of each feature. This reordering can be seen as assigning an integer index p to each feature x_i , where $i=1\dots r$ (r is the dimension of patterns). For each feature, the weight W of feature x , which has order p assigned by the PCA algorithm, is calculated as (Eq. 2)

$$W(x_p) = (WF)^p \quad (2)$$

where WF is a weighting factor that describes the percentage of total weight that each successive feature takes. Generally, $WF=0.5$, which means that the first (i.e., the most discriminating feature) bounds to a weight of 0.5, the next one binds to a weight of 0.25, and so on. All the experimental results presented in this paper were obtained with the aforementioned procedure. As dataset and classes (three representative maturity classes) were small, a trial-test approach was used to obtain these values. A classifier was defined, taking as input pattern (the selected features from PCA) and as output its maturity stages. A simplified model of the k -nearest neighbor algorithm (Guo et al. 2003) was used for the classification with a fast voting scheme, which uses the most representative pattern of each class as prototype. When all prototypes were calculated, a new pattern was classified by comparing it with the prototypes using a similarity function (Eq. 3). Last, a vote value was calculated for each class. This value synthesizes the new pattern's similarity with the set of prototypes from that class, and a decision rule was applied to determine the final class to which the pattern was assigned.

The following are the steps of the classification: (a) a subset of features that represent the original patterns (9 features, PCA) was selected, and weight values were assigned to each feature. In "Results and Discussion" section, two experiments are shown: one using only the three image features and another with six features; (b) a selection of three classes were defined: class 1 from day 1 to 6, class 2 from day 7 to 9, and class 3 from day 10 to 12. The classes were defined based on the results of color (explained in "Results and Discussion" section); (c) to

determine the sets of prototypes (representative patterns, o_k), the average value of each feature from each class was calculated; (d) a similarity function was selected (f), as the Euclidian distance does not consider the weight values (Eqs. 3 and 4).

$$g_{ij}(x_{ij}, o_{kj}) = ab \left[1 - \frac{x_{ij} - o_{kj}}{\max(x_{ij}) - \min(x_{ij})} \right] \quad (3)$$

$$f(x_i, o_k) = \alpha_j g_{ij}^k(x_{ij}, o_{kj}) \quad (4)$$

where x_{ij} is the value of the j th feature for i th pattern of each class; o_{kj} is the value of the j th feature for k th prototype; α_j is the weight value assigned to j th feature, and k is the number of classes (three classes).

(e) The average similarity (\bar{f}) of each new pattern with the set of prototypes from each class was calculated. (f) Finally, the decision rule was applied where the greatest average similarity (\bar{f}) to the prototypes was considered, and from which was possible to classify the pattern into one of the three classes.

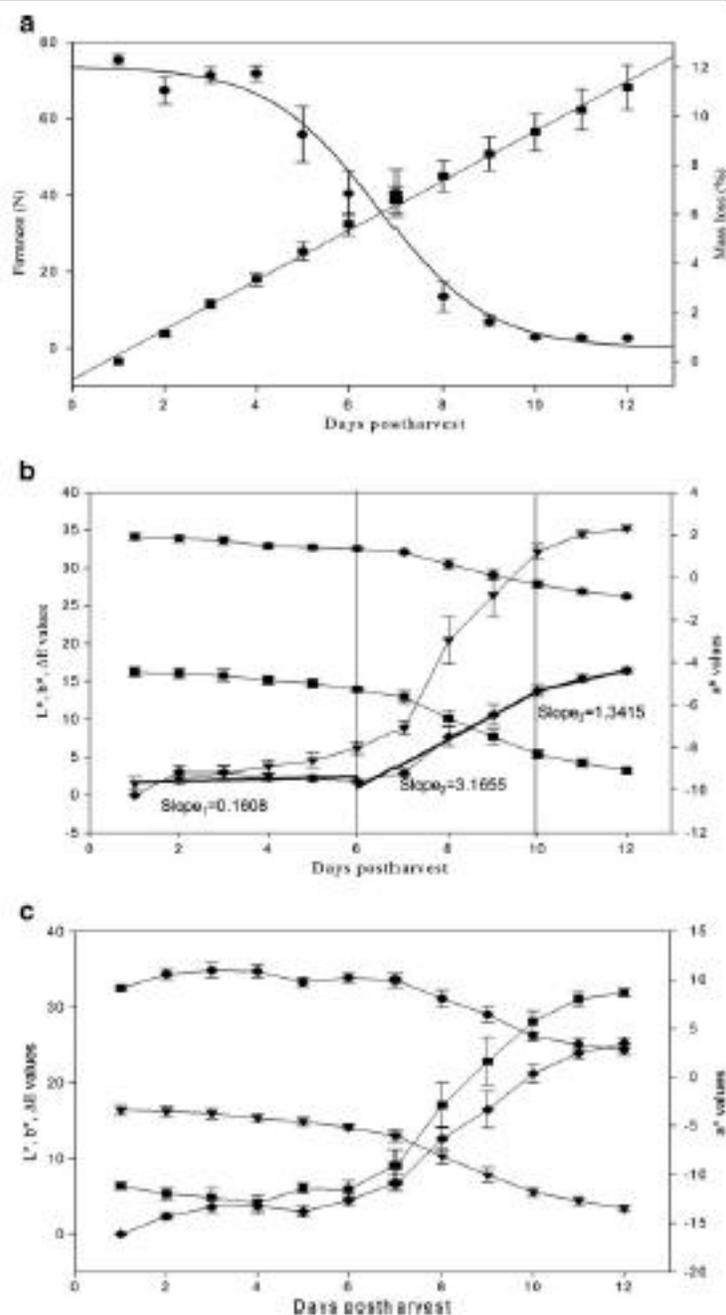
Results and Discussion

Ripening Parameters

Changes in ripening parameters are shown in Fig. 1. Firmness loss follows a sigmoidal pattern (Fig. 1a); this path was similar to those reported by Cox et al. (2004) and Ochoa et al.(2009), and it could be caused by enzyme activity that degrades the cell wall and promotes turgidity loss (Goulao and Oliveira 2008). Mass loss has a linear tendency, which increases as function of time (Fig. 1a), and during maturation, the average mass loss of avocados was $11.17 \pm 0.90\%$; it could be related with the turgidity loss.

CIELab color space and ΔE showed that during the first 6 days of maturation, no significant differences were observed ($p < 0.05$), while after the sixth day, a drastic change in the color values was detected as well as an increase in the ΔE values, where L^* and b^* decreased after the sixth day (Fig. 1b). The parameter a^* (green to red) increased progressively from the first until 12th day, while no drastic changes in the color parameters after 10 days were observed ($p < 0.05$). L^* , a^* , and b^* parameters and the changes in the slopes in ΔE plot (Fig. 1b) were used to establish the three stages of avocados maturity, providing criteria for the classification by IP. When comparing the color results obtained from IP methods with those obtained from the colorimeter (Fig. 1c), a similar tendency was found which indicates that both techniques can be used.

Fig. 1 Changes on the average values of quality parameters during the ripening process (12 days, 20 °C, and 75% of relative moisture). **a** Firmness (circles) and mass loss (squares). **b** Color parameters L^* (circles), a^* (inverted triangles), b^* (squares), and ΔE (diamonds) obtained from the colorimeter. The slope values (m_1 , m_2 , and m_3) are indicated. **c** Color parameters L^* (circles), a^* (squares), b^* (inverted triangles), and ΔE (diamonds) obtained from the images by IP



Texture Parameters

Figure 2 displays the changes in the avocado's peel during ripening process. The color and structure of the peel had no relevant modifications, and only after 6 days of storage, a

drastic change in both features was observed and quantitatively characterized by using texture parameters (Fig. 3). ASM is a feature that measures the homogeneity of the image (Haralick et al. 1973), which showed a time-dependent increment with a linear tendency (Fig. 3a) and

Aplicación del análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de superficies biológicas

Food Bioprocess Technol

Fig. 2 a Color changes of avocados. b Peel structural changes. c Gray level intensity plots. Images were selected during the ripening process (12 days, 20 °C, and 75% of relative humidity)

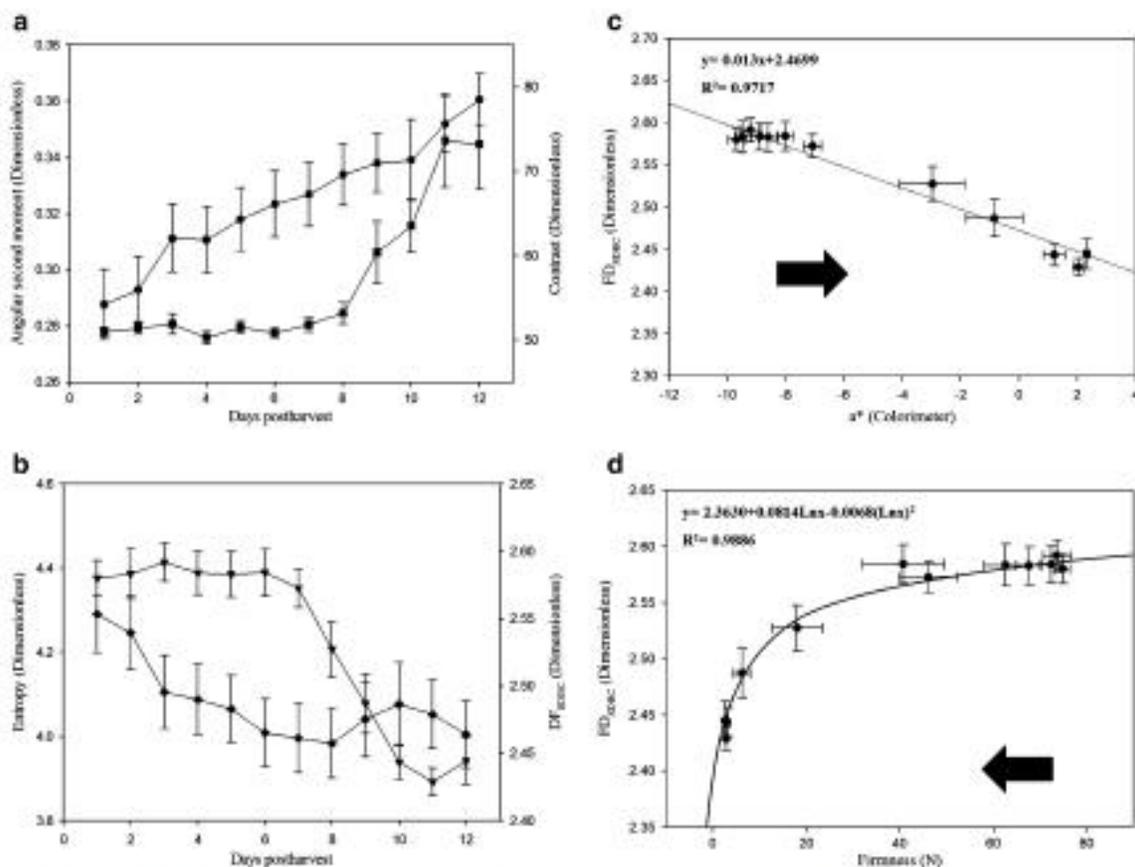
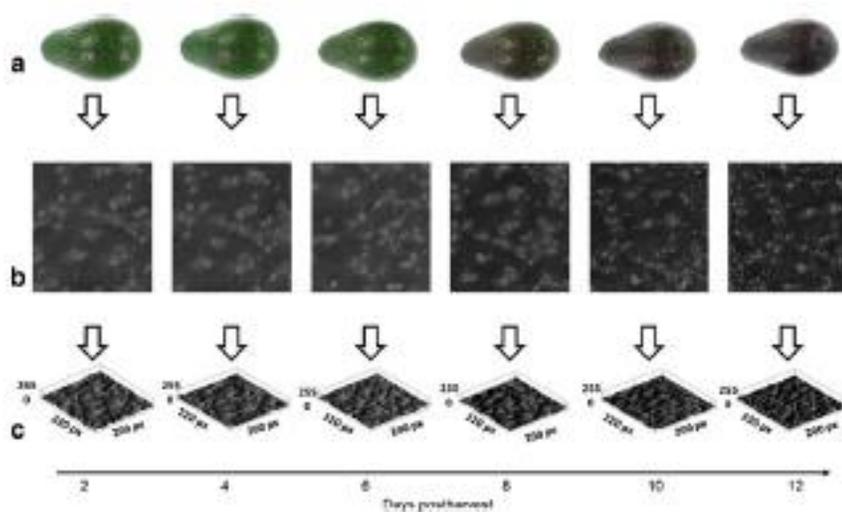


Fig. 3 Textural parameters extracted from the images. a ASM (circles) and contrast (squares). b Entropy (diamonds) and $FD_{50\%}$ (inverted triangles). Relationships between quality and texture

parameters: c a^* vs $FD_{50\%}$ and d firmness vs $FD_{50\%}$. Arrows indicate the direction of the ripening process, and the fit equations also are showed

larger image homogeneity. Contrast is a measure of the local variations presented in the image, relating the highest contrast to the largest local variations (Haralick et al. 1973; Mendoza et al. 2007). This parameter showed that during the first 8 days, no significant differences ($p < 0.05$) were detected, increasing sharply afterward (Fig. 3a). This increment in the contrast values could be related to the change of avocado's peel color (green to black) occurred in the same interval of time. The FD or fractal texture is a measure of the degree of roughness of the images; the higher values of FD, the more complex or rougher gray level images, while lower values of FD can be associated to simpler or smoother images (Quevedo et al. 2008). As in the other parameters, FD did not significantly change during the first 7 days ($p < 0.05$); afterward, a drastic decrease was observed (Fig. 3b). Finally, entropy values decreased gradually after the first 8 days; after that, a small increment was observed (Fig. 3b) due to the apparition of small clear dots on the skin of avocados (Fig. 2) probably promoted by fruit mass loss. Entropy measures the disorder or randomness of the image, and it is an indicator of its complexity; thus, the more complex the images, the higher the entropy values (Haralick et al. 1973; Mendoza et al. 2007; Yu et al. 2011). Texture parameters (mainly FD values) provide information about the structural changes that occur in the peel during ripening.

Relationships between quality and texture parameters were established, and Fig. 3c, d shows two different relationships selected. Figure 3c displays that a^* (colorimeter) values have a linear relationship with FD values with a high determination coefficient (Fig. 3c), whereas when the green color in the peel decreases, the FD values also decrease, which could be the result of structural changes in the peel (a lower roughness). Firmness and FD values followed a logarithmic tendency with a high determination coefficient (Fig. 3d), showing that when the firmness values decrease, the FD values diminish. FD values showed an adequate correlation between the quality parameters measured by traditional methods, and consequently, the images could be used as indicators to assess the maturation of avocados at laboratory level. The other parameters showed complex relationships with polynomial equations and exponents of third grade (results are not shown).

Classification

Ripening classification was developed based on two experiments, and for both cases, 240 images were used (2 images of each avocado during 12 days of the experiment, and 10 avocados per day, for 240 patterns). A first experiment was carried out exclusively with the three digital color parameters (a^* , b^* , and L^*), showing that a^* parameter presented the highest weight value (0.6),

followed by b^* and L^* (0.3 and 0.1, respectively). The second experiment, which did not include b^* and L^* parameters, was done employing the six more relevant features (a^* 0.5, Correlation 0.2, ASM 0.2, IDM 0.05, FD 0.025, and Entropy 0.025). Both experiments were ranked by the PCA. In the first experiment, a successful classification was found, where 58 of 72 images were properly classified, which represents a percentage of 80.5%. In the second experiment, 59 images of 72 for the validation phase could be correctly classified, which corresponds to 81.9%. In both experiments, the chromaticity coordinate a^* was the parameter that described better the ripening process of avocados Hass.

Conclusions

Image features obtained by IP provided a good description of ripening process of avocado Hass. In addition, the color and texture features evaluated from the images, in particular FD values, showed an adequate correlation with quality parameters. The three image color features (a^* , b^* , and L^*) were useful to classify the maturity stages of avocados, as 80.5% of the samples were correctly classified, while the six image parameters (a^* , Correlation, ASM, IDM, FD, and Entropy) resulted in a slightly better classification (81.9%). The chromaticity coordinate a^* was the parameter that described better the ripening process of avocado Hass. It is possible that IP methodology could be a useful tool for avocado classification at laboratory level. For future works, it is necessary to carry out more experiments using a larger number of samples and different storage conditions to achieve a more complete study.

Acknowledgments Israel Acosta-Vázquez wishes to thank CONACYT and IPI-IPN-México for the scholarship provided. We want to thank the financial support of the Mexican Government (COFAA, EDI, and SIP of IPN, and CONACYT) to carry out this project.

References

- Butz, P., Hofmann, C., & Tauscher, B. (2005). Recent developments in noninvasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. *Journal of Food Science*, 70(9), R131–R141.
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., & Wolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of Hass avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 33(1), 287–294.
- Cubero, S., Alexios, N., Molis, E., Gómez-Sánchez, I., & Blasco, J. (2011). Advances in machine vision applications for automatic inspection and quality evaluation of fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 487–504.
- Du, C., & Sun, D. W. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 230–249.

Aplicación del análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de superficies biológicas

Food Bioprocess Technol

- Fareza-Rebollo, R. R., Salgado-Cruz, M. P., Chanoa-Pérez, J., Gutiérrez-López, G. F., Alamilla-Beltrán, L., & Calderón-Domínguez, G. (2011). Evaluation of image analysis tools for characterization of sweet bread crumb structure. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-011-0513-y.
- Godão, L., & Oliveira, C. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology* 19(1), 4–25.
- Guo, G., Wang, H., Bell, D., Bi, Y., Greer, K. (2003) kNN model-based approach in classification. In: Proceedings of On the Move to Meaningful Internet Systems 2003: CoopIS, DOA, and ODBASE, pp 986–996.
- Heraldick, R., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transaction on Systems, Man, and Cybernetics SMC*, 3(6), 610–621.
- Hertog, M. L. A. T. M., Nicholson, S. E., & Whitmore, K. (2003). The effect of modified atmospheres on the rate of quality change in 'Hass' avocado. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 41–53.
- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal component analysis. Series: Springer Series in Statistics* (2nd ed.). New York: Springer.
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, I. (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(1), 1084–1091.
- Mendoza, F., Dejmek, P., & Aguilera, J. M. (2006). Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 285–295.
- Mendoza, F., Dejmek, P., & Aguilera, J. (2007). Colour and image texture analysis in classification of commercial potato chips. *Food Research International*, 40(1), 1146–1154.
- Nicolai, B. M., Beulens, K., Bohelen, E., Peirs, A., Saey, W., Theron, K. I., et al. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 99–118.
- Ochoa, S., Hertog, M., & Nicolai, B. (2009). Modelling the transient effect of 1-MCP on Hass avocado softening: a Mexican comparative study. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 62–72.
- Quevedo, R., Mendoza, F., Aguilera, J., Chanoa, J., & Gutiérrez, G. (2008). Determination of senescent spotting in banana (*Musa cavendish*) using fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 509–515.
- Toivonen, P., & Baummell, D. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1–14.
- Yu, X., Liu, K., Wu, D., & He, Y. (2011). Raisin quality classification using least squares support vector machine (LSSVM) based on combined color and texture features. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-011-0531-9.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. José Jorge Chanona Pérez y Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López en los Laboratorios del Doctorado en Alimentos del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Asimismo, los estudios microestructurales y las pruebas de nanoindentación fueron realizados en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de Ultra-Alta Resolución (LAMEUAR) del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) del IPN.

Se extiende un reconocimiento por el apoyo para la realización del trabajo al Dr. Vicente Garibay Febles Jefe del LAMEUAR del IMP y de los Dr. Eduardo Terrés Rojas y Dr. Ubaldo Sadot Pacheco Alcalá investigadores del IMP. Al Dr. Marco Antonio Moreno Armendáriz y al Dr. Salvador Godoy del Centro de Investigación en Cómputo del IPN. Al Dr. José Gerardo Cabañas director del CNMN por las facilidades y el apoyo otorgado hacia el trabajo de tesis.

APOYO FINANCIERO

Este trabajo contó con el apoyo financiero de la Secretaría de Posgrado e Investigación (SIP) del Instituto Politécnico Nacional y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los siguientes proyectos de investigación:

Proyectos SIP:

Procesamiento de imágenes aplicado al estudio de la estructura a escalas macro, micro y nanométrica de biomateriales con aplicaciones en la ingeniería de alimentos y ambiental. Clave SIP: 20080510. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Estudio fisicoquímico y estructural de materiales biológicos a través de técnicas de espectroscopia, microscopia y análisis de imágenes. Clave SIP: 20091151. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Caracterización y construcción de biomateriales mediante microscopia convencional y de alta resolución con aplicación en alimentos. Clave SIP: 20100771. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Construcción y caracterización de películas biopoliméricas puras y compuestas como sistemas de barrera para la conservación y funcionalización de materiales biológicos. Clave SIP: 20110627. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Proyectos CONACyT:

Proyecto CONACYT aceptado en la convocatoria 2006 con clave 59730 modalidad investigador Joven, vigencia 2007-2009. Análisis microestructural de biomateriales sometidos a procesos térmicos y su relación con sus propiedades de funcionalidad. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Proyecto CONACYT aceptado en la convocatoria de Ciencia Básica 2009 con clave 133102, vigencia 2010-2011. Construcción y caracterización de películas orgánicas micro y nanoestructuradas. Director de Proyecto: Dra. Georgina Calderón Domínguez.

El autor de la tesis también contó con la beca del CONACyT que se otorga a los estudiantes inscritos en los programas del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC); así como también contó con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN ASOCIADOS A LA TESIS

Artículos en revistas incluidas en el Journal Citation Reports (JCR)

1. **Israel Arzate-Vázquez**, José Jorge Chanona-Pérez, María de Jesús Perea-Flores, Georgina Calderón-Domínguez, Marco A. Moreno-Armendáriz, Hiram Calvo, Salvador Godoy-Calderón, Roberto Quevedo, Gustavo Gutiérrez-López (2011). Image processing applied to classification of avocado variety Hass (Persea americana Mill) during the ripening process. Food and Bioprocess Technology: An International Journal. DOI: 10.1007/s11947-011-0595-6. Factor de Impacto: 2.238
2. **Arzate-Vazquez, I**; Chanona-Pérez, J. J.; Calderón-Domínguez, G.; Martínez-Rivas, A.; Terrés-Rojas, E.; Garibay-Febles, V.; Gutiérrez-López, G. F. (2011). Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. Carbohydrate Polymers. Bajo revisión. Factor de Impacto: 3.167.
3. Mery D., Chanona-Pérez J. J., Soto A., Aguilera J. M., Cipriano A., Veléz-Rivera N., **Arzate-Vázquez I**, Gutiérrez-López G. F. (2010). Quality Classification of Corn Tortillas using Computer Vision. Journal of Food Engineering. 101(4):357-364. Factor de Impacto: 2.313.

Resúmenes en extenso, cortos, ponencias orales y carteles en eventos científicos de la especialidad.

1. Arzate-Vázquez Israel, Perea-Flores María de Jesús, Arana-Erasquin Ramón, Calderón-Domínguez Georgina, Quevedo-León Roberto, Gutiérrez-López Gustavo-Fidel; Chanona-Pérez José Jorge. Procesamiento de imágenes aplicados al estudio del maduración del aguacate variedad Hass (Persea americana Mill). **V Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Tuxtla Gutiérrez Chiapas-México del 12 al 14 de marzo del 2008. Resumen extenso y corto (Cartel).**
2. Arzate-Vázquez I., Calderón-Domínguez G., Arana-Erasquin R., Quevedo R., Chanona-Pérez J. Evaluation of the ripening process of avocado hass (Persea American mill) by means image processing and fractal analysis. **10th International Congress on Engineering and Food. Viña del Mar-Chile. Del 20 al 24 de abril del 2008. Resumen corto (Cartel).**
3. P.J.J. Chanona, V.I. Arzate, F.M. Perea, C.C. Gumeta, B.A. Vazquez, D.G. Calderón, B. L. Alamilla, P.J. Mendoza and L.G.F. Gutiérrez. Characterization of food materials structure during their storage and processing by image analysis methodology. **1st. International ISEKI Food Conference. September 10-12th. 2008. Porto, Portugal. Resumen corto (Cartel).**

4. Israel Arzate, Maria de Jesús Perea, Marco A. Moreno-Armendáriz, Hiram Calvo, Salvador Godoy-Calderón, Gustavo Fidel Gutiérrez, Georgina Calderón, José Jorge Chanona. Image processing applied to classification of Avocado Variety Hass (Persea Americana Mill) during their ripening process. **5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management. Aug 31st to Sept 2nd, 2009, Potsdam, Germany. Resumen en extenso y corto (Oral).**
5. Chanona-Pérez, J.J.; Arzate-Vázquez, I.; Pacheco-Alcalá, U.S.; Terrés-Rojas, E.; Garibay-Febles, V.; Gutiérrez-López, G.F. Caracterización estructural de películas de alginato mediante técnicas de microscopía y análisis de imágenes. **Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Bogota, Colombia. Septiembre 6 al 9 del 2009. Resúmenes en extenso publicados en la Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos No. 18. Septiembre de 2009. ISSN 2027-2030. Edición especial. Publicación en extenso y resumen corto (Cartel).**
6. Chanona-Pérez, J.J.; Arzate-Vázquez, I.; Pacheco-Alcalá, U.S.; Terrés-Rojas, E.; Garibay-Febles, V.; Gutiérrez-López, G.F. Estudio de los cambios microestructurales de la cascara de Aguacate Hass en el proceso de maduración. **10th Inter-American Congreso of Electrón Microscopy 2009. CIASEM 2009. 1st Congress of the Argentine Society of Microscopy SAMIC 2009. October 25-28, Rosario city, Argentina. Resumen corto (Cartel).**
7. Israel, Arzate-Vázquez; Olivia Guadalupe, Espinosa-Ibarra; José Jorge, Chanona-Pérez; Ubaldo Sadot, Pacheco-Alcalá; Eduardo, Terrés-Rojas; Vicente, Garibay-Febles; Liliana, Alamilla-Beltrán; Gustavo Fidel, Gutiérrez-López. Uso del procesamiento de imágenes y microscopía para la caracterización de películas comestibles. **XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Del 22 al 26 de Marzo de 2010, en Acapulco, Guerrero, México. Resumen en extenso y corto (Cartel).**
8. Domingo Mery Q.; Álvaro Soto Aldo Cipriano; Nayeli Vélez Rivera; Israel Arzate Vázquez; José Miguel Aguilera; Gustavo Fidel Gutiérrez López; José Jorge Chanona Pérez. Sistema de visión por computadora aplicado a la clasificación de calidades en tortilla de maíz. **XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Del 22 al 26 de Marzo de 2010, en Acapulco, Guerrero, México. Resumen en extenso y corto (Cartel).**
9. Arzate-Vázquez, R.N. Domínguez-Fernández, E. Terres-Rojas, V. Garibay-Febles, J.J. Chanona-Pérez y G.F. Gutiérrez-López. Caracterización estructural y textural de películas comestibles de alginato con NaCl a través de MEBA y análisis de imágenes. **X Congreso Nacional de Microscopía. Morelia, Michoacán 23-27 de mayo del 2010. Resumen en extenso (Cartel).**

10. Arzate-Vázquez, I., Perea-Flores, M.J., Terrés-Rojas, E., Pacheco-Alcala, U.S., Martínez-Rivas, A., Gutiérrez-López, G.F., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. Correlative microscopy and image analysis applied to microstructure characterization of the edible films. **The 17 IFSM International Microscopy Congress IMC17. Rio de Janeiro, Brasil, September 19-24, 2010. Resumen en extenso (Cartel).**
11. Arzate, Israel; Martínez, Adrian; Chanona, José J. Nanomechanical Characterization of edible films. **11th International Symposium on the properties of Water (ISOPOW11). Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems". Querétaro-México, del 5-9 de septiembre 2010. Resumen corto (Cartel).**
12. Arzate, Israel; Martínez, Adrian; Terres, Eduardo; Garibay, Vicente; Chanona, José J. Microstructural Characterization of edible films and their importance in the gases diffusion phenomenon. **11th International Symposium on the properties of Water (ISOPOW11). Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems". Querétaro-México, del 5-9 de septiembre 2010. Resumen corto (Cartel).**
13. Israel Arzate-Vázquez, Adrian Martínez-Rivas, Juan Vicente Mendez-Mendez, Angélica Gabriela Mendoza-Madrigal, Claudia Ericka Ponce-Reyes, Jose Jorge Chanona-Pérez. Nanoindentation of edible films: a new complementary characterization of nanomechanical properties. **6th International CIGR Technical Symposium TOWARDS A SUSTAINABLE FOOD CHAIN Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management. 18th -20th April 2011 – Nantes, FRANCE. Resumen en extenso y corto (Oral).**
14. José Jorge Chanona Pérez, Israel Arzate Vázquez, Adrián Martínez Rivas, Georgina Calderón Domínguez, Leonor Guadarrama Fernández, Gustavo Fidel Gutiérrez Pérez. Microstructural characterization of edible films by microscopy techniques and textural features. **11th International Congress on Engineering and Food "FOOD PROCESS ENGINEERING IN A CHANGING WORLD". ICEF 11. May 22- 26 2011, Athens, Greece. Resumen en extenso y corto (Cartel).**

Distinciones

Tercer Lugar en el concurso de trabajos libres en el área de Calidad e Inocuidad Alimentaria del V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Tuxtla Gutiérrez Chiapas-México del 12 al 14 de marzo del 2008. Con el trabajo titulado: Procesamiento de imágenes aplicados al estudio de la maduración del aguacate variedad Hass (*Persea americana* Mill).

Dirección de proyectos terminales de investigación asociados a la tesis.

1. Estudio del efecto de recubrimientos comestibles en el pardeamiento de cortes de manzana empleando análisis de imágenes (07/01/2011). Proyecto de Investigación Curricular para la obtención del título de Ingeniero Bioquímico (Olivia Guadalupe Espinosa Ibarra). ENCB-IPN.
2. Clasificación de la calidad de tortillas comerciales de maíz empleando análisis de imágenes (07/01/2011). Proyecto de Investigación Curricular para la obtención del título de Ingeniero Bioquímico (Andrés Abraham Vázquez Vidals. ENCB-IPN.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 Técnicas de procesamiento de imágenes	5
3.1.1 Definición	5
3.1.2. Etapas de las técnicas de procesamiento de imágenes	8
3.1.2.1. Adquisición de la imagen	9
3.1.2.2 Pre-procesamiento de la imagen	10
3.1.2.3 Segmentación de la imagen	10
3.1.2.4 Medición de las características del objeto	11
3.1.2.4.1 Tamaño y forma	11
3.1.2.4.2 Color	12
3.1.2.4.2 Análisis de textura de imágenes	13
3.1.2.5 Clasificación	15
3.2 Películas comestibles	16
3.2.1 Definición y aplicación	16
3.2.2 Materiales empleados para la fabricación de películas comestibles	17
3.2.2.1 Lípidos	18
3.2.2.2 Polisacáridos	19
3.2.2.3 Proteínas	20
3.2.2.4 Combinaciones de biomoléculas	21
3.2.3 Métodos de elaboración de películas comestibles	21
3.2.4 Métodos y técnicas empleados para la caracterización de películas comestibles	23
3.2.4.1 Caracterización microestructural	23
3.2.4.2 Caracterización mecánica mediante la técnica de nanoindentación	24
3.3 Proceso de maduración del aguacate variedad Hass (<i>Persea americana</i> Mill)	25

4.	JUSTIFICACIÓN	27
5.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	28
5.1.	Objetivo general	28
5.2.	Objetivos específicos.....	28
5.3.	Hipótesis	29
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1	Caracterización de películas comestibles de alginato y quitosano	30
6.1.1	Soluciones formadoras de películas	30
6.1.2	Formación de películas	31
6.1.3	Determinación de propiedades físicas	31
6.1.3.1	Espesor	31
6.1.3.2	Color	32
6.1.3.3	Brillo.....	32
6.1.3.4	Propiedades mecánicas (Técnica de nanoindentación)	33
6.1.4	Caracterización cuantitativa de la microestructura de películas comestibles mediante análisis de textura de imágenes.....	39
6.1.4.1	Técnicas de microscopía.....	39
6.1.4.1.1	Microscopía de luz.....	39
6.1.4.1.2	Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental	40
6.1.4.1.3	Microscopía de Fuerza Atómica.....	41
6.1.4.2	Análisis de textura de imágenes	43
6.1.4.2.1	Algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises	43
6.1.4.2.2	Algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas	45
6.1.4.2.3	Relación entropía/dimensión fractal	46
6.2	Caracterización cuantitativa de los cambios superficiales del aguacate Hass y su clasificación en etapas de madurez.....	47
6.2.1	Cinética de maduración	47
6.2.2	Evaluación de los parámetros de madurez	48
6.2.2.1	Pérdida de peso.....	48
6.2.2.2	Color	48

6.2.2.3 Firmeza	48
6.2.3 Sistema de visión computarizada	49
6.2.3.1 Medición de color por PI.....	50
6.2.3.2 Análisis de textura de imágenes	51
6.2.3.2.1 Algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises	51
6.2.3.2.2 Algoritmo Conteo de Cajas de Desplazamiento Diferencial.....	51
6.2.4 Proceso de clasificación.....	51
6.3 Análisis estadístico	53
7. RESULTADOS Y DISCUSION	54
7.1 Caracterización de películas comestibles de alginato y quitosano	54
7.1.1 Propiedades físicas	54
7.1.1.1 Espesor	54
7.1.1.2 Color	56
7.1.1.3 Brillo.....	58
7.1.1.4 Propiedades mecánicas de películas comestibles	59
7.1.1.4.1 Efecto del tamaño de indentación (carga máxima de indentación) sobre las propiedades mecánicas de películas comestibles.....	59
7.1.1.4.2 Efecto del tiempo de pausa a carga constante (desplazamiento de indentación) sobre las propiedades mecánicas de películas comestibles.	67
7.1.1.4.3 Efecto de la velocidad de carga y descarga sobre el fenómeno de desplazamiento de indentación.....	71
7.1.1.4.4 Propiedades mecánicas de películas comestibles hechas de alginato y quitosano.....	72
7.1.2 Caracterización cuantitativa de la microestructura de películas comestibles.....	75
7.1.2.1 Microscopia de Luz	75
7.1.2.2 Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental.....	80
7.1.2.3 Microscopía de Fuerza Atómica.....	85
7.1.2.4 Estudio del efecto de Campo de Visión (CDV) sobre los parámetros de textura en las diferentes técnicas de microscopía.....	91
7.1.2.5 Análisis de la relación entropía/dimensión fractal	98

7.2 Caracterización cuantitativa de los cambios superficiales del aguacate variedad Hass y su clasificación en etapas de madurez	100
7.2.1 Parámetros de madurez.....	100
7.2.1.1 Firmeza y pérdida de peso	100
7.2.1.2 Mediciones colorimétricas con colorímetro y con IP	101
7.2.2 Parámetros de textura	103
7.2.3 Relación entre los parámetros de madurez y textura.....	106
7.2.4 Proceso de clasificación.....	108
8. CONCLUSIONES.....	110
8.1 Caracterización física y mecánica	110
8.2 Caracterización cuantitativa de la microestructura mediante análisis de textura de imágenes	111
8.3 Caracterización cuantitativa de los cambios superficiales del aguacate variedad Hass y su clasificación en etapas de madurez	113
9. BIBLIOGRAFÍA	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Etapas del procesamiento de imágenes (PI).....	9
Figura 3.2. Propiedades funcionales de películas comestibles.....	16
Figura 3.3. Diagrama de los materiales empleados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles.	18
Figura 3.4. Esquema del ensamblaje “Capa por Capa”.....	22
Figura 6.1. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de una punta de diamante Berkovich, un esquema de su geometría y una imagen 3D de una huella residual sobre una capa dura.....	33
Figura 6.2. Curva de carga-desplazamiento típica del proceso de indentación donde se señalan las tres partes principales: aplicación de la carga, pausa a carga constante y descarga.	34
Figura 6.3. Curva de desplazamiento del indentador en función del tiempo a una carga constante (periodo de pausa).	37
Figura 6.4. Curva de carga-desplazamiento donde se muestran las zonas del trabajo plástico y elástico de la indentación representados por el área bajo la curva.....	38
Figura 6.5. Grafico de log de conteo de cajas contra log de tamaño de caja obtenido mediante el algoritmo CCDD.....	46
Figura 6.6. Imagen del Sistema de Visión por Computadora empleado para la adquisición de las imágenes.....	50
Figura 7.1. Imagen de las películas comestibles elaboradas en este trabajo.	54
Figura 7.2. Micrográficas de sección transversal de películas comestibles examinadas con MEBA a una amplificación de 500X.	55
Figura 7.3. Valores de brillo de las superficies de las películas comestibles medidos a diferentes ángulos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.	59
Figura 7.4. Valores de dureza y módulo elástico de películas comestibles en función de la carga máxima de indentación..	61
Figura 7.5. Galería de imágenes de las impresiones residuales realizadas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una película comestible de alginato.....	63

Figura 7.6. Galería de imágenes de las impresiones residuales realizadas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una película comestible de alginato/quitosano.	63
Figura 7.7. Galería de imágenes de las impresiones residuales realizadas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una película comestible de quitosano.	64
Figura 7.8. Profundidad máxima de indentación en función de la carga máxima para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.	65
Figura 7.9. Valores del desplazamiento de indentación (creep indentation) en función de la carga máxima aplicada para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.	66
Figura 7.10. Valores de dureza y módulo elástico de películas comestibles en función del tiempo de pausa a carga constante.	68
Figura 7.11. Valores de desplazamiento de indentación (creep indentation) en función del tiempo de pausa a carga constante para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.	70
Figura 7.12. Valores de desplazamiento de indentación en función de la velocidad de carga y descarga para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.	72
Figura 7.13. Galería de imágenes (escala de grises) de las superficies de películas comestibles examinadas con un microscopio de luz a diferentes ampliaciones.	76
Figura 7.14. Micrográficas de sección transversal de las películas comestibles obtenidas con MEBA.	81
Figura 7.15. Galería de imágenes de la superficie de películas comestibles obtenidas con MEBA a diferentes magnificaciones.	82
Figura 7.16. Galería de imágenes topográficas (escala de grises) de la superficie de películas comestibles obtenidas con un AFM a diferentes áreas de escaneo.	86
Figura 7.17. Galería de imágenes topográficas 3D de la superficie de películas comestibles obtenidas con un MFA a diferentes áreas de escaneo.	87
Figura 7.18. Valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes de ML en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión.	92
Figura 7.19. Valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes de MEBA en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión.	94

Figura 7.20. Valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes topográficas de MFA en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión.....	95
Figura 7.21. Valores de la relación entropía/dimensión fractal de las imágenes obtenidas por ML, MEBA y MFA, a diferentes Campos de Visión..	98
Figura 7.22. Cambios de los valores promedio de firmeza y pérdida de peso de los aguacates variedad Hass durante el proceso de maduración.	101
Figura 7.23. Cambios de los valores promedio de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y ΔE durante el proceso de maduración medidos con el colorímetro y con PI.....	102
Figura 7.24. Galería de imágenes de los cambios de color y estructurales de la cáscara de aguacate Hass durante el proceso de maduración: cambios de color, cambios estructurales de la cáscara y superficies de intensidad en escala de grises.....	104
Figura 7.25. Cambios de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de las cáscaras de aguacates en función del tiempo.....	105
Figura 7.26. Relaciones entre los parámetros de madurez y textura: a^* contra dimensión fractal y firmeza contra dimensión fractal.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Ejemplos de aplicaciones del procesamiento de imágenes para la evaluación de la calidad de alimentos mediante imágenes tomadas con una cámara con dispositivo de carga acoplado.	8
Tabla 3.2. Características de forma combinadas con tamaño.	12
Tabla 6.1. Condiciones de la cámara del microscopio usadas para la captura de imágenes de las películas comestibles.	40
Tabla 6.2. Ecuaciones de los parámetros texturales extraídos a partir de las imágenes en escala de grises con el algoritmo GLCM.	44
Tabla 7.1. Valores promedio de los espesores de películas comestibles elaboradas de alginato y quitosano medidos con MEBA y un micrómetro digital.	55
Tabla 7.2. Valores de las coordenadas L^* , a^* y b^* y diferencias de color (ΔE) de las películas comestibles medidos con un colorímetro.	57
Tabla 7.3. Valores de las propiedades mecánicas de películas comestibles determinadas mediante la técnica de nanoindentación a una carga de 2.5 mN, pausa de 60 segundos y velocidad de carga-descarga de 2.5 mN/min.	73
Tabla 7.4. Valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de películas comestibles obtenidas por un microscopio de luz (ML) a diferentes magnificaciones.	79
Tabla 7.5. Valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de películas comestibles obtenidas con un microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) a diferentes magnificaciones.	84
Tabla 7.6. Parámetros de textura y rugosidad extraídos desde las imágenes topográficas de AFM a diferentes áreas de escaneo.	89
Tabla 7.7. Ecuaciones de segundo orden que se ajustaron a los parámetros de textura (z) en función de la proporción de alginato (x) y del campo de visión (y) para las tres técnicas de microscopía usadas en este trabajo.	97

1. RESUMEN

Las técnicas de procesamiento de imágenes han tenido un gran desarrollo, debido a que pueden caracterizar cuantitativamente características físicas como tamaño, morfología, color y propiedades de textura de cualquier imagen digital y por tal motivo se han utilizado ampliamente para la evaluación de la calidad de alimentos. Asimismo, el análisis de textura de imágenes permite medir de manera cuantitativa los cambios microestructurales de alimentos a partir de imágenes.

El objetivo de este trabajo fue aplicar el análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de dos superficies biológicas: (i) películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano, y (ii) cáscara de aguacate variedad Hass (*Persea americana* Mill) durante el proceso de maduración.

Para el caso de películas comestibles, se obtuvieron imágenes empleando diferentes técnicas de microscopía (Microscopía de Luz, Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental y Microscopía de Fuerza Atómica) y para el aguacate Hass se obtuvieron imágenes de la superficie del fruto mediante un sistema de visión por computadora. A partir de las imágenes obtenidas se estimaron parámetros de textura basados en el algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises y en el algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas. Por otra parte, se realizó un estudio profundo de la aplicación de la técnica de nanoindentación sobre la caracterización de las propiedades mecánicas de las películas comestibles.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los parámetros de textura extraídos a partir de las imágenes obtenidas fueron exitosos para describir cuantitativamente la microestructura de la superficie de las películas comestibles estudiadas así como para la evaluación de los cambios de la cáscara del aguacate Hass durante la maduración. De manera particular para las películas comestibles, se demostró que el análisis de textura de imágenes fue una herramienta eficiente para evaluar cuantitativamente las microestructuras

de películas elaboradas con alginato y quitosano examinadas mediante las diferentes técnicas de microscopía, además de que tal estudio podría ser una guía para seleccionar las condiciones de captura y las técnicas de microscopía para el estudio de películas comestibles. Con respecto a la evaluación de los cambios del aguacate, los resultados revelaron que los parámetros estimados proveyeron una buena descripción del proceso de maduración del aguacate variedad Hass y que mediante el uso de estos parámetros, se obtuvieron porcentajes de clasificación de las etapas de madurez mayores al 80%.

Por último, para la técnica de nanoindentación se concluyó que es una poderosa herramienta para caracterizar las propiedades mecánicas a micro y nanoescala de películas comestibles, así como también para estudiar fenómenos relacionados con las propiedades viscoelásticas de estos biomateriales.

2. ABSTRACT

The image processing techniques have a great development, because they can quantitatively characterize physical characteristics such as size, morphology, color and texture properties of any digital image and for that reason have been widely used to evaluation food quality. Also, the image texture analysis can measure quantitatively the microstructural changes of food from images.

The aim of this study was to apply image texture analysis for quantitative characterization of two biological surfaces: (i) edible films made from alginate and chitosan polysaccharides, and (ii) peel avocado Hass (*Persea americana* Mill) during ripening process.

In the case of edible films, images were obtained using different microscopy techniques (Light Microscopy, Environmental Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy) and for surface images of avocados Hass was obtained by computer vision system. From images, texture parameters were estimated based on Gray Level Co-Occurrence Matrix and Shifting Differential Box Counting algorithms. Moreover, it was conducted a study of the application of nanoindentation technique for the characterization of mechanical properties of edible films.

Results obtained in this study showed that texture parameters extracted from the images were successful to describe quantitatively the microstructure of the surface edible films as well as to evaluate the changes in the peel avocados Hass during the ripening. In particular for edible films, it was shown that images texture analysis was an efficient tool to quantitatively evaluate the microstructure of films made of alginate and chitosan examined by using different microscopy techniques. In addition, this work could be a guide to select the capture conditions and microscopy techniques for the study of edible films.

With regard to the evaluation of peel avocados Hass, the results revealed that the estimated parameters provided a good description of the ripening process and with these parameters we obtained classification percentages higher than 80%.

Finally, the nanoindentation technique resulted a powerful tool to characterize the mechanical properties at micro and nanoscale edible films, as well as to study phenomena related to the viscoelastic properties of these biomaterials.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Técnicas de procesamiento de imágenes

3.1.1 Definición

Durante las últimas décadas, las técnicas de procesamiento de imágenes (PI) han tenido un gran desarrollo, debido a que pueden caracterizar cuantitativamente características físicas como tamaño, morfología, color y propiedades de textura de cualquier imagen digital y debido a esto, cada vez son más importantes en diversas áreas, como en los alimentos donde se han utilizado principalmente para la evaluación de la calidad (Du & Sun, 2004; Mendoza & Aguilera, 2004; Du & Sun, 2006; Mendoza y col., 2007; Quevedo y col., 2008). La principal ventaja que ofrecen dichas técnicas es que son no destructivas, rápidas y exactas (Mendoza y col., 2007). Además, las técnicas de PI son frecuentemente combinadas con sistemas mecánicos e instrumentales que reemplazan la manipulación humana con el fin de hacer más eficaces los procesos (Du & Sun, 2004; Du & Sun, 2006).

Son diversas las áreas en donde las técnicas de PI han sido empleadas, como por ejemplo en ciencia de los materiales (Sinha y col., 2008), tecnología de bioenergéticos (Chiparus & Chen, 2003), biomedicina (Loukas & Linney, 2004), ingeniería química (Tessier y col., 2008), biología (Schmitt & Hasse, 2007), robótica (Lai & Wang, 2008), ciencia y tecnología de los alimentos (Papadakis y col., 2000; Mendoza & Aguilera, 2004; Pedreschi y col., 2004; Mendoza y col., 2007; Quevedo y col., 2008), bioingeniería (Kumar & Mittal, 2008), geoinformación (Kumar y col., 2008), ecología (Martínez de Dios y col., 2008) y en el diseño de patrones de reconocimiento (Baudrier y col., 2008).

El área de la ciencia y tecnología de alimentos es uno de los campos donde más se han empleado las técnicas de procesamiento de imágenes. A continuación se mencionan algunos trabajos que han sido publicados en este campo.

Mendoza y Aguilera (2004) implementaron un sistema de visión por computadora para identificar las etapas de maduración de plátanos basándose en el color, el desarrollo de puntos cafés y en la textura de la imagen del fruto. Los resultados obtenidos por ellos, mostraron que existen pequeñas variaciones en los datos de color y de apariencia, y que esta es una técnica simple de clasificación muy confiable para identificar las etapas de maduración del plátano en comparación de la percepción visual. Usando las coordenadas del espacio de color CIELab (L^* , a^* y b^*), el porcentaje de área color café y el contraste, fue posible clasificar una muestra de 49 plátanos en 7 etapas de maduración con una exactitud del 98%.

En otro estudio, Pedreschi y col. (2004) propusieron un patrón de reconocimiento para clasificar papas fritas a diferentes condiciones: 2 pretratamientos (blanqueado y no blanqueado) y a 3 temperaturas (120° C, 150° C y 180° C); y en base a sus resultados, obtuvieron más de 1500 características de las imágenes, pero finalmente seleccionaron 11 para clasificar las muestras estableciendo 6 clases de calidad de papas con una exactitud del 95%.

Recientemente, Pérez-Nieto y col. (2010) aplicaron técnicas de procesamiento de imágenes para estudiar los cambios de la estructura de la masa y su relación con la temperatura de la masa, la pérdida de masa y la altura de pan durante la etapa de cocción. Los resultados mostraron que durante la cocción, se presentó un fenómeno de coalescencia entre las burbujas, y se observó un máximo de dicho fenómeno en las primeras etapas de cocción (<250 s). Este fenómeno fue asociado con un incremento en la altura de la masa, sin un cambio significativo en la temperatura del centro de la masa. Además, mencionaron que la dimensión fractal de la textura de la miga, la dimensión fractal del contorno de las células y las características de la miga de grano fueron indicadores útiles para estudiar la coalescencia, así como también para distinguir el tiempo de cocción necesario para que las características de la miga se mantuvieran constantes.

En otro estudio, Perea-Flores y col. (2011) emplearon técnicas de microscopía y procesamiento de imágenes para describir y cuantificar la macro y microestructura de las semillas de *R. communis*. Y en base a los resultados obtenidos los autores concluyen que las técnicas de microscopía y procesamiento de imágenes fueron herramientas eficaces para caracterizar la macro y microestructura de las semillas y que los datos obtenidos proporcionaron información numérica que podrían ser útil para los procesos térmicos y mecánicos de las semillas de *R. communis*, así como también para el diseño de equipos de proceso.

También las técnicas de procesamiento de imágenes han sido utilizadas para estudiar los procesos de oscurecimiento enzimático de frutos, como por ejemplo Quevedo y col. (2011) emplearon el análisis de textura de imágenes para cuantificar el oscurecimiento de tres variedades de aguacates. En base a los resultados obtenidos, concluyen que en general, el parámetro de dimensión fractal puede ser usado para evaluar las cinéticas de oscurecimiento y discriminar entre variedades de aguacates.

También se han publicado trabajos de revisión acerca de las técnicas de PI; Du y Sun (2004) realizaron una revisión de los desarrollos y aplicaciones de las técnicas de PI para evaluar la calidad de los alimentos. En esta revisión mencionan a detalle las etapas del PI y hacen una recopilación de varios trabajos en donde se ha empleado esta herramienta para evaluar la calidad de diversos alimentos en base a características físicas. De esta revisión se extrajo información donde se muestran algunas de las aplicaciones que ha tenido esta herramienta para la evaluación de la calidad, empleando cámaras con dispositivos de carga acoplados (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Ejemplos de aplicaciones del procesamiento de imágenes para la evaluación de la calidad de alimentos mediante imágenes tomadas con una cámara con dispositivo de carga acoplado (Du y Sun, 2004).

Categoría	Productos	Aplicaciones	Referencias
Pescadería	Pescado	Clasificación de pescado	Zion et al. (1999)
Frutas	Manzana	Segmentación de defectos	Leemans et al. (1999)
	Cerezas	Análisis de la forma de la fruta	Beber et al. (2002)
Cereales	Arroz	Clasificación de calidad	Wan et al. (2002)
	Trigo	Clasificación	Utku and Koksel (1998)
Carne	Carne	Características de textura como indicadores de ternura	Li et al. (1999)
Vegetales	Espárragos	Inspección de defectos	Rigney et al. (1992)
Otros	Queso	Evaluación de las propiedades funcionales	Wang and Sum (2001)
	Pizza	Evaluación de calidad	Sun and Brosnan (2003)

3.1.2. Etapas de las técnicas de procesamiento de imágenes

Pedreschi y col. (2004) describen que generalmente las técnicas de PI consisten en cinco etapas (Figura 3.1): (1) operaciones para adquirir las imágenes en forma digital; (2) operaciones de pre-procesamiento para obtener mejores imágenes con las mismas dimensiones de la imagen original; (3) operaciones de segmentación de imagen para dividir la imagen digital en regiones; (4) operaciones de medición del objeto para medir las características de tamaño, forma, color y textura; y (5) operaciones de clasificación para identificar objetos y clasificarlos en grupos.



Figura 3.1. Etapas del procesamiento de imágenes (PI).

3.1.2.1. Adquisición de la imagen

La adquisición de la imagen se refiere a la captura de una imagen a su forma digital y es la primera etapa de las técnicas de PI. Diversos sensores han sido empleados para la captura de imágenes, las cámaras con dispositivo de carga acoplado (CCD por sus siglas en inglés) son los sensores que más se emplean para la evaluación de la calidad de alimentos ya que a través de las imágenes obtenidas por estos sensores se pueden evaluar características como tamaño, forma, color, textura y defectos externos. Sin embargo, este tipo de sensores no permiten evaluar la estructura interna de alimentos, por lo que existen otras tecnologías de adquisición de imágenes como el ultrasonido, la resonancia magnética nuclear y la tomografía computacional y eléctrica, los cuales proporcionan información de los atributos internos de los alimentos (Du y Sun, 2004).

La iluminación es un requisito importante en la adquisición de las imágenes para la evaluación de la calidad de un alimento. La calidad de la imagen capturada puede ser afectada en gran medida por las condiciones de iluminación, ya que estas influyen directamente sobre las características de textura de la imagen, la cual está determinada por

las escalas de grises de los píxeles que la conforman. Una imagen de alta calidad puede ayudar a reducir el tiempo en el procesamiento, en las siguientes etapas del PI y en consecuencia a reducir los costos del sistema del análisis de imágenes (Du y Sun, 2004; Pedreschi y col., 2004).

3.1.2.2 Pre-procesamiento de la imagen

El propósito del pre-procesamiento de la imagen es mejorar la información de la misma, en donde se pueden disminuir distorsiones o realzar algunas características de la imagen que son importantes para su futuro procesamiento y con esto crear una imagen mejor a la original. Existen dos tipos de propuestas para el pre-procesamiento de imágenes para evaluar la calidad de los alimentos: el pre-procesamiento por píxel y el pre-procesamiento local. Estas dos propuestas se basan en el cambio de los valores de los píxeles que conforman la imagen.

El pre-procesamiento por píxel puede ser entendido como una operación donde los valores de los píxeles son modificados aplicando una función específica de transformación y esta propuesta se emplea para realizar transformaciones en los espacios de color de las imágenes. En el área de alimentos la transformación más común que se realiza es entre el espacio de color RGB y el CIELab (Du y Sun, 2004). El pre-procesamiento local es un método por el cual se calcula un nuevo valor de píxel, basado en el promedio en los valores de brillo de los píxeles cercanos y esta propuesta se utiliza para mejorar los bordes o límites de las formas que se encuentran contenidas en una imagen (Du y Sun, 2004).

3.1.2.3 Segmentación de la imagen

La segmentación de la imagen consiste en identificar regiones de la imagen con el propósito de separar aquellas regiones de interés del fondo. Para la evaluación de calidad de alimentos, existen cuatro propuestas para realizar la segmentación de la imagen pero sólo dos son las más utilizadas: la segmentación basada en el thresholding y la segmentación basada en regiones. La primera consiste en segmentar objetos sólidos que poseen un contraste diferente del fondo y la segunda en separar regiones o grupos de píxeles que

tengan un mismo tono en escala de grises de una sección de la imagen (Du y Sun, 2004; Pedreschi y col., 2004).

3.1.2.4 Medición de las características del objeto

Después de detectar aquellas zonas de interés, el siguiente paso es la extracción de las características del objeto bajo estudio que se pueden clasificar en cuatro clases: tamaño, forma, color y textura (Du y Sun, 2004).

3.1.2.4.1 Tamaño y forma

Comúnmente los parámetros utilizados para medir el tamaño de un objeto son el área, perímetro, longitud y diámetro; pero la medición más conveniente para evaluar esta característica es el área. Por otra parte el diámetro de un objeto se utiliza para discriminar entre dos objetos de formas diferentes. De la revisión hecha por Du y Sun (2004) recopilamos los siguientes trabajos como ejemplo: Monnin (1994) diseñó un sistema para un proceso de cocimiento de galletas en línea donde se midió el diámetro, el área y el espesor de las galletas. La longitud y el ancho de un objeto pueden ser usados también para medir el tamaño; por ejemplo, Van Eck y col. (1998) desarrollaron un método exacto para medir la longitud, el ancho y la forma de pepinos.

La forma es una de las mediciones más comunes que se realizan en los alimentos, en comparación con las características de textura y color. La medición de la forma es fácil utilizando el procesamiento de imágenes. Frecuentemente los objetos de una clase pueden distinguirse de otros por su forma, ya que estas son mediciones físicas características. En la Tabla 3.2 se muestran algunas características de forma comúnmente evaluadas en el área de alimentos.

Tabla 3.2. Características de forma combinadas con tamaño.

Área Radio	$\frac{\text{Área}}{\text{DiámetroMáximo} * \text{DiámetroMínimo}}$
Aspecto Radio	$\frac{\text{DiámetroMáximo}}{\text{DiámetroMínimo}}$
Circularidad	$\frac{\text{Perímetro}^2}{\text{Área}}$
Compacticidad	$\frac{4\pi\text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$
Factor de Forma 2	$\frac{\text{DiámetroMáximo}}{\text{Área}}$
Factor de forma 3	$\frac{\text{Área}}{\text{DiámetroMáximo}^3}$

Fuente: Du & Sun, 2004

3.1.2.4.2 Color

El color en los alimentos es un atributo de calidad muy importante tanto para productores como para consumidores, ya que este proporciona información acerca del estado de madurez del fruto. La evaluación del color mediante la inspección sensorial humana es una práctica común dentro del área de alimentos, sin embargo, este es un proceso tedioso, subjetivo, consume demasiado tiempo y es laborioso; por otro lado existen técnicas instrumentales como el uso de colorímetros que permiten medir el color de alimentos, pero con la limitante de que son mediciones puntuales (Pedreschi y col., 2004; Papadakis y col., 2004). Las técnicas de PI permiten medir el color de imágenes digitales de forma exacta y no invasiva a partir de los valores de los píxeles de la imagen (Du y Sun, 2004).

Para realizar la medición de color en una imagen es necesario seleccionar un espacio de color; existen cuatro espacios de color que son los más utilizados: CIELab, RGB (red,

green, blue), XYZ, y el CMYK (cyan, magenta, yellow y black). El espacio de color CIELab es el que más se utiliza para medir el color en el área de alimentos. Este espacio de color es una medición de color estándar internacional, adoptada por la Commission Internationale d'Éclairage (CIE) en 1976. Una de las ventajas de este espacio de color es que crea siempre un color constante, sin importar el tipo de dispositivo para generar la imagen (por ejemplo monitor, impresora o escáner). En este espacio L^* significa luminosidad y su rango es de 0-100, mientras que los parámetros a^* (verde a rojo) y b^* (azul a amarillo) son dos componentes cromáticos y su rango de valores es de -120 a 120 (Pedreschi y col., 2004; Papadakis y col., 2000; Mendoza y col., 2004).

3.1.2.4.2 Análisis de textura de imágenes

El análisis de textura de imágenes ha surgido con el propósito de medir de manera cuantitativa los cambios microestructurales de alimentos a partir de imágenes (Quevedo y col., 2008). La textura es un atributo representando por el arreglo espacial en niveles de grises de los píxeles de un objeto o región de interés de una imagen, la cual cuantifica algunas características visuales dentro de la imagen como la rugosidad de objetos (Haralick y col., 1973; Du y Sun, 2004). Además, la textura de una imagen ha sido utilizada para describir propiedades tales como regularidad u homogeneidad (Pedreschi y col., 2004). Una gran cantidad de métodos para analizar la textura han sido desarrollados y dos de los más empleados son el algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises (GLCM por sus siglas en inglés) y el algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas (SDBC por sus siglas en inglés).

- **Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises**

El algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises se basa en la idea de que una imagen puede ser analizada a través del número de píxeles o cuadros que la forman en dirección horizontal N_x y en dirección vertical N_y . Además cada uno de estos píxeles tiene un valor en tono de gris que es cuantificado hasta N_g niveles. Por lo tanto, considerando lo anterior, una imagen puede ser representada como una función, la cual asigna diversos

tonos de grises para cada pixel o conjunto de pixeles y a partir de esta información se puede caracterizar la textura de una imagen.

A partir de este algoritmo, se pueden extraer varios parámetros de textura, algunos de los cuales se relacionan con características como la homogeneidad, contraste y la presencia de estructuras organizadas dentro de la imagen. A continuación se definen brevemente algunos de los parámetros de textura basados en éste algoritmo. La energía mide la uniformidad textural de la imagen y es un parámetro opuesto a la entropía. El parámetro de energía también es conocido como uniformidad, uniformidad de energía y segundo momento angular. El contraste es una medida de las variaciones locales de los valores en escala de grises de los pixeles de una imagen. El contraste también es conocido como varianza o inercia. El parámetro de homogeneidad, también llamado como diferencia de momento inverso es una medida similar a la energía; la cual también representa la homogeneidad local de la imagen. Y por último, la entropía mide el desorden o aleatoriedad de las imágenes y puede ser usado para caracterizar la textura de la imagen y es un indicativo de la complejidad dentro de la imagen, por lo tanto, imágenes complejas tendrán altos valores de entropía (Haralick y col., 1973; Fernández, Castellero, & Aguilera, 2005; Mendoza y col., 2007).

- **Dimensión fractal o textura fractal**

Otro método usado para la descripción de la textura es la dimensión fractal. Fractal es una palabra inventada por Mandelbrot, que proviene del latín “*fractus*” que significa roto y el correspondiente verbo en Latin “*frangere*” que significa “romper para crear fragmentos irregulares”. La descripción de los objetos irregulares fue desarrollada ampliamente desde el punto de vista de la teoría fractal por Mandelbrot en su obra titulada “The Fractal Geometry of Nature”, en donde se refiere a la geometría de lo irregular o formas fragmentadas de objetos naturalmente comunes tales como líneas costeras, nubes y objetos matemáticos que tienen dimensiones no enteras, por lo tanto la dimensión fractal tiene valores no enteros (Mandelbrot, 1977).

A partir de la geometría fractal, se puede inferir que si una línea que tiene una dimensión de uno trata de ocupar un área, el valor de esta nueva línea estaría entre uno y dos; y de la misma forma si se tiene un área que tiene una dimensión de dos, pero esta sufre una serie de alteraciones y por lo tanto tiende a ocupar un volumen, el valor de esta área estaría entre dos y tres. Con base a lo anterior, es posible utilizar la definición de dimensión fractal para caracterizar la textura de superficies, y ésta se expresaría como una medida de la rugosidad o irregularidad de la superficie de una imagen (Quevedo y col., 2008).

Mediante una imagen en escala de grises, es posible obtener un área que represente la textura de la superficie de la imagen, esto considerando los niveles en escala de grises de los píxeles. A la superficie generada a partir de la imagen en escala de grises se le llama superficie de intensidad (Quevedo y col., 2008). A la dimensión fractal de superficies también se le puede llamar dimensión fractal de textura. Para calcular la dimensión fractal de textura de superficies existen distintos métodos, uno de los más empleados es el Método de Conteo Diferencial de Cajas, el cual consiste en la determinación de áreas de una imagen usando un algoritmo de geometría cuadrangular (caja o celda) de diferentes tamaños, con el cual se mide el perímetro o área que ocupa el objeto. Los valores obtenidos del número de cajas (N) contra el tamaño de la caja (r); se representa en un gráfico logarítmico, y la pendiente de este gráfico representa la dimensión fractal (Chanona, 2004).

3.1.2.5 Clasificación

La clasificación es la última etapa del análisis de imágenes y consiste en clasificar los objetos identificados de las imágenes dentro de un número de clases determinado en base a las características que se midieron. Los tres métodos principales que se encuentran en la literatura para realizar la clasificación son: estadístico, lógica difusa y redes neuronales artificiales (Du y Sun, 2004; Du y Sun, 2006), aunque otros métodos también han sido utilizados como el algoritmo de clasificación KNN (K-Nearest Neighbors).

3.2 Películas comestibles

3.2.1 Definición y aplicación

Las películas comestibles se definen como una o varias capas delgadas de un material que puede ser consumido por los seres humanos y se utilizan para mantener la calidad y extender la vida de anaquel de productos frescos y mínimamente procesados (Peressine y col., 2003; Bravin y col., 2006; Fernández y col., 2007; Lin & Zhao, 2007). Las películas comestibles actúan como una barrera semipermeable a la transferencia de agua, oxígeno, dióxido de carbono, etileno y compuestos volátiles (Figura 3.2) (Lee y col., 2003, Lin & Zhao, 2007; Maia y col., 2007). La importancia de controlar la transferencia de estos gases radica en el propósito de disminuir la velocidad del proceso de maduración de frutas y verduras, además, de evitar el deterioro de productos alimenticios.

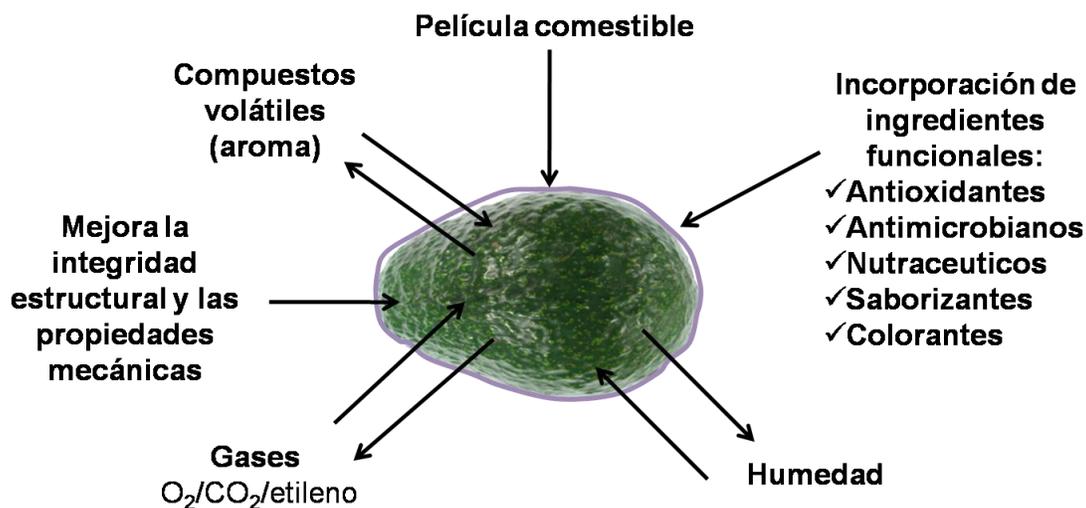


Figura 3.2. Propiedades funcionales de películas comestibles.

(Modificada de Lin y Zhao, 2007).

Por otra parte, las películas comestibles también ayudan a mejorar la integridad estructural y las propiedades mecánicas de los alimentos (Maftoonazad & Ramaswamy, 2005; Lin & Zhao, 2007). Otra ventaja que ofrecen estas películas es que actúan como medios transportadores de ingredientes funcionales como agentes antioxidantes y antimicrobianos,

nutraceuticos, saborizantes y colorantes; con el fin de mejorar la calidad y seguridad de los alimentos (Jagannath y col., 2006; Pérez y col., 2006; Ozdemir & Floros, 2008). En la Figura 3.2 se muestra un esquema que ejemplifica las propiedades funcionales de las películas comestibles en frutas y vegetales frescos.

El control de fenómenos tales como la permeación, la adsorción y la difusión de agua, oxígeno y dióxido de carbono, son la principal función de las películas comestibles (Lin y Zhao, 2007). En frutas y vegetales las películas comestibles son usadas con el propósito de tener un control y modificar la atmosfera interna, con el fin de disminuir la respiración y la velocidad de reacciones enzimáticas (Ribeiro y col., 2007; Lin y Zhao, 2007). Las propiedades funcionales de las películas dependerán de los materiales que se empleen para su fabricación. Lin y Zhao (2007) realizaron una tabla donde recopilaron los valores de permeabilidad de oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua de polímeros sintéticos y de biopolímeros que se utilizan para la elaboración de películas comestibles. Ellos observaron que los materiales de naturaleza hidrofílica, como proteínas y polisacáridos no son buenas barreras para el control de la pérdida de humedad. Por otro lado, los materiales de naturaleza hidrofóbica como lípidos y resinas resultaron ser mejores barreras para el control de la pérdida de humedad.

3.2.2 Materiales empleados para la fabricación de películas comestibles

Biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos y lípidos o combinaciones de estos, son los materiales que se utilizan para la elaboración de películas o recubrimientos comestibles (Figura 3.3) (García y col., 2004; Maftoonazad & Ramaswamy, 2005; Perez y col., 2006; Ribeiro y col., 2007).

La funcionalidad de las películas dependerá en gran medida de las características físicas y químicas de los biopolímeros seleccionados (Ozdemir & Floros, 2008). Existen diversas investigaciones donde se han elaborado películas comestibles a partir de diversos materiales por ejemplo: Lin y Zhao (2007) realizaron una revisión acerca del desarrollo y la aplicación de películas comestibles en frutas y vegetales frescos y mínimamente

procesados, dentro de esta revisión los autores señalan algunos ejemplos de alimentos a los cuales se les han aplicado películas comestibles utilizando diversos biopolímeros, tales como manzanas, fresas y aguacates por mencionar algunos.

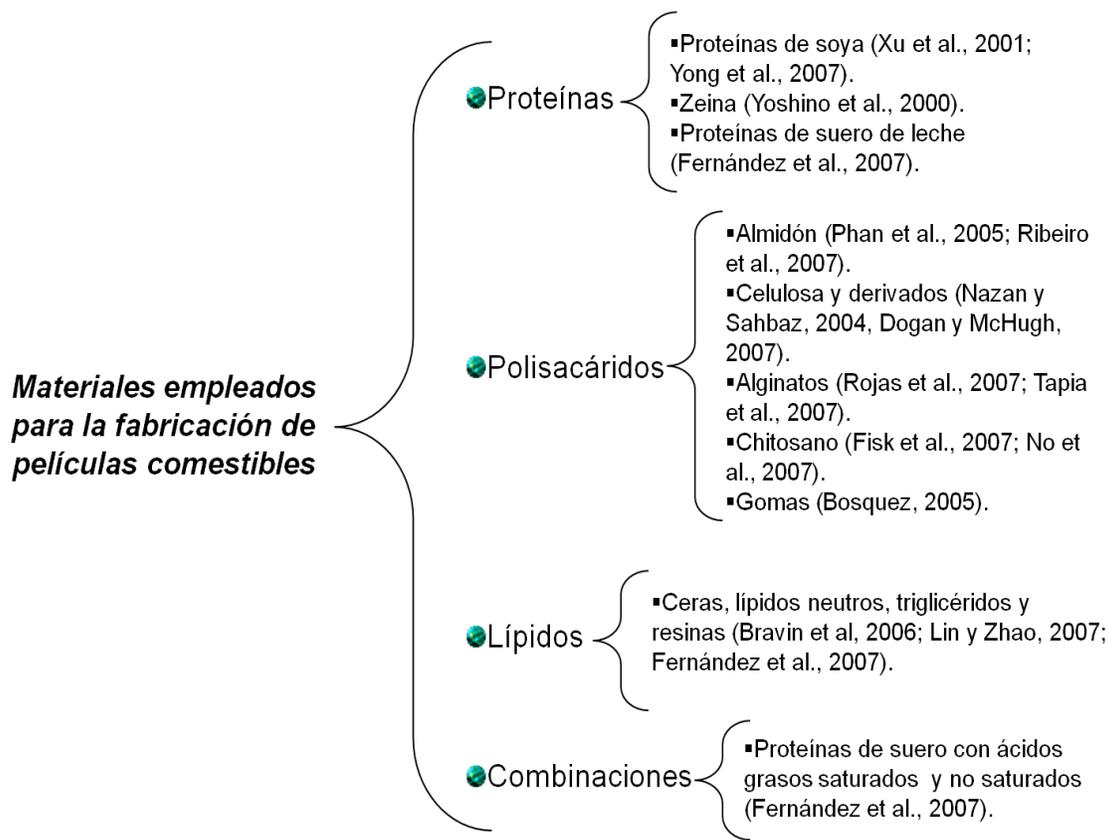


Figura 3.3. Diagrama de los materiales empleados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles.

3.2.2.1 Lípidos

Ceras, lípidos neutros, triglicéridos y resinas son empleados para la elaboración de películas y revestimientos comestibles (Bravin y col., 2006; Lin & Zhao, 2007; Fernández y col., 2007). Entre las ventajas que ofrecen las películas hechas de estos materiales son, la buena barrera a la pérdida de humedad, además de que mejoran la apariencia superficial de los alimentos impartiendo brillo. Por otro parte, algunas películas lipídicas producen una superficie grasosa y propiedades organolépticas indeseables, que como consecuencia

pueden provocar un restringido intercambio de gases. Lo anterior con lleva a una modificación de la atmosfera interna de los alimentos afectando la respiración aerobia y produciendo compuestos indeseables como etanol, acetaldehídos y altas concentraciones de dióxido de carbono (Lin y Zhao, 2007).

3.2.2.2 Polisacáridos

Otro tipo de materiales que se han utilizado para elaborar películas comestibles son los polisacáridos, dentro de los cuales se encuentran el almidón (Phan y col., 2005; Ribeiro y col., 2007), la celulosa y sus derivados (Nazan & Sahbaz, 2004; Maftoonazad & Ramaswamy, 2005; Dogan & McHugh, 2007), alginatos (Rojas y col., 2007; Tapia y col., 2007), quitosano (Fisk y col., 2007; No y col., 2007; Chien y col., 2007; Meng y col., 2008) y gomas (Bosquez, 2007). Debido a las buenas propiedades barrera a gases como O₂ y CO₂, los polisacáridos son empleados principalmente para modificar la atmosfera interna de frutas y vegetales con el propósito de reducir la respiración (Lin y Zhao, 2007).

El quitosano es uno de los polisacáridos más utilizados para la elaboración de películas comestibles debido a sus propiedades funcionales y de barrera. El quitosano es un polímero obtenido de la desacetilación de la quitina, que es un polisacárido natural encontrado en el exoesqueleto de crustáceos y en la pared celular de hongos (No y col., 2007). La estructura química del quitosano, está compuesta de residuos de (1-4) N-acetil-β-D glucosamina y (1-4) β-D glucosamina (Ostrowska-Czubenko & Gierszewska-Druzynska, 2009). La principal ventaja del quitosano es su fuerte actividad antimicrobiana y antifúngica a un gran rango de microorganismo (Aider, 2010). Diversos autores han estudiado las propiedades funcionales de películas hechas a base de quitosano para mejorar la calidad y extender la vida de anaquel de los alimentos (García y col., 2004; Chien y col., 2007; Maia y col., 2007; Chien y col., 2007; Fisk y col., 2007; Meng y col., 2008). Como ejemplo: No y col. (2007) hicieron una revisión de las aplicaciones del quitosano para mejorar la calidad y la vida de anaquel de alimentos. En esta revisión se resaltan las propiedades funcionales de las películas de quitosano, siendo la más relevante su actividad antimicrobiana y fungicida, por otra parte, también se mencionan los diversos tipos de alimentos a los cuales se les han

aplicado películas hechas a base de este polisacárido, además de las futuras investigaciones que se necesitan para conocer más acerca de las propiedades de este compuesto.

Los alginatos son otro tipo de polisacáridos que se han utilizado ampliamente por sus buenas características para formar películas, además de que actúan como buenas barreras a la transferencia de oxígeno (Lin y Zhao, 2007). Los alginatos son biopolímeros estructurales extraídos de las algas marinas pardas (Sime, 1990) y están compuestos de unidades de (1-4) β -D-manurato (M) y (1-4) α -L-galuronato (G) (Ostrowska-Czubenko & Gierszewska-Druzynska, 2009). Estas unidades están arregladas en bloques G, bloques M y secuencias alternadas de bloques G-M formando la estructura polimérica; el arreglo secuencial dependerá de diferentes factores tales como la especie, edad o partes de las algas de donde es obtenido el material (Rhim, 2004; Da Silva y col., 2000; Ashikin y col., 2010). Debido a sus buenas propiedades formadoras de película, existen en la literatura, estudios que relacionan las aplicaciones de películas comestibles de alginato sobre frutas y vegetales (Amanatidou y col., 2000; Tay & Perera, 2004; Lin, & Zhao, 2007; Olivas y col., 2007; Tapia y col., 2007; Rojas-Graü y col., 2007a; Rojas-Graü y col., 2007b).

Por ejemplo, Tapia y col. (2007) estudiaron el efecto que tienen películas hechas a base de alginato sobre la calidad de cortes frescos de manzana y papaya. Adicionalmente, estudiaron las propiedades acarreadoras de estas películas adicionando sobre ellas un probiótico y otros ingredientes funcionales como antioxidantes. Ellos concluyeron que las películas hechas con dichas formulaciones pueden ser empleadas para mantener la calidad de alimentos, además de que el alginato fue un excelente acarreador de diversos ingredientes funcionales (probióticos y antioxidantes).

3.2.2.3 Proteínas

Otro tipo de material, que se ha empleado para hacer películas comestibles son las proteínas. Proteínas de origen vegetal como proteínas de soya (Xu y col., 2001; Yong y col., 2007) y zeína (Yoshino y col., 2000); así como proteínas de origen animal como

proteínas de suero de leche (Fernández y col., 2007), han sido utilizadas en diversos estudios para la elaboración y caracterización de biopelículas.

3.2.2.4 Combinaciones de biomoléculas

En años recientes, diversos estudios han sido desarrollados con el objetivo de elaborar y caracterizar películas comestibles hechas a base de mezclas de polisacáridos, proteínas y de lípidos, para mejorar las propiedades funcionales (Bravin y col., 2006; Fernández y col., 2007). Lo anterior se basa en el hecho, de que cada material por si solo ofrece propiedades únicas, y si éstos se combinan se pueden obtener propiedades mejores que aumentan la funcionalidad de las películas. Fernández y col. (2007) estudiaron el efecto que tiene la adición de ácidos grasos saturados y no saturados sobre las propiedades funcionales de películas hechas de aislado de proteína de suero. Los resultados que obtuvieron mostraron que las propiedades mecánicas son las que más se ven afectadas dependiendo del tipo de ácido graso empleado y que la permeabilidad al vapor de agua no mostró diferencias significativas al adicionar diferentes tipos de ácidos grasos a diferentes concentraciones. Por otro lado, Bravin y col. (2006) desarrollaron películas de almidón y metilcelulosa con aceite de soya. Ellos aplicaron diferentes formulaciones de películas, sobre hojuelas de cereal que tienen una baja actividad de agua y estudiaron sus propiedades mecánicas y de permeabilidad, así como un análisis estructural mediante microscopia electrónica de barrido ambiental.

3.2.3 Métodos de elaboración de películas comestibles

Las películas comestibles pueden ser formadas mediante dos procesos principalmente: un proceso húmedo, en el cual los biopolímeros son dispersos o solubilizados para generar una solución formadora de película, seguido de una evaporación del solvente; y el proceso seco el cual se basa en el comportamiento termoplástico exhibido por algunas proteínas y polisacáridos a bajos niveles de humedad en el moldeo por compresión y extrusión (Nussinovitch, 2010). Es importante mencionar que el proceso húmedo, es el más utilizado en investigaciones de películas comestibles, debido a su sencillez y a que se pueden

incorporar fácilmente ingredientes funcionales sobre las soluciones formadoras de películas.

Por otra parte, debido al desarrollo de la nanotecnología se han propuesto métodos para la elaboración de películas comestibles con espesores nanométricos. Una técnica de fabricación de nanoestructuras que se basa en la propuesta “bottom-up” es la técnica de autoensamblaje “Capa por Capa” (LbL, por sus siglas en ingles), mediante la cual se pueden fabricar películas de escalas nanométricas teniendo un control preciso del espesor y de la uniformidad de estas (Varahramyan y Lvov, 2007). La técnica LbL se basa en la adsorción alternada de polielectrólitos cargados opuestamente contenidos en solución, sobre un substrato solido con superficie cargada (Figura 3.4) (Sui, 2004; Cai y col., 2005; Serizawa y col., 2006; Varahramyan & Lvov, 2007). En diversos trabajos publicados, se ha propuesto el utilizar esta técnica para la elaboración de películas comestibles de tamaño nanometrico, su importancia radica en poder combinar las propiedades individuales de dos o más materiales diferentes de manera ordenada y jerarquizada.

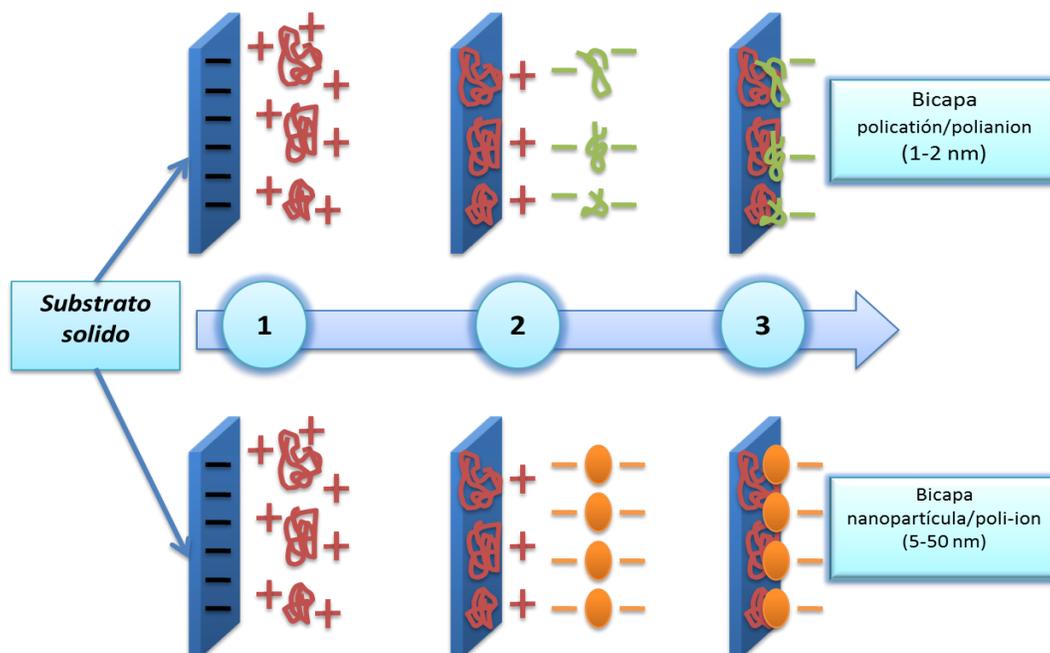


Figura 3.4. Esquema del ensamblaje “Capa por Capa”.

3.2.4 Métodos y técnicas empleados para la caracterización de películas comestibles

Para evaluar la funcionalidad de las películas comestibles aplicadas sobre frutas y vegetales (recubrimientos), diversos parámetros de calidad de los alimentos son usualmente medidos como indicadores, entre ellos destacan la pérdida de peso (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005), la velocidad de respiración (Lee y col., 2003), la textura (Maftoonazad y col., 2007), el color (Jagannath y col., 2006), pH (Chien y col., 2007), la acidez total (Chien y col., 2007) y el contenido de sólidos solubles (Meng y col., 2008). Por otra parte, también se hacen mediciones directas para evaluar las propiedades de las películas comestibles. Entre las mediciones más importantes destacan la permeabilidad al agua y a gases (Nazan & Sahbaz, 2004), el espesor de la película (Tapia y col., 2007), la solubilidad de la película (García y col., 2004), propiedades mecánicas (Bravin y col., 2006), color y opacidad (y col., 2007), mediciones reológicas (Peressini y col., 2003), la humectabilidad de la superficie (Ribeiro y col., 2007) y estudios de morfología y microestructura (Yoshino y col., 2000).

3.2.4.1 Caracterización microestructural

Las técnicas de microscopía han sido herramientas útiles para conocer la arquitectura y microestructura de películas comestibles a escalas micro y nanométricas. La Microscopía de Luz, Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés), y la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) son las técnicas más usadas en investigaciones de películas comestibles para la caracterización de la microestructura y topografía (Phan y col., 2005; Villalobos y col., 2005; Silva y col., 2007; Veiga-Santos y col., 2008; Fahs y col., 2010). Por otra parte, la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y la Microscopía Confocal de Barrido Laser (CSLM por sus siglas en inglés) han sido usadas para caracterizar la ultraestructura y para realizar observaciones específicas de algunas biomoléculas en la matriz de las películas comestibles, respectivamente (Denavi y col., 2009; Andreuccetti y col., 2009). La información observada en relación a la morfología y microestructura de las películas dependerá de la técnica de microscopía y del nivel de magnificación usados. La mayoría de las técnicas de microscopía mencionadas anteriormente sólo llevan a cabo un análisis de

manera cualitativa, a excepción del AFM que provee información cuantitativa de la rugosidad de la superficie expresada con valores de R_a y R_q (Villalobos y col., 2005; Osés y col., 2009). Debido a lo anterior, resultaría interesante aplicar el análisis de textura de imágenes, a las micrografías de películas comestibles obtenidas mediante las técnicas mencionadas, con el propósito de caracterizar cuantitativamente su microestructura y morfología.

3.2.4.2 Caracterización mecánica mediante la técnica de nanoindentación

Las propiedades mecánicas son otros de los parámetros que se determinan para caracterizar las propiedades físicas de las películas comestibles. Resistencia a la tracción, porcentaje de elongación al quiebre y el módulo de elasticidad son parámetros que se miden tradicionalmente a las películas comestibles utilizando un texturómetro. Es posible que las propiedades que se determinan a nivel macro sean completamente diferentes a las propiedades mecánicas a nivel micro y nano, y por lo tanto resulta interesante poder conocer dichas propiedades a estas escalas. Hoy en día, es posible caracterizar las propiedades nanomecánicas de películas delgadas y de diferentes tipos de materiales utilizando la técnica de nanoindentación. La técnica de nanoindentación ha surgido recientemente como una herramienta útil para la medición de propiedades mecánicas a nano y micro escala de diversos tipos de materiales biológicos y no biológicos (Ebenstein y Pruitt, 2006). La técnica consiste en aplicar una carga con una punta de diamante de geometría conocida sobre la superficie de la muestra para provocar una deformación local (Lucca y col., 2010). Una curva de carga-desplazamiento se obtiene después de la prueba de indentación y a partir de ésta se determina el área de la impresión residual y consecuentemente, se pueden determinar, parámetros tales como la dureza y el módulo de elástico empleando el método de Oliver-Pharr (Fischer-Cripps, 2006).

En la literatura son escasos los estudios que reportan el uso de la técnica de nanoindentación para determinar las propiedades mecánicas a nano y micro escala de películas comestibles. Por lo tanto, más estudios con relación a la aplicación de esta técnica en películas comestibles deberán ser desarrollados con el propósito de conocer las

propiedades nanomecánicas así como comportamientos viscoelásticos que probablemente posean.

3.3 Proceso de maduración del aguacate variedad Hass (*Persea americana* Mill)

Por otro lado las técnicas de procesamiento de imágenes han sido aplicadas para caracterizar características y defectos físicos de diversas frutas y vegetales, sin embargo, existen pocos estudios en relación al fruto del aguacate variedad Hass que es uno de los principales productos que se exportan en México debido a su valor comercial y nutricional.

De acuerdo a la norma mexicana NMX-FF-016-2002, el aguacate variedad Hass se define como: el fruto de *Persea americana* Mill, cuya cáscara es de textura rugosa a semirrugosa; esta característica es uniforme en toda la superficie, su forma es semiredonda hasta aplanada; su color característico es del verde mate al negro y su pulpa es verde amarillenta, suave y sin fibra (tipo mantequilla).

Durante la maduración de los aguacates, el color de la cáscara cambia de verde a negro/purpura (Cox y col., 2004), estos cambios son principalmente provocados por la degradación de la clorofila y a un incremento en la concentración de carotenoides y antocianinas (Toivonen & Brummell, 2008). La firmeza es un buen indicador para evaluar el proceso de maduración del aguacate Hass (Hertog y col., 2003). Por lo tanto, los cambios de color y la pérdida de firmeza son los parámetros de calidad que se evalúan de manera tradicional para determinar la madurez de este tipo de frutos.

La firmeza puede ser evaluada mediante métodos invasivos (inspección manual) y destructivos (penetrometros), pero el problema es que mediante estos métodos destructivos tradicionales la calidad del fruto podría verse disminuida, debido a que cuando el fruto está maduro, este podría fácilmente ser dañado (Ochoa y col., 2009). Por esta razón, nuevas técnicas no invasivas han sido propuestas. Métodos no invasivos tales como acústicos, espectroscópicos y técnicas de procesamiento de imágenes, incluyendo técnicas de imágenes multi e hiper-espectrales, han sido ampliamente aplicados para evaluar la calidad

de alimentos. Sin embargo, los métodos acústicos y espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética nuclear, resonancia magnética de imágenes) podrían ser relativamente costosos y laboriosos; y un gran número de muestras así como grandes áreas de laboratorio son requeridos. Además mediante estas técnicas no se podrían realizar mediciones en línea, en comparación con las técnicas de PI (Du & Sun, 2004; Butz y col, 2005; Nicolai y col., 2007; Cubero y col., 2011).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las técnicas de PI juegan un papel importante en la evaluación de calidad de alimentos debido a que son exactos y eliminan la subjetividad de las inspecciones manuales. Debido a las ventajas que tienen las técnicas de PI, estas podrían ser empleadas para evaluar los cambios que ocurren durante la maduración del aguacate Hass; y además los parámetros evaluados podrían ser útiles para el diseño de un clasificador de etapas de madurez en base a los valores de dichos parámetros.

4. JUSTIFICACIÓN

El estudio microestructural de películas comestibles usando diversas técnicas de microscopía en su mayoría es sólo de carácter cualitativo, a excepción de la microscopía de fuerza atómica que proporciona algunos parámetros de rugosidad tales como R_a y R_q . Por tal razón, con el propósito de llevar a cabo un análisis cuantitativo de la microestructura de películas comestibles se propone emplear el análisis de textura de imágenes, que es una herramienta que proporciona diferentes parámetros de textura basados en algoritmos tales como la Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises y el algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas. Además, este tipo de análisis ha sido escasamente aplicado a la caracterización de películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.

Por otro lado, la nanoindentación es una técnica relativamente nueva que ha tenido un gran desarrollo debido a que permite caracterizar propiedades mecánicas a escalas micro y nanométricas de materiales biológicos y no biológicos. En la literatura, existen pocos trabajos donde se ha utilizado la técnica de nanoindentación para obtener propiedades nanomecánicas de películas comestibles, por lo que resulta de gran interés el aplicar esta técnica para dilucidar dichas propiedades a tales escalas, así como el examinar posibles comportamientos viscoelásticos de los biomateriales bajo estudio.

También, el análisis de textura de imágenes podría ayudar a caracterizar cuantitativamente los cambios superficiales que ocurren en frutos como el aguacate Hass durante el proceso de maduración y en consecuencia se podrían utilizar los parámetros extraídos de dicho análisis para desarrollar un clasificador de etapas de madurez. Estudios de este tipo no han sido realizados para este fruto.

5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

5.1. Objetivo general

- Aplicar el análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de dos casos de estudio de superficies biológicas: (i) películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano, y (ii) cáscara de aguacate variedad Hass (*Persea americana* Mill) durante el proceso de maduración.

5.2. Objetivos específicos

- Elaborar películas comestibles hechas a base de alginato, alginato/quitosano y quitosano mediante la técnica de vaciado y evaporación de solvente, así como también caracterizar algunas propiedades físicas de interés tales como espesor, color y brillo.
- Realizar un estudio acerca del efecto que tienen las variables de la prueba de nanoindentación (carga máxima, tiempo de pausa y velocidad de carga y descarga) sobre las propiedades nanomecánicas (dureza, modulo elástico y desplazamiento de indentación) de películas comestibles, y posteriormente determinar dichas propiedades para su caracterización.
- Caracterizar de manera cualitativa y cuantitativa la microestructura de las superficies de las películas comestibles mediante técnicas de microscopia (Microscopía de Luz, Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental y Microscopía de Fuerza Atómica) y análisis de textura de imágenes (algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises y algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas).

- Caracterizar cuantitativamente los cambios de color y de textura de la cáscara de aguacate Hass durante su maduración mediante técnicas de procesamiento de imágenes y utilizar dichos parámetros para clasificar imágenes en función de etapas de madurez del aguacate.

5.3. Hipótesis

El análisis de textura de imágenes podría ser una herramienta eficaz para la caracterización cuantitativa de las superficies de películas comestibles examinadas bajo diferentes técnicas de microscopía, así como también para evaluar los cambios superficiales de la cáscara de aguacate variedad Hass. La información obtenida a partir de dicho análisis, podría ser empleada para correlacionarla con algunas propiedades físicas y mecánicas de películas comestibles y para desarrollar un clasificador de las etapas de madurez del aguacate Hass.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Caracterización de películas comestibles de alginato y quitosano

6.1.1 Soluciones formadoras de películas

Los biopolímeros alginato y quitosano fueron seleccionados como modelos para probar la eficacia del Análisis de Textura de Imágenes para la evaluación cuantitativa de la microestructura de películas debido a dos razones principales: (i) estos polímeros presentan una buena compatibilidad entre ellos y presentan diferentes microestructuras con morfologías bien definidas y (ii) son biopolímeros ampliamente usados para la preparación de películas y recubrimientos comestibles debido a sus excelentes propiedades funcionales y de formación de películas (Lin & Zhao, 2007).

Por lo tanto, alginato de sodio (Sigma: 180947) y quitosano de bajo peso molecular (Sigma: 448869) con grado de desacetilación de 75-85% fueron usados para la elaboración de películas comestibles. Glicerol (Sigma: G5516) fue usado como plastificante para mejorar las propiedades mecánicas. Soluciones de alginato de sodio al 1% (peso/volumen) fueron preparadas con agua destilada a temperatura ambiente empleando un agitador magnético (Barnstead International, USA) durante un periodo de 1 hora. Después de terminado este tiempo, el glicerol fue adicionado a una proporción de 0.6 g glicerol/1 g polisacárido y la agitación continuo durante 20 minutos más. Por otra parte, se preparó una solución de quitosano al 1% (peso/volumen) con una solución de ácido acético al 1% (peso/volumen) en agua destilada; esta solución se mantuvo en agitación por 12 horas a 80 °C para solubilizar completamente el chitosano. Después de este tiempo, el glicerol fue adicionado a la misma proporción que se utilizó para las soluciones de alginato y la agitación continuó durante 20 minutos. Para la elaboración de películas combinando ambos polisacáridos, soluciones de alginato/quitosano fueron preparadas mediante la mezcla de las soluciones puras de alginato y quitosano a una proporción de 1:1 y estas soluciones fueron agitadas por 30 minutos. Con el fin de obtener una mezcla homogénea de los polisacáridos, la solución de quitosano fue agregada con un flujo constante a la solución de alginato la cual

era agitada. El glicerol y el ácido acético fueron grado analítico. Todos los reactivos fueron proveídos por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

6.1.2 Formación de películas

Las películas comestibles fueron obtenidas empleando la técnica de vaciado de la solución y evaporación del solvente. Para la formación de las películas, 15 gramos de las soluciones (alginato, quitosano, alginato/quitosano) fueron vaciados dentro de cajas petri de vidrio de 60 x 15 mm (Pyrex, USA) y fueron secadas a una temperatura de 60 °C hasta peso constante. Una vez que las películas estuvieron formadas, éstas fueron removidas desde las cajas petri y las muestras fueron acondicionadas en un desecador con una humedad relativa de 57% (solución saturada de bromuro de sodio) a temperatura ambiente durante 48 horas antes de los análisis.

6.1.3 Determinación de propiedades físicas

6.1.3.1 Espesor

El espesor de las películas fue medido usando un micrómetro digital (IP54, Fowler, China) con una sensibilidad de 0.2 μm . Las películas fueron colocadas entre los palpadores del micrómetro y la medición se tomó en la primera indicación de contacto entre la película y los palpadores. Diez mediciones sobre diferentes posiciones de cada muestra fueron realizadas y este análisis se hizo por triplicado para muestras del mismo tipo.

También se midió el espesor de las películas empleando un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM por sus siglas en inglés, Environmental Scanning Electronic Microscope) (ESEM XL 30, Phillips, Holanda). Para medir de manera exacta el espesor de las películas, muestras de las películas se sumergieron en nitrógeno líquido por un lapso de 3 segundos, inmediatamente después se aplicó fuerza sobre la película para fracturarla. Las secciones transversales de las películas fueron observadas a 10kV con el detector de electrones gaseosos secundarios y a una magnificación de 500x. Las micrografías fueron almacenadas en formato de no compresión TIFF a una resolución de 712 x 484 pixeles. Un total de 5 mediciones se tomaron para cada micrografía y esto se hizo por triplicado. Se

emplearon tres especímenes de cada tipo de película. Además, la metodología descrita anteriormente fue de gran utilidad para observar la microestructura de la sección transversal de las películas comestibles.

6.1.3.2 Color

El color de las películas se midió utilizando un colorímetro Minolta serie CR400 con fuente de iluminación D₆₅ (Osaka, Japón). Antes de realizar las mediciones a las películas, el colorímetro fue calibrado con un plato de referencia (Y=93.7, x=0.3159, y= 0.3324). Los valores de color fueron expresados en las coordenadas del espacio de color CIELab, donde L* representa la luminosidad y tiene valores entre 0 y 100, a* (verde a rojo) y b* (azul a amarillo) son coordenadas de cromaticidad y se les asignan valores de -120 a 120. Para realizar las mediciones, las películas se colocaron sobre el plato de calibración del colorímetro (García y col., 2004). Un total de 5 mediciones sobre la superficie de una película se realizaron y un valor promedio de dichas mediciones se obtuvo con el colorímetro; la medición fue repetida tres veces para cada película y tres especímenes de cada película fueron utilizados. Asimismo, se determinó la diferencia de color (ΔE) de las películas con respecto al plato de calibración mediante la siguiente fórmula (6.1) (Rivero y col., 2009):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (6.1)$$

Donde de la ecuación anterior L*, a* y b* corresponden a los valores de color de la película, mientras que L*₀, a*₀ y b*₀ a los valores del plato de calibración.

6.1.3.3 Brillo

El brillo de las películas fue medido a ángulos de 20°, 60° y 85° desde la normal de la superficie de las películas de acuerdo a la norma internacional ASTM D-523 mediante un brillómetro (MG268-F2, China). Secciones de las películas de 1.5 cm x 4 cm de tamaño fueron colocados sobre el plato de referencia del instrumento, el cual tiene un valor de brillo nominal de 100 Unidades de Brillo (UB). Antes de realizar las mediciones, el

instrumento se calibró automáticamente con el plato de referencia al momento de encenderlo. Cinco mediciones fueron hechas por triplicado para cada muestra y tres películas de cada formulación fueron consideradas. Todos los resultados fueron expresados como UB.

6.1.3.4 Propiedades mecánicas (Técnica de nanoindentación)

Las propiedades mecánicas a nivel nanométrico de las películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano fueron caracterizadas usando un Nano-Hardness Tester (NHT) desarrollado por CSM Instruments (Suiza). Pequeñas secciones de las películas fueron montadas sobre portamuestras con la ayuda de cinta doble cara para llevar a cabo los experimentos. Diferentes condiciones de prueba se aplicaron a las películas con el propósito de estudiar el efecto de éstas sobre las propiedades mecánicas obtenidas, de tal manera que se aplicaron valores de cargas máximas entre 0.5 mN a 5 mN, tiempos de pausa entre 10 a 100 segundos y velocidades de carga entre un rango de 1 mN/min a 20 mN/min. Se seleccionó un modelo de carga lineal para aplicar la fuerza sobre las muestras. Una punta de diamante piramidal base triangular conocida como Berkovich fue usada para realizar las indentaciones (Figura 6.1).

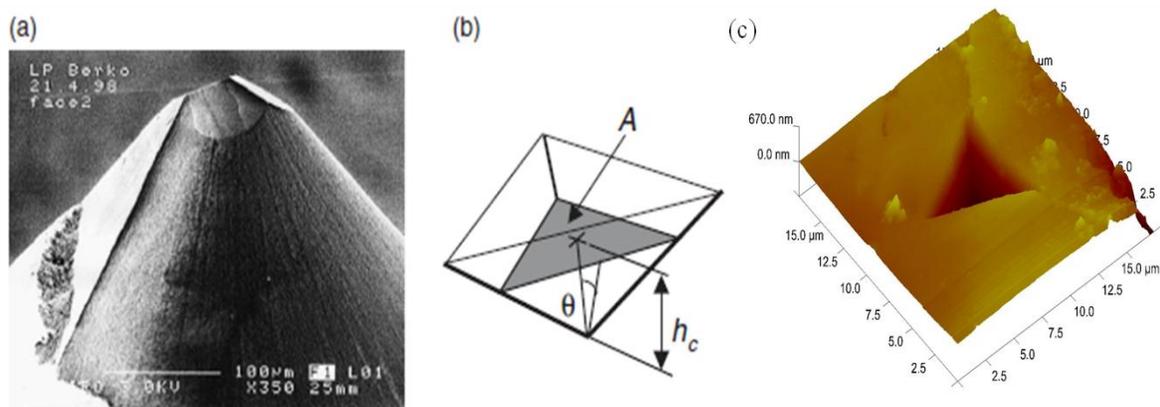


Figura 6.1. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de una punta de diamante Berkovich (a), un esquema de su geometría (b) y una imagen 3D de una huella residual sobre una capa dura (c) (Fischer-Cripps, 2006).

Antes de realizar las pruebas, se calibró la punta haciendo indentaciones sobre una pieza de cuarzo de referencia. Un mínimo de 5 perfiles variando los valores de carga, pause y velocidad de carga fueron realizados en diferentes posiciones de las muestras de cada una de las películas. Tres especímenes diferentes de cada tipo de películas fueron empleados.

El intervalo de separación entre las indentaciones fue de 50 μm para evitar el efecto de interacción entre ellas. Al final de cada indentación se obtuvieron curvas de carga-desplazamiento como la que se ejemplifica en la Figura 6.2.

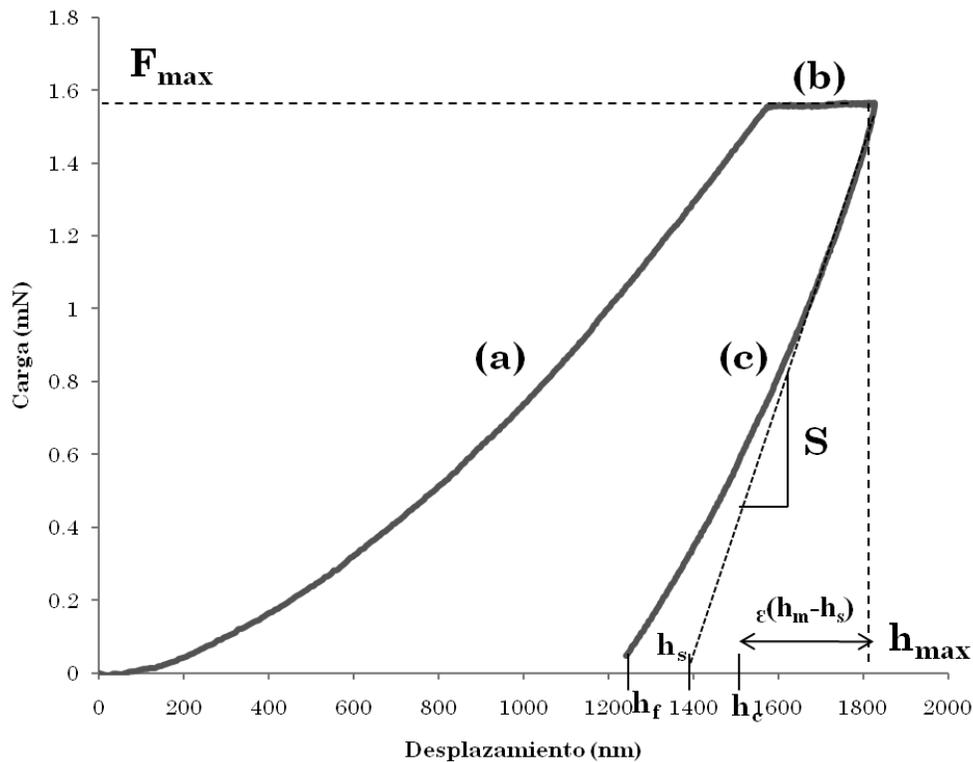


Figura 6.2. Curva de carga-desplazamiento típica del proceso de indentación donde se señalan las tres partes principales: aplicación de la carga (a), pausa a carga constante (b) y descarga (c). F_{\max} = carga máxima aplicada; h_{\max} = profundidad de la penetración; h_c = profundidad de contacto entre la punta y la muestra; h_f = profundidad final; S = rigidez.

Después de que se desarrollaron los perfiles a diferentes condiciones sobre las muestras, se realizaron un mínimo de 30 indentaciones fijando las variables de prueba con el fin de obtener y comparar las propiedades nanomecánicas de los tres tipos de películas. Tres muestras de cada película fueron utilizadas. Las condiciones de prueba de estas indentaciones fueron las siguientes: carga de 2.5 mN, velocidad de carga y descarga de 2.5 mN/min y tiempo de pausa a carga constante de 60 segundos. Propiedades mecánicas tales como dureza, módulo elástico, desplazamiento de indentación y parte de trabajo elástico de indentación fueron calculados con el método de Oliver-Pharr a partir de la curva de descarga.

El método de Oliver-Pharr se basa en determinar la profundidad de contacto (h_c) a partir de la pendiente de la curva de descarga de la siguiente manera (Ebenstein & Pruitt, 2006; Lucca, Herrmann, & Klopstein, 2010). El 80% de la parte superior de la curva de descarga es ajustada a la siguiente ecuación (6.2):

$$F = K(h - h_p)^m \quad (6.2)$$

Donde F es la fuerza, h es la profundidad, h_p es la profundidad plástica y K y m son constantes. Ésta expresión es después diferenciada con respecto a la profundidad para obtener la pendiente de la curva de descarga la cual es evaluada a la profundidad máxima. La intercepción del eje de las abscisas por la línea tangente a la curva de descarga determina la profundidad h_s como se muestra en la Figura 6.2. Posteriormente, la profundidad de contacto (h_c) es calculada con la ecuación (6.3):

$$h_c = h_{max} - \varepsilon(h_{max} - h_s) \quad (6.3)$$

De la ecuación anterior, ε es un valor constante de 0.75 para puntas Berkovich o Vickers. Conociendo la profundidad de contacto y la función de área del indentador, el área de contacto proyectada puede ser calculada (ecuación 6.4) (Fischer-Cripps, 2009).

$$A_p = C_0 h_c^2 + C_1 h_c^1 + C_2 h_c^{\frac{1}{2}} + \dots + C_8 h_c^{\frac{1}{128}} \quad (6.4)$$

Para el cálculo del área de contacto proyectada se debe considerar que las puntas o indentadores no tienen nunca una forma ideal y en consecuencia se debe de usar una función de área más general (ecuación 6.4) debido al embotamiento. Las constantes $C_0 \dots C_8$ fueron determinadas haciendo indentaciones sobre una pieza de cuarzo de referencia. Una vez que se tiene el área de contacto proyectada, la dureza (H_{IT}) se puede calcular con la ecuación 6.5 (Oliver & Pharr, 2004).

$$H_{IT} = \frac{F_{max}}{A_p} \quad (6.5)$$

Donde F_{max} es la carga máxima de indentación y A_p el área de contacto proyectada del indentador evaluada a la profundidad de contacto h_c . El módulo elástico (E_{IT}) fue calculado a partir de las siguientes dos ecuaciones (6.6) y (6.7) (Oliver & Pharr, 2004):

$$E_{IT}^* = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A_p}} \quad (6.6)$$

$$E_{IT} = \frac{(1-\nu^2)}{\frac{1}{E_{IT}^*} - \frac{(1-\nu_i^2)}{E_i}} \quad (6.7)$$

Donde ν es la proporción de Poisson's de la muestra (para las películas comestibles se estableció de 0.35); ν_i es la proporción de Poisson's del indentador (para indentadores de diamante es de 0.7); E_{IT}^* es el módulo reducido; E_i es el módulo elástico del indentador (para indentadores de diamante es de 1141 GPa) y A_p el área de contacto proyectada (Lavorgna y col. 2010).

Otro parámetro mecánico que se obtuvo fue el desplazamiento de indentación (C_{IT}) conocido en inglés como “indentation creep” que se define como el cambio en la profundidad que ocurre a una carga constante (Lucca y col., 2010). Por lo tanto este parámetro se calcula a partir de la sección de pausa a carga constante (b) de la curva de carga-desplazamiento, como se muestra en la Figura 6.2. El desplazamiento de indentación se calculó con la siguiente ecuación:

$$C_{IT} = \frac{(h_2 - h_1)}{h_1} \times 100 \quad (6.8)$$

Donde h_2 es la profundidad después de un determinado periodo de pausa y h_1 es la profundidad al inicio del periodo de pausa.

Una manera clara de visualizar el fenómeno de desplazamiento de la indentación es graficando el desplazamiento o profundidad de la indentación en función del tiempo, como se muestra en la Figura 6.3, donde se muestra que a una carga constante (periodo de pausa) el indentador sigue penetrando la muestra.

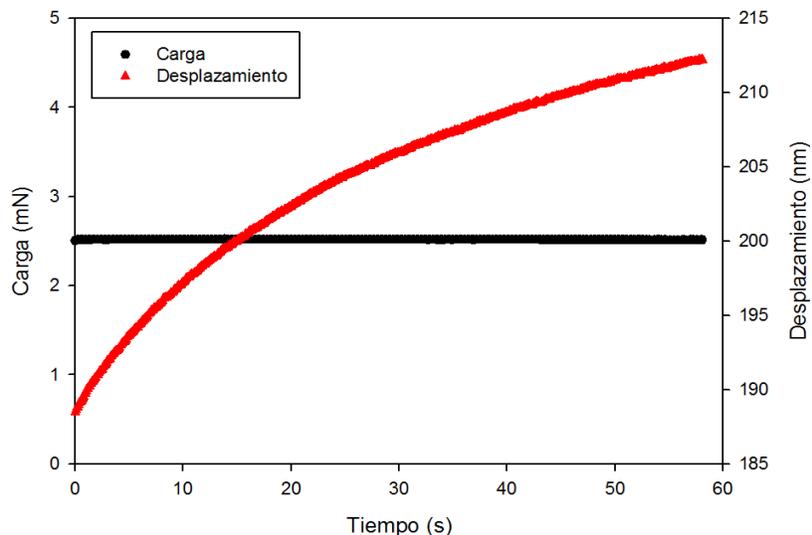


Figura 6.3. Curva de desplazamiento del indentador en función del tiempo a una carga constante (periodo de pausa).

El fenómeno de desplazamiento de la indentación es frecuentemente observado en algunos polímeros y biomateriales que exhiben comportamiento viscoelástico o tiempo-dependientes (Ebenstein & Pruitt, 2006).

Por otro lado, también se puede obtener el trabajo mecánico total de indentación, el cual es representado por el área debajo de la curva carga-desplazamiento (Figura 6.4). El trabajo total de indentación puede ser dividido en dos componentes: elástico y plástico. El trabajo elástico es determinado por el área de la porción de descarga de la curva de carga-desplazamiento y el trabajo plástico es determinado a partir del área donde se incrementa la carga y hasta la porción de descarga de la curva de carga-desplazamiento (Lucca y col., 2010).

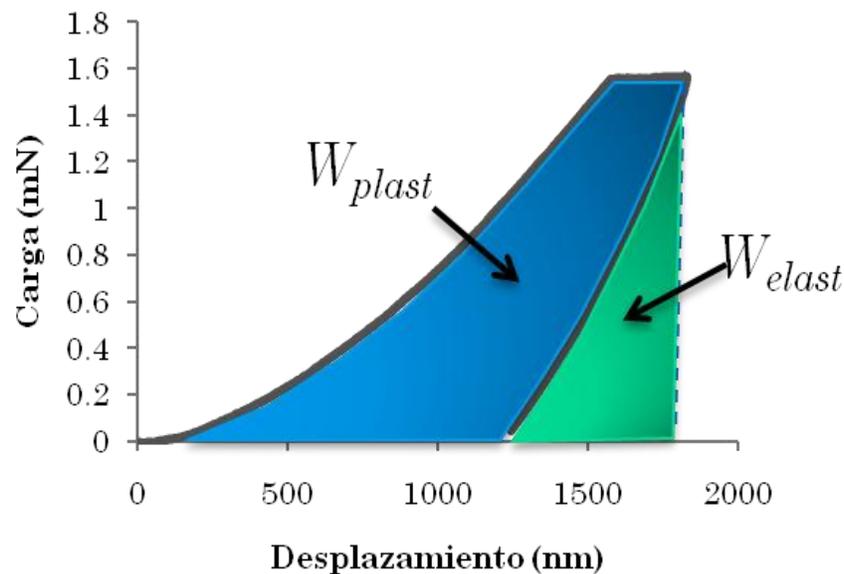


Figura 6.4. Curva de carga-desplazamiento donde se muestran las zonas del trabajo plástico y elástico de la indentación representados por el área bajo la curva (Lucca y col., 2010).

La parte elástica del trabajo de indentación es calculado mediante las siguientes ecuaciones:

$$\eta_{IT} = \frac{(W_{elast})}{W_{total}} \times 100 \quad (6.9)$$

$$W_{total} = W_{elast} + W_{plast} \quad (6.10)$$

En la literatura existen algunos trabajos donde han intentado usar los valores del trabajo de indentación para el cálculo de la dureza y el modulo elástico (Lucca y col., 2010).

6.1.4 Caracterización cuantitativa de la microestructura de películas comestibles mediante análisis de textura de imágenes

6.1.4.1 Técnicas de microscopía

6.1.4.1.1 Microscopia de luz

Las superficies de las películas fueron observadas con un estereomicroscopio (Nikon SMZ 1500, Japón) con luz transmitida. Secciones de las películas de 2 cm x 2 cm de tamaño fueron colocadas directamente sobre la base del microscopio y éstas fueron observadas a tres diferentes magnificaciones: 7.5x, 30x y 112.5x; las cuales corresponden a Campos de Visión (CDV) de 28.44 mm², 7.36 mm² y 0.63 mm², respectivamente. Las resoluciones a cada nivel de magnificación fueron 11.11 μm/px, 5.65 μm/px y 1.65 μm/px, respectivamente. Las imágenes de las superficies fueron capturadas con una cámara CCD acoplada al microscopio (Nikon DS-2Mv, Japón) usando el programa de computo Nis Elements (F 2.30, Nikon, Japón). Las condiciones de la cámara del microscopio fueron siempre las mismas para cada magnificación en todas las muestras observadas, dichas condiciones se muestran en la Tabla 6.1. Las imágenes fueron capturadas en formato de color RGB y secciones de la imagen de 480 x 480 pixeles fueron almacenadas en formato de no compresión TIFF para su futuro análisis. Para todas las magnificaciones, cinco áreas

diferentes fueron tomadas para cada película y tres especímenes de cada tipo de película fueron evaluados.

Es importante resaltar que en el procesamiento de imágenes (PI) diversos factores deben ser tomados en cuenta, el primero y uno de los más importantes son las condiciones de adquisición de la imagen. La iluminación es un factor esencial en la adquisición de las imágenes y este debe ser adecuado para observar las características físicas de interés sobre la muestra (Mendoza, Dejmek, & Aguilera, 2006). En microscopía de luz, las variables de iluminación (apertura numérica, apertura del diafragma y la intensidad de la luz) y la configuración de la cámara del microscopio (tiempo de exposición, ganancia y contraste) fueron controlados y mantenidos constantes para todos los especímenes y niveles de magnificación.

Tabla 6.1. Condiciones de la cámara del microscopio usadas para la captura de imágenes de las películas comestibles.

Magnificación	Condiciones de adquisición		
	Tiempo de exposición (s)	Ganancia	Modo de Contraste
7.5x	1/1000	1	Mejorado
30x	1/700	1	Mejorado
112.5x	1/180	1	Mejorado

6.1.4.1.2 Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental

La microestructura de la superficie y sección transversal de películas comestibles fueron examinadas con un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (MEBA) (ESEM XL 30, Philips, Holanda). Este modo de operación del microscopio electrónico conocido también como modo ambiental, permite examinar especímenes biológicos húmedos sin que haya una preparación de la muestra (James, 2009), por lo tanto, muestras de aproximadamente 5 mm x 5 mm de tamaño fueron fijados sobre un porta muestras usando

cinta de carbono de doble cara. Las películas fueron fracturadas con nitrógeno líquido para la observación de la sección transversal como se mencionó anteriormente en la sección de medición del espesor de las películas. Las muestras fueron observadas a un voltaje de aceleración de 10 kV usando el detector de electrones secundarios gaseosos. Las micrografías fueron capturadas en escala de grises y secciones de la imagen de 610 x 358 píxeles fueron almacenadas en formato TIFF. La sección transversal fue observada a 300x y las superficies a magnificaciones de 350x, 500x y 650x, las cuales corresponden a Campos de Visión de $52733.18 \mu\text{m}^2$, $25700.15 \mu\text{m}^2$ y $15501.12 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Las resoluciones a cada nivel de magnificación fueron de $0.49 \mu\text{m}/\text{px}$, $0.34 \mu\text{m}/\text{px}$ y $0.26 \mu\text{m}/\text{px}$, respectivamente. Para cada magnificación, cinco micrografías fueron tomadas; esto fue hecho para tres especímenes del mismo tipo de película.

En MEBA, el brillo y el contraste son las variables más importantes que deben ser controladas durante la adquisición de las imágenes; por lo tanto, los valores de estos parámetros fueron mantenidos constantes o con valores muy similares para todas las muestras al momento de la adquisición de las imágenes. Lo anterior permite que el análisis de textura de imágenes y la cuantificación de las diferencias microestructurales entre las muestras pueda ser llevado a cabo de manera exitosa. Otras variables tales como el voltaje de aceleración y el tipo de detector de electrones son también considerados para la generación de imágenes cuando se aplica esta técnica.

6.1.4.1.3 Microscopia de Fuerza Atómica

La topografía de la superficie de las películas comestibles a nivel micro fue analizada con un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés, Atomic Force Microscope) (diMultimode V conectado a un micro controlador di Nanoscope V, Veeco, USA). Secciones pequeñas de las películas fueron escaneadas con puntas de nitruro de silicio (Veeco, USA) las cuales tienen una frecuencia de resonancia (resonance frequency) entre 286-362 kHz y una constante de resorte (spring constant) entre $20\text{-}80 \text{ Nm}^{-1}$. Cinco áreas de las superficies de las películas de tamaños de $225 \mu\text{m}^2$ ($15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$), $100 \mu\text{m}^2$ ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) y $25 \mu\text{m}^2$ ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) fueron escaneadas usando el modo “tapping” o

intermitente a una velocidad de escaneo de 1 Hz. El modo “tapping” fue preferido en este trabajo porque este modo es el más usado comúnmente en campos de la ciencia como alimentos y biología, debido a que reduce significativamente las fuerzas ejercidas por la punta sobre la muestra, así como el daño que puede generarse en ambos, en consecuencia haciéndolo adecuado para analizar muestras suaves tales como películas comestibles (Yang, Wang, Lai, An, Li & Chen, 2007). Imágenes de altura (topografía) fueron obtenidas y a partir de estas imágenes, gráficos topográficos 3D fueron hechos con la ayuda del programa NanoScope v7.30 (Veeco, USA). Además, valores de parámetros de rugosidad tales como R_a (Rugosidad Promedio Aritmética) y R_q (Rugosidad Media Cuadrática) fueron calculados desde las imágenes con las ecuaciones (6.11) y (6.12):

$$R_a = \frac{1}{n_x n_y} \sum_{i=1}^{n_x} \sum_{j=1}^{n_y} |Z(i, j) - Z_{ave}| \quad (6.11)$$

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_x} \sum_{j=1}^{n_y} [Z(i, j) - Z_{ave}]^2}{n_x n_y}} \quad (6.12)$$

Donde $Z(i, j)$ denota los datos de altura de la superficie, Z_{ave} es el promedio de la altura de la superficie, i y j corresponden a los pixeles en la dirección x y y respectivamente. El número máximo de pixeles en las dos direcciones está representado por n_x y n_y (Yang, An, Feng, & Li, 2005). Análisis de sección (perfilometría) fueron obtenidos a partir de las imágenes topográficas.

Todas las imágenes fueron almacenadas en formato de color RGB con un tamaño de 512 x 512 pixeles en formato TIFF. Las imágenes obtenidas a Campos de visión de 225 μm^2 , 100 μm^2 y 25 μm^2 tienen una resolución de 0.029 $\mu\text{m}/\text{px}$, 0.019 $\mu\text{m}/\text{px}$ y 0.009 $\mu\text{m}/\text{px}$, respectivamente. Todos los experimentos fueron desarrollados en aire a condiciones ambiente. Tres especímenes de cada película fueron considerados para los experimentos.

Para el análisis cuantitativo de las imágenes topográficas de AFM es importante considerar dos aspectos: las operaciones de procesamiento de imágenes y la escala de altura de las imágenes. Las operaciones de procesamiento de las imágenes tales como “flatten” (aplanado) no deben ser realizadas debido a que estas modifican la información original de la imagen y en consecuencia se puede obtener información errónea, por otro lado, la escala de alturas de todas las imágenes debe ser la misma, con el propósito de poder comparar la información numérica. Las consideraciones mencionadas anteriormente fueron tomadas en cuenta para este trabajo.

6.1.4.2 Análisis de textura de imágenes

El análisis de textura de imágenes (ATI) fue aplicado para caracterizar cuantitativamente la microestructura de superficie de las películas comestibles a diferentes Campos de Visión. La textura de una imagen es una característica representada por el arreglo espacial de los niveles de grises de los píxeles de la imagen (Du, & Sun, 2004). En este trabajo cinco parámetros texturales fueron seleccionados como parámetros de estudio: Energía, Contraste, Homogeneidad, Entropía y Dimensión Fractal. Todas las imágenes obtenidas a partir de las técnicas de microscopía (excepto las imágenes de MEBA) fueron convertidas desde imágenes de color RGB a imágenes en escala de grises; subsecuentemente, los algoritmos de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises (MCEG) y de Conteo de Cajas de Desplazamiento Diferencial (CCDD) fueron aplicados para obtener los parámetros texturales desde las imágenes en escala de grises (Haralick, Shanmugam, & Dinstein, 1973; Wen-Shiung, Shang-Yuan, & Chih-Ming, 2003). Toda la metodología del procesamiento de imágenes fue llevando a cabo usando el programa libre Image J v1.34s (National Institutes Health, Bethesda, MD, USA).

6.1.4.2.1 Algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises

La Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises (GLCM por sus siglas en inglés, Gray Level Co-Occurrence Matrix) es un algoritmo estadístico de segundo orden que compara dos píxeles vecinos a un determinado tiempo y compila la frecuencia a la cual diferentes niveles de grises pueden ser encontrados dentro de un área restringida (Gosselin,

Duschesne, & Rodrigue, 2008). Tres variables son consideradas en este algoritmo: el número de niveles de grises (0 a 255), la distancia entre los píxeles (d) y el ángulo de desplazamiento (θ) (Haralick y col., 1973). La textura de las imágenes fue analizada a través del estudio de la dependencia espacial de los valores de los píxeles representada por una matriz de co-ocurrencia $P_{d,\theta}$ con entrada en $P_{d,\theta}(i, j)$ siendo la frecuencia relativa o distancia para dos píxeles (d) en la dirección θ teniendo valores i y j , respectivamente. De acuerdo a Haralick y colaboradores (1973), con el algoritmo MCEG es posible calcular catorce parámetros texturales. Sin embargo, sólo se consideraron útiles cuatro: energía, contraste, homogeneidad y entropía, ya que los otros parámetros pueden ser redundantes como se ha reportado en otros trabajos (Mendoza y col., 2007; Gosselin y col., 2008). Estos parámetros fueron calculados a una distancia entre píxeles “ d ” igual a 1 y con un ángulo de desplazamiento “ θ ” de 0° . La Tabla 6.2 muestra las ecuaciones de los parámetros texturales extraídos desde las imágenes en escala de grises.

Tabla 6.2. Ecuaciones de los parámetros texturales extraídos a partir de las imágenes en escala de grises con el algoritmo GLCM.

Parámetro textural	Ecuación
Energía	$\sum_{ij} P_{d\theta}(i, j)^2$
Contraste	$\sum_{ij} i - j ^2 P_{d\theta}(i - j)$
Homogeneidad	$\sum_{ij} \frac{P_{d\theta}(i - j)}{1 + (i - j)}$
Entropía	$-\sum_{ij} P_{d\theta}(i, j) \log(P_{d\theta}(i, j))$

A continuación se definen nuevamente los parámetros texturales usados para la caracterización de la microestructura de la superficie de las películas comestibles. La energía mide la uniformidad textural de la imagen y es un parámetro opuesto a la entropía. El parámetro de energía también es conocido como uniformidad, uniformidad de energía y

segundo momento angular. El contraste es una medida de las variaciones locales de los valores en escala de grises de los píxeles de una imagen. El contraste también es conocido como varianza o inercia. El parámetro de homogeneidad, también llamado como diferencia de momento inverso es una medida similar a la energía; la cual también representa la homogeneidad local de la imagen. Y por último, la entropía mide el desorden o aleatoriedad de las imágenes y puede ser usado para caracterizar la textura de la imagen y es un indicativo de la complejidad dentro de la imagen, por lo tanto, imágenes complejas tendrán altos valores de entropía (Haralick y col., 1973; Fernández, Castellero, & Aguilera, 2005; Mendoza y col., 2007). Los cuatro parámetros texturales fueron extraídos desde las imágenes obtenidas por las técnicas de microscopía con el plug-in GLCM Texture incluido en el programa Image J.

6.1.4.2.2 Algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas

La textura fractal fue evaluada por la ley de potencia para obtener su dimensión fractal (DF), usando el algoritmo de modificado de Conteo Diferencial de Cajas (SDBC por sus siglas inglés, Shifting Differential Box Counting). Este algoritmo se basa en un gráfico de superficie de intensidad (Figura 6.5c), el cual es generado a partir de imágenes en escala de grises 2D, graficando las coordenadas de los píxeles (x, y) y su respectivo nivel de gris en el eje z (Quevedo y col., 2008; Weng-Shiung y col., 2003). La dimensión fractal fue estimada usando el programa Image J con el plug-in SDBC. La DF se calcula desde la pendiente de un gráfico del log conteo de cajas contra el log de tamaño de caja (Figura 6.5a) con la siguiente ecuación (6.13):

$$DF = \frac{\log(N)}{\log\left(\frac{1}{r}\right)} \quad (6.13)$$

Donde, N representa el número de cajas y r la longitud del lado de la caja o tamaño de caja. Este parámetro es una medida directamente relacionada con el grado de rugosidad de la superficie. Para imágenes en escala de grises 2D (Figura 6.5b) valores entre 2 y 3 de dimensión fractal pueden ser obtenidos, por lo tanto, el valor de dimensión fractal para una

superficie rugosa es mayor que para una superficie lisa (Quevedo, Jaramillo, Díaz, Pedreschi, & Aguilera, 2009). Este parámetro fue estimado para todas las imágenes en escala de grises obtenidas de las técnicas de microscopía.

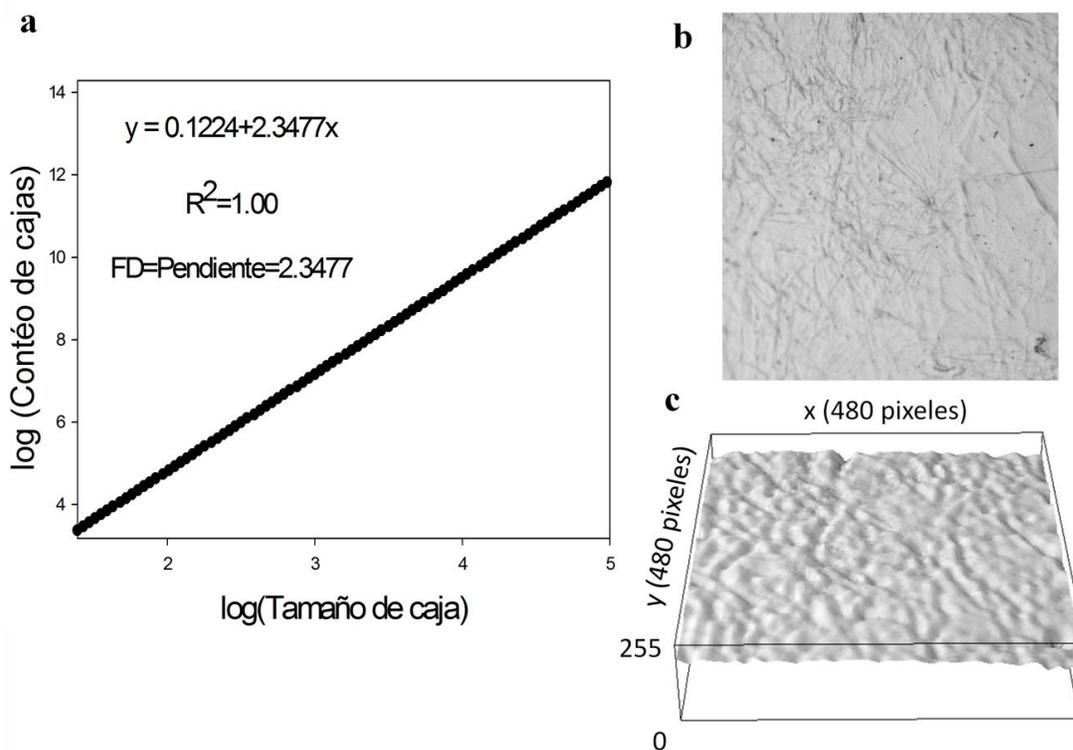


Figura 6.5. Grafico de log de conteo de cajas contra log de tamaño de caja obtenido mediante el algoritmo CCDD, donde la pendiente representa la dimensión fractal de la imagen (a); imagen de ML de una película de alginato/quitosano en escala de grises (b) y su respectivo grafico de superficie de intensidad (c).

6.1.4.2.3 Relación entropía/dimensión fractal

En este trabajo una relación entropía/dimensión fractal se propuso; esta relación fue estimada como el cociente de los valores de entropía divididos entre los valores de dimensión fractal calculados a partir de la misma imagen como se muestra en la ecuación (6.14).

$$\text{Relación entropía/dimensión fractal} = \frac{\text{Valores de entropía}}{\text{Valores de dimensión fractal}} \quad (6.14)$$

Esta relación es un parámetro compuesto, el cual asocia la complejidad de una imagen en términos de valores de entropía y la rugosidad de la imagen como valores de dimensión fractal. Por lo que los valores de dicha relación permiten evaluar la complejidad y rugosidad de una imagen de manera simultánea, debido a que frecuentemente una imagen compleja puede estar asociada con una imagen rugosa. Por lo tanto, altos valores de la relación entropía/dimensión fractal estarán relacionados a imágenes con un alto grado de complejidad y rugosidad, mientras que bajos valores pueden estar asociados con imágenes simples y lisas. En la literatura existen investigaciones que han asociado la dimensión fractal con la complejidad de la imagen (Pentland, 1984; Quevedo, Carlos, Aguilera, & Cadoche, 2002). Los valores de la relación entropía/dimensión fractal fueron calculados y usados para evaluar el efecto del Campo de Visión sobre la complejidad y rugosidad de la superficie de las películas.

6.2 Caracterización cuantitativa de los cambios superficiales del aguacate Hass y su clasificación en etapas de madurez

6.2.1 Cinética de maduración

Un lote de 70 aguacates (*Persea americana* Mill, variedad Hass, calidad de exportación) cosechados a partir de un mismo cultivo (Michoacán, México) fueron usados para evaluar su madurez a nivel de laboratorio en condiciones de obscuridad a 20 °C y 75% de humedad relativa durante 12 días. Un conjunto de 10 aguacates con forma, color y tamaño similar y con un peso entre 211 y 265 g fueron seleccionados para el análisis de procesamiento de imágenes con el propósito de evitar la variabilidad de las muestras debido a los diferentes niveles de calidad.

6.2.2 Evaluación de los parámetros de madurez

6.2.2.1 Pérdida de peso

La pérdida de peso de los aguacates durante la cinética de maduración fue evaluada con una balanza digital (Explorer OHAUS, USA) con una exactitud de 0.1 mg. El grupo de frutas destinado para el análisis de PI (10 aguacates) fueron pesadas cada día.

6.2.2.2 Color

Se midió el color de las cáscaras de los aguacates con un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR400, Osaka; fuente de luz D₆₅) y los valores fueron expresados en el espacio de color CIELab (L*, a* y b*). Cada día, se tomaron 4 mediciones alrededor del ecuador de 5 frutos. Diferencias de color (ΔE) fueron calculados con la ecuación (6.15):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (6.15)$$

Donde de la ecuación anterior L*₀, a*₀ y b*₀ corresponden a los valores de color de la cáscara de aguacates del primer día de maduración, mientras que L*, a* y b* a los valores de color de la cáscara de aguacates de las muestras durante la maduración.

6.2.2.3 Firmeza

Los 60 aguacates restantes (5 aguacates cada día) fueron usados para evaluar la firmeza por quintuplicado cada día durante 12 días mediante el uso de un texturómetro universal (Instron 5565, USA). Mitades de aguacates sin pelar y sin semillas fueron usados para las pruebas de penetración, las cuales se realizaron a una velocidad de penetración de 10 mm/min con una sonda de forma cónica (diámetro inferior de 2.2 mm, diámetro superior de 7.1 mm, ángulo del cono de 102° y longitud de 11.3 mm). La firmeza fue medida como la fuerza (N) necesaria para perforar la muestra en tres diferentes posiciones (en el centro y en dos puntos a 2 cm del centro). Se consideró que los aguacates alcanzaron la madurez de consumo cuando los valores de firmeza tuvieron un valor cercano a cero y esto fue en el día

12. Los parámetros de color y firmeza fueron usados como criterios para establecer las etapas de madurez de los aguacates.

6.2.3 Sistema de visión computarizada

Se utilizó un sistema de visión computarizada (Figura 6.6) para la captura de imágenes de los aguacates durante la cinética de maduración. Este sistema está formado por un sistema de iluminación que consiste de 4 lámparas fluorescentes de 60 cm (TL-D deluxe, luz de día natural, 18 W/965, Philips, México, temperatura de color 6500 K, D65, balastros electrónicos a 60 Hz/120 V) colocadas sobre una estructura de madera en forma de cuadro con un ángulo de 45° y una distancia de 35 cm con respecto de la muestra. Una cámara digital (Cybert-shot DSC-W55, Sony, China) posicionada verticalmente sobre las muestras y conectada a una PC (Dell Precision 380, Pentium 4) fue usada para adquirir las imágenes. Las condiciones de configuración de la cámara fueron modo manual, nivel de exposición 0.0 y no se utilizó zoom ni flash. Un total de 20 imágenes (dos imágenes por aguacate) fueron tomadas cada día, poniendo los aguacates en la misma posición y orientación sobre un fondo gris mate con el propósito de disminuir los brillos en las imágenes generados por la geometría de los frutos. Las imágenes de los aguacates de 1600 x 1200 píxeles en formato de color RGB a una alta resolución y calidad superfina fueron almacenadas en formato TIFF. Zonas centrales de las imágenes de los aguacates de un tamaño de 200 x 200 píxeles (formato TIFF) libres de brillos fueron segmentados y almacenados para su futuro análisis con técnicas de IP. Mendoza y col. (2006) reportaron que el análisis de color de muestras con superficies curvas empleando el espacio de color CIELab es menos afectado por la curvatura, sombras y brillos que otros espacios de color como el RGB y HSV. Se hizo una calibración del sistema de captura de manera similar a la reportada por León y col. (2006). Parámetros de color L^* , a^* y b^* de 35 tarjetas de color fueron medidos con el colorímetro y de imágenes digitales RGB que fueron convertidas al espacio de color CIELab, obteniendo imágenes de los canales separados; la transformación de RGB a CIELab se realizó con el plug-in color space converter versión 4.0 del programa Image J. Los valores promedio de las coordenadas de color fueron estimados con un histograma de frecuencias. Valores de L^* , a^* y b^* de las cartas de color medidos con el colorímetro

fueron graficados contra sus correspondientes valores de L^* , a^* y b^* obtenidos por PI para verificar la calibración del sistema. Por lo tanto, para obtener una calibración adecuada del sistema de visión por computadora las opciones de configuración de la cámara se fueron variando hasta obtener buenos coeficientes de correlación entre los valores medidos con el colorímetro contra los obtenidos con PI. Para las tres coordenadas de color ajustes lineales fueron efectuados. Con el propósito de verificar que el sistema de captura estuviera calibrado durante todo el experimento, 20 tarjetas de color fueron fotografiadas cada día y los valores promedio de las coordenadas para todas las tarjetas fueron: $L^*=0.87\pm 0.03$, $a^*=1.28\pm 0.01$ y $b^*=0.53\pm 0.03$.

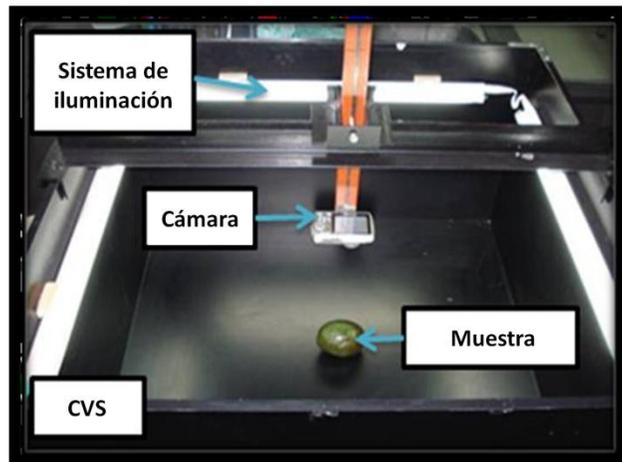


Figura 6.6. Imagen del Sistema de Visión por Computadora empleado para la adquisición de las imágenes. En la imagen se muestra el sistema de iluminación, la cámara digital y la muestra (aguacate).

6.2.3.1 Medición de color por PI

Se determinó el color con PI a imágenes de la superficie central de los aguacates (200 x 200 píxeles en formato TIFF) que estaban libres de brillos. Primero se realizó una conversión de RGB a CIELab con el plug-in color space converter del Image J y después se midió el color de cada coordenada con la ayuda de un histograma de frecuencias. La medición de color se realizó al lote de 10 aguacates durante la cinética de maduración (12 días).

6.2.3.2 Análisis de textura de imágenes

6.2.3.2.1 Algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises

Imágenes de la superficie de los aguacates empleadas para la medición del color también fueron utilizadas para la estimación de parámetros de textura con el algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises. Las imágenes RGB fueron convertidas a imágenes en escala de grises (8 bits) con el programa Image J. Energía, contraste, correlación, homogeneidad y entropía fueron los parámetros calculados con el plug-in GLCM Texture con una distancia de separación entre píxeles $d=1$ y una dirección $\theta=0^\circ$. Una explicación acerca de este algoritmo ha sido detallada anteriormente (sección 5.1.4.2.1).

6.2.3.2.2 Algoritmo Conteo de Cajas de Desplazamiento Diferencial

Se estimó la dimensión fractal con el plug-in SDBC a las imágenes en escala de grises de la superficie de los aguacates. Una explicación acerca de la estimación de la dimensión fractal con este plug-in fue detallada anteriormente (sección 5.1.4.2.2).

6.2.4 Proceso de clasificación

Los parámetros de calidad (color y firmeza), de textura (energía, contraste, correlación, homogeneidad y dimensión fractal), color (medido con IP) y dimensión fractal fueron usados para desarrollar un clasificador de las etapas de madurez del aguacate Hass. En pruebas preliminares se utilizaron los parámetros de calidad para el desarrollo del clasificador, pero en base a los resultados obtenidos y a que se pretende explotar el uso de técnicas de IP solo los parámetros extraídos mediante estas técnicas fueron utilizados para el diseño del clasificador. Por lo tanto, los parámetros de textura, dimensión fractal y color (medido con IP) de 168 imágenes (70%) fueron seleccionadas aleatoriamente para construir un conjunto de supervisión requerido para la fase de aprendizaje del clasificador, mientras que los parámetros de las 72 imágenes restantes (30%) fueron usados para la prueba de validación. Posteriormente, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés, Principal Components Analysis) con el programa MATLAB v. 7.0 (MathWorks, Inc., MA, USA) para ordenar cada una de las características (parámetros

extraídos del PI) de acuerdo con su capacidad de discriminación (Jolliffe, 2002). Valores de los pesos en un intervalo entre 0 y 1 fueron asignados a cada una de las características en base al orden en que quedaron ordenados. Como la base de datos y el número de clases de madurez propuestas (tres clases de madurez representativas) fueron pequeños, una propuesta de prueba y ensayo fue usada para establecer estos valores. Se definió un clasificador como aquel que toma patrones de entrada (que son los parámetros extraídos de las imágenes de la cáscara de los aguacates ordenados en base al PCA) y como salida las etapas de madurez de la imagen del aguacate respectivo.

El algoritmo de clasificación usado en estos experimentos es una versión simplificada del modelo KNN (K-Nearest Neighbors) con un esquema de voto rápido (Guo, Wang, Bell, Bi, & Greer, 2003), el cual usa el patrón más representativo de cada clase como prototipo. Después de que todos los prototipos han sido calculados, un nuevo patrón es clasificado comparándolo con los prototipos usando una función de similaridad. Posteriormente, un valor de voto es calculado para cada clase. Este valor sintetiza el nuevo patrón de similaridad con un conjunto de prototipos de esa clase y una regla de decisión se aplica para determinar la clase final a la cual el patrón es asignado.

En resumen los pasos del proceso de clasificación se detallan a continuación:

- a) Se seleccionó un conjunto de características (9 parámetros extraídos del PI) que se usaron para formar los patrones.
- b) Se calculó la relevancia de las características seleccionadas mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) y se le asignaron valores a los pesos de cada característica. Para esta etapa del proceso de clasificación y en base a los resultados obtenidos por el ACP, se llevaron a cabo dos experimentos utilizando en cada uno diferentes parámetros extraídos del PI, en el primero se utilizaron las coordenadas de color CIELab (a^* , b^* , y L^*) y en el segundo la coordenada de cromaticidad a^* y los cinco parámetros de textura más relevantes (correlación, energía, homogeneidad, dimensión fractal y entropía).

- c) Se establecieron tres clases de calidad para los aguacates considerando los cambios de color durante la cinética de maduración. De esta manera, la clase 1 fue definida del día uno a seis, la clase 2 del día siete a nueve y la clase 3 del día diez al doce.
- d) Se determinó el conjunto de prototipos (patrones representativos) de cada clase.
- e) Se calculó el valor de similaridad de cada nuevo patrón con el conjunto de prototipos de cada clase con la siguiente función de similaridad, ecuaciones (6.16) y (6.17) (Guo y col., 2003):

$$f(x_i, o_k) = \alpha_j g_{i,j}^k(x_{i,j}, o_{k,j}) \quad (6.16)$$

$$g_{i,j}(x_{1,j}, o_{k,j}) = \alpha_j \left[1 - \frac{x_{1,j} - o_{k,j}}{\max(x_{i,j}) - \min(x_{i,j})} \right] \quad (6.17)$$

Dónde: $x_{i,j}$ es el valor de la j^{th} característica para el i^{th} patrón de cada clase; $o_{k,j}$ es el valor de la j^{th} característica para el k^{th} prototipo; α_j es el valor del peso asignado a j^{th} característica y k es el número de clases (tres).

- f) Por último, la regla de decisión es aplicada donde el mayor promedio de similitud para los prototipos se consideró y a partir de esta fue posible clasificar el patrón dentro de una de las tres clases.

6.3 Análisis estadístico

Todos los valores de los parámetros obtenidos en este trabajo fueron expresados como promedios con su respectiva desviación estándar (promedio \pm desviación estándar). Comparaciones estadísticas fueron hechas con una Análisis de Varianza de una vía (One way ANOVA, por sus siglas en inglés) seguidos por la prueba de comparación múltiple Tukey con el programa Minitab v.15. Diferencias significativas fueron consideradas cuando la $P < 0.05$. Los gráficos y las ecuaciones de los resultados fueron generados usando el programa SigmaPlot v.11.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Caracterización de películas comestibles de alginato y quitosano

7.1.1 Propiedades físicas

En la Figura 7.1 se muestra una imagen de las películas comestibles de alginato, alginato/quitosano y quitosano.

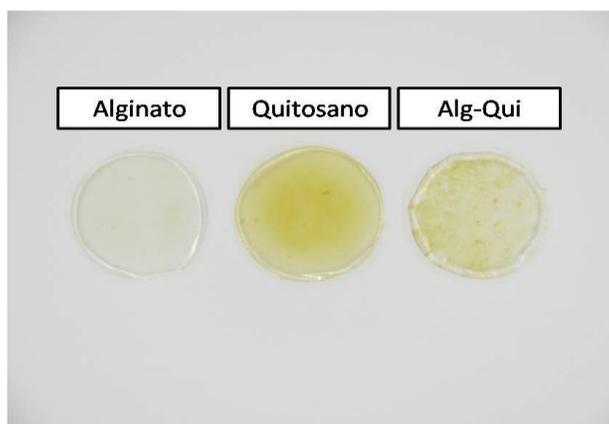


Figura 7.1. Imagen de las películas comestibles elaboradas en este trabajo.

7.1.1.1 Espesor

En la Tabla 7.1 se muestran los valores promedio de los espesores de las películas comestibles medidos con un micrómetro digital y con microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA). Los espesores de las películas medidos con el micrómetro variaron entre 66.19 y 73.38 μm ; y no hubo diferencias significativas entre los valores de los tres tipos de películas. De la misma manera, no se encontraron diferencias significativas entre los valores medidos con MEBA para las películas (valores entre 57.14 y 61.63 μm), sin embargo los valores fueron menores en comparación con los que se obtuvieron con el micrómetro. La causa de los resultados anteriores puede deberse a que las mediciones hechas con MEBA son mediciones puntuales de pequeñas secciones de las películas; y en cambio las mediciones realizadas con el micrómetro son globales y abarcan una mayor área de medición en cada una de las muestras.

Tabla 7.1. Valores promedio de los espesores de películas comestibles elaboradas de alginato y quitosano medidos con MEBA y un micrómetro digital.

Tipo de película	Espesor (μm)	
	MEBA	Micrómetro
Alginato	61.63 ± 0.33^a	67.57 ± 10.97^a
Alginato/quitosano	57.14 ± 1.50^a	66.19 ± 11.48^a
Quitosano	57.51 ± 0.65^a	73.38 ± 6.95^a

- 1) Valores (promedio \pm desviación estandar, $n=5$) en una columna con la misma letra no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$).

En la Figura 7.2 se observan micrografías de sección transversal de películas de alginato, alginato/quitosano y quitosano examinadas con MEBA a una amplificación de 500x. Como se ejemplifica en la figura se pueden realizar mediciones del espesor de las películas de manera directa con una gran exactitud con ayuda del programa de operación del equipo.

Por otra parte, valores de desviación estándar altos fueron observados para las mediciones realizadas con el micrómetro; este hecho puede estar asociado a la heterogeneidad de los espesores de las películas generado por la heterogeneidad de la superficie de las cajas petri que sirven como moldes para la elaboración de las películas comestibles.

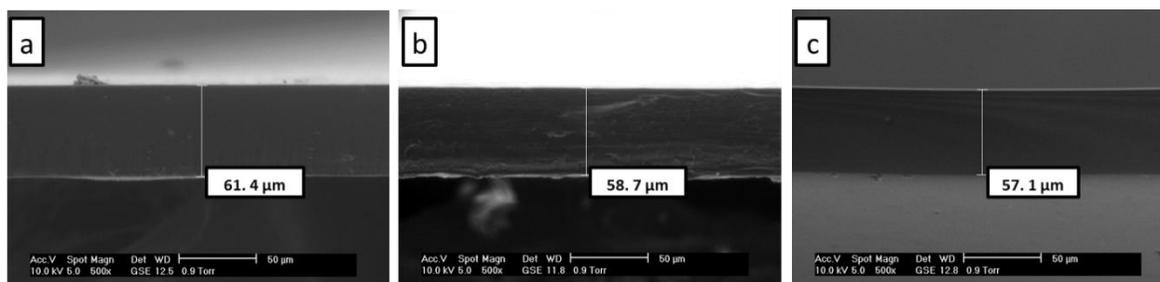


Figura 7.2. Micrografías de sección transversal de películas comestibles examinadas con MEBA a una amplificación de 500X.

El espesor de las películas y recubrimientos comestibles es un parámetro importante ya que afecta directamente la funcionalidad de estas, principalmente la permeabilidad al vapor de

agua y a gases como dióxido de carbono. El espesor va a depender de diversas variables tales como la densidad, viscosidad y tensión superficial de las soluciones formadoras de películas (Lin & Zhao, 2007). Existen diversos métodos para evaluar el espesor de las películas y recubrimientos comestibles, el método más tradicional es usando un micrómetro como se realizó en este trabajo. Este método es el más utilizado debido a que es económico, rápido y posee una alta exactitud. Otros equipos como la microscopía electrónica también han sido empleados para medir el espesor de películas y recubrimientos debido a que posee una gran exactitud aunque la desventaja de este método es que las mediciones que se realizan son muy puntuales y para que resultara efectiva la evaluación la muestra tendría que ser muy homogénea en relación al espesor. Otras técnicas tales como Microespectrometría Confocal Raman (CRM por sus siglas en inglés), Barrido Raman de Superficie Mejorado (SERS por sus siglas en inglés) y Espectrometría Raman Transformada de Fourier han sido empleadas para evaluar espesores de películas y principalmente de recubrimientos sobre alimentos obteniendo adecuados resultados (Hsu y col., 2005).

7.1.1.2 Color

El color de las películas puede influenciar la preferencia del consumidor hacia un producto por lo que es una propiedad importante de evaluar en estos materiales. En la Tabla 7.2 se resumen los valores de las coordenadas del espacio de color CIELab y las diferencias de color de cada película con respecto al plato de calibración del colorímetro. La película que tuvo una mayor diferencia de color fue la película de quitosano, seguido de la película de alginato/quitosano y por último la de alginato. Estos resultados concuerdan con la apariencia visual de las películas, ya que la película de quitosano presenta una coloración marrón y la película de alginato es casi incolora (transparente), y por lo tanto la mezcla de los polisacáridos presenta una coloración intermedia entre las tonalidades de las películas puras. Una tendencia similar a la encontrada en los valores de ΔE fue observada para la coordenada de cromaticidad b^* .

Tabla 7.2. Valores de las coordenadas L*, a* y b* y diferencias de color (ΔE) de las películas comestibles medidos con un colorímetro.

Tipo de película	Coordenadas CIELab			ΔE
	L*	a*	b*	
Alginato	92.76±1.55 ^a	-0.36±0.07 ^a	11.23±2.59 ^c	10.30±3.01 ^c
Alginato/quitosano	91.65±0.60 ^{ab}	-1.82±0.14 ^b	21.80±1.81 ^b	20.66±1.85 ^b
Quitosano	90.69±1.23 ^b	-2.83±0.52 ^c	34.81±4.70 ^a	33.58±4.79 ^a

- 1) Valores (promedio \pm desviación estandar, n=3) en una columna con la misma letra no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$).
- 2) Los valores promedio de color del plato de calibración fueron: L* = 97.39 , a*= 0.00 y b*= 2.04.

En relación a la película de alginato, Rhim (2004) reportó valores de ΔE para películas de alginato con glicerol de 9.42 ± 0.11 , el cual es un valor muy cercano al que se obtuvo en este trabajo (10.30 ± 3.01). Para la película de quitosano, valores de ΔE de 1.66 ± 0.15 han sido reportados por Rivero y col. (2009); este valor es considerablemente menor al que se encontró en este trabajo que fue de 33.58 ± 4.79 . La razón de tal diferencia puede ser atribuida a que en ese trabajo se empleó quitosano de alto peso molecular y a que la formulación de la solución formadora de película no contenía glicerol como plastificante, ya que la concentración de glicerol afecta considerablemente la coloración de las películas de quitosano. Sin embargo, Ojagh y col. (2010) reportaron para películas de quitosano de mediano peso molecular con glicerol a una concentración de 0.75 mL/g de quitosano valores de ΔE de 17.35 ± 0.98 , el cual es un valor más cercano al que se encontró. Con respecto a la película de la mezcla que está formada por ambos polisacáridos no se encontraron en la literatura valores de color y ΔE para poderlos comparar con los que se obtuvieron.

7.1.1.3 Brillo

El brillo es uno de los factores estéticos que mejoran el aspecto general, así como la aceptación del consumidor (Bangyekan y col., 2006). Los valores de brillo de las películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano son gráficamente mostrados en la Figura 7.3. El brillo de las superficies de las películas fueron medidos a 20°, 60° y 85° con respecto a la normal de la superficie, para este trabajo los tres valores fueron reportados. Como se puede observar en la figura, a un ángulo de 60° se encontraron los valores de brillo más altos en comparación con los otros dos ángulos para las tres películas. Los valores de brillo medidos a un ángulo de 60° para las películas de alginato, alginato/quitosano y quitosano fueron de 49.00 ± 3.88 , 28.80 ± 5.92 y 120.17 ± 13.30 UB (Unidades de Brillo), respectivamente. Las diferencias entre los valores de brillo de las muestras están asociadas a la rugosidad superficial. Como se mostrará a detalle más adelante en la sección de caracterización microestructural de las películas comestibles, la película de quitosano posee una superficie extremadamente lisa y en consecuencia bajos valores de rugosidad expresados como Ra y Rq; y es por este hecho que valores de brillo altos son exhibidos para esta película. Por el contrario las películas de alginato y alginato/quitosano presentaron bajos valores de brillo en comparación con la película de quitosano y esto es debido a que estas películas presentan superficies más rugosas, siendo la película de alginato/quitosano la más rugosa por el arreglo microestructural ramificado que posee.

Valores de brillo medidos a 60° para películas de quitosano entre un rango de 132.5 y 145.6 unidades fueron reportados por Bangyekan y col. (2006); estos valores son similares a los encontrados para las películas de quitosano elaboradas. Ellos señalan que esta es una película altamente brillante y que esto se debe probablemente a la superficie lisa que tiene. No se encontraron valores de brillo para películas de alginato y alginato/quitosano en la literatura. Aunque el brillo es una propiedad de apariencia en las películas que tiene un gran impacto, esta no es una de las propiedades más medidas en trabajos relacionados a películas y recubrimientos comestibles, y es por esta razón que probablemente no se encuentren muchos valores de brillo reportados para películas hechas a base de estos biopolímeros.

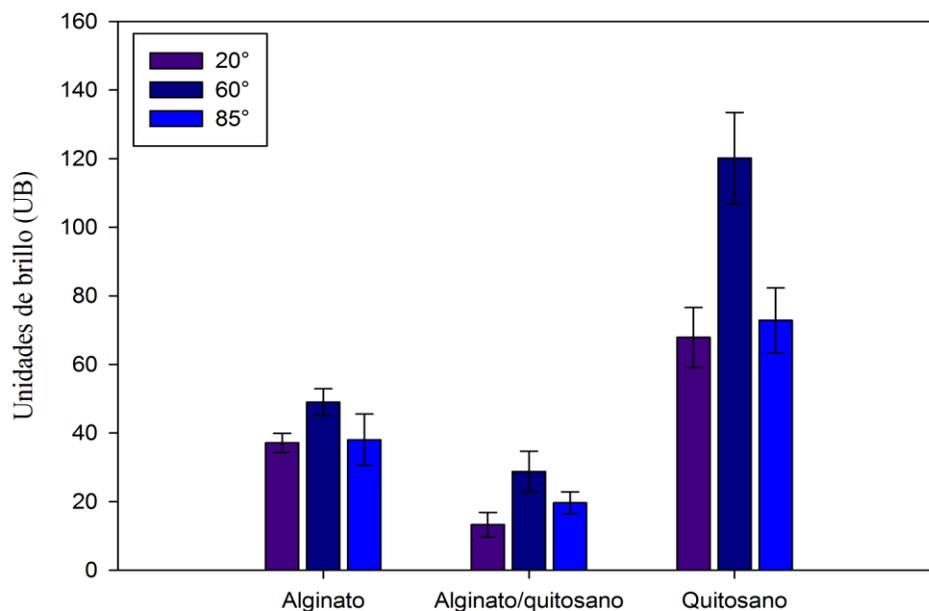


Figura 7.3. Valores de brillo de las superficies de las películas comestibles medidos a diferentes ángulos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

7.1.1.4 Propiedades mecánicas de películas comestibles

7.1.1.4.1 Efecto del tamaño de indentación (carga máxima de indentación) sobre las propiedades mecánicas de películas comestibles.

Las propiedades mecánicas a nanoescala de las películas comestibles fueron medidas mediante la técnica de nanoindentación. Inicialmente debido a que en la literatura existen pocos trabajos del uso de la técnica sobre películas comestibles se propuso llevar a cabo un estudio profundo de cómo las variables de la prueba de indentación afectan las propiedades mecánicas de las películas y en base a esto establecer las condiciones a las cuales se deben de realizar las pruebas para obtener datos confiables de las propiedades mecánicas de estos biomateriales y poder compararlos.

El primer experimento consistió en aplicar diferentes valores de cargas máximas sobre las muestras desde un rango de 0.5mN hasta 5 mN manteniendo constantes el tiempo de pausa de 60 segundos y la velocidad de carga y descarga de 2.5 mN/min para todas las pruebas; el propósito de este experimento fue examinar como varían la dureza, el módulo elástico y el desplazamiento de indentación en función de la carga máxima aplicada; así como también analizar que profundidades se logran sobre las películas con dichas cargas. Estos rangos se fijaron en base a pruebas preliminares que se realizaron sobre las películas.

En la Figura 7.4 se muestran graficas de cómo cambian los valores de dureza y módulo elástico en función de la carga máxima de indentación para muestras de películas de alginato, alginato/quitosano y quitosano.

Claramente se puede observar para las tres películas que al incrementarse la carga aplicada los valores de dureza y módulo elástico disminuyen gradualmente. Para la película de alginato se observó que los valores de dureza y módulo elástico disminuyeron notablemente cuando se aplicó una carga de 1 mN y posteriormente pequeños decrementos en los valores de estas propiedades fueron observados al incrementarse la carga. Por otra parte, en las películas de alginato/quitosano y quitosano el decremento de los valores de dureza y módulo elástico fueron drásticos hasta cargas de 2.5 mN y 3 mN, respectivamente; y consecutivamente a cargas mayores pequeños decrementos de los valores de éstas propiedades fueron vistos. Por lo tanto en base a éstos resultados, se podría establecer que a cargas de 2.5 mN en adelante se recomendaría realizar las pruebas de indentación sobre estas películas, debido a que hay una menor variabilidad en los resultados obtenidos.

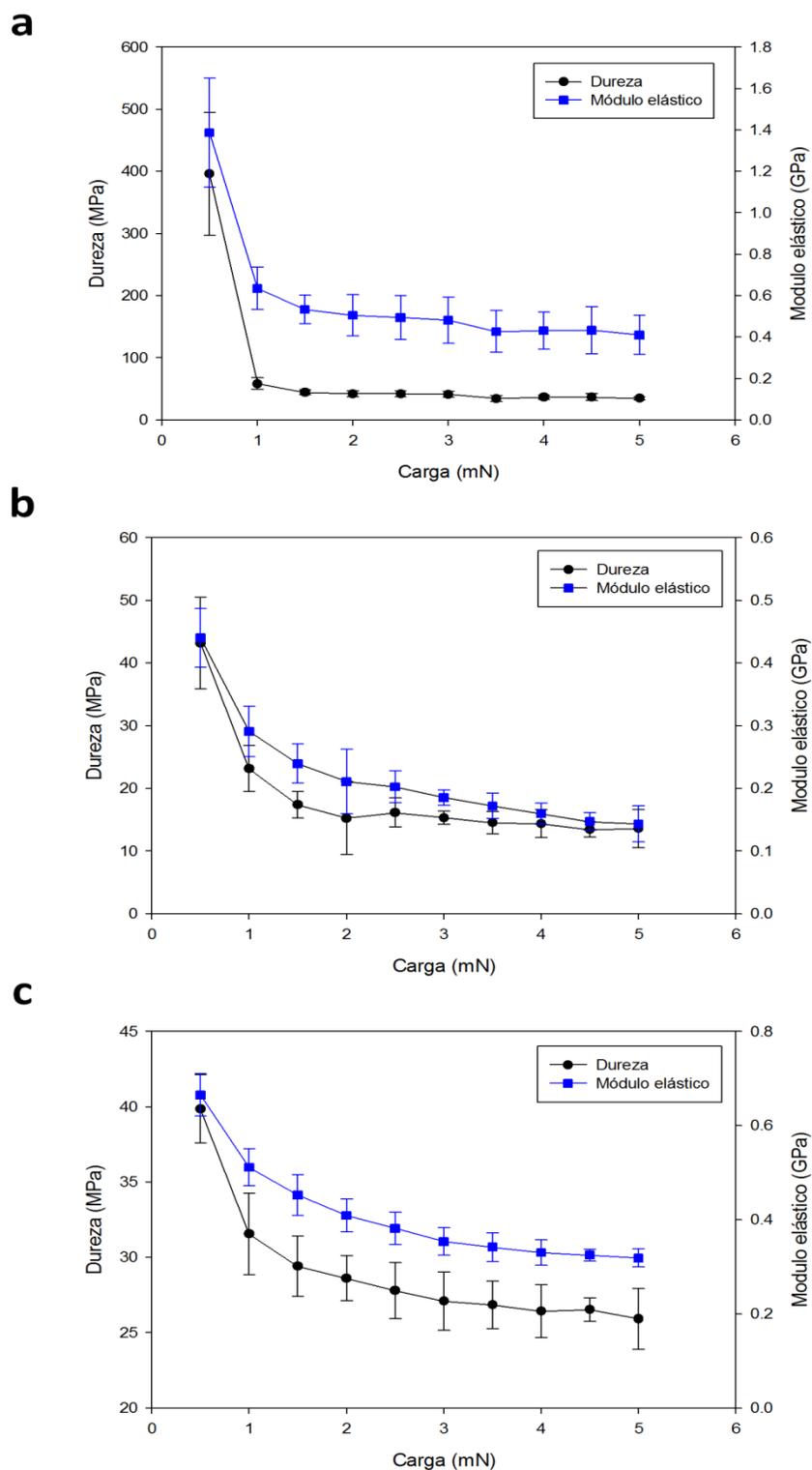


Figura 7.4. Valores de dureza y módulo elástico de películas comestibles en función de la carga máxima de indentación: alginato (a), alginato/quitosano (b) y quitosano (c).

Un efecto similar en relación a como varían las propiedades mecánicas en función de la carga de indentación fue reportado por Wang y col. (2005). Ellos observaron en películas de quitosano con nanotubos de carbono que al incrementarse en su caso la profundidad de indentación (incremento de la carga), los valores de dureza disminuían y que si se seguía penetrando más, dichos valores eran afectados por el substrato o soporte sobre el cual estaban montadas las muestras.

Este fenómeno donde los valores de dureza y modulo elástico disminuyen cuando se incrementa la carga de indentación ha sido observado en diferentes materiales y se le conoce como efecto del tamaño de indentación (ISE por sus siglas en inglés, Indentación Size Effect) (Lucca y col., 2010). Se sabe que los valores de dureza son más afectados por este fenómeno que los valores de modulo elástico y generalmente hablando el ISE significa que la dureza a pequeñas profundidades tiene valores mucho mayores que a grandes profundidades (Rodríguez y Gutiérrez, 2003). Por lo tanto, los valores de dureza dependen fuertemente de la profundidad de indentación y es por esta razón que la interpretación de las mediciones de nanodureza resulta difícil. Con el propósito de explicar esta dependencia del tamaño, diferentes autores suponen que el efecto del fortalecimiento está relacionado intrínsecamente a la deformación no uniforme. Mediante el uso de este concepto, el modelo de gradiente de esfuerzo de plasticidad (SGP, por sus siglas en inglés Strain Gradient Plasticity) fue desarrollado y este modelo considera una escala de longitud de material mediante el concepto de dislocaciones geoméricamente necesarias como función del gradiente de esfuerzos (Rodríguez y Gutiérrez, 2003).

En la Figura 7.5 se muestra una galería de imágenes de las impresiones residuales hechas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una muestra de película de alginato. Se observa claramente que al aumentarse la carga, el tamaño de las impresiones residuales se incrementa notablemente. Resultados similares son mostrados en las Figuras 7.6 y 7.7 para películas de alginato/quitosano y quitosano, respectivamente.

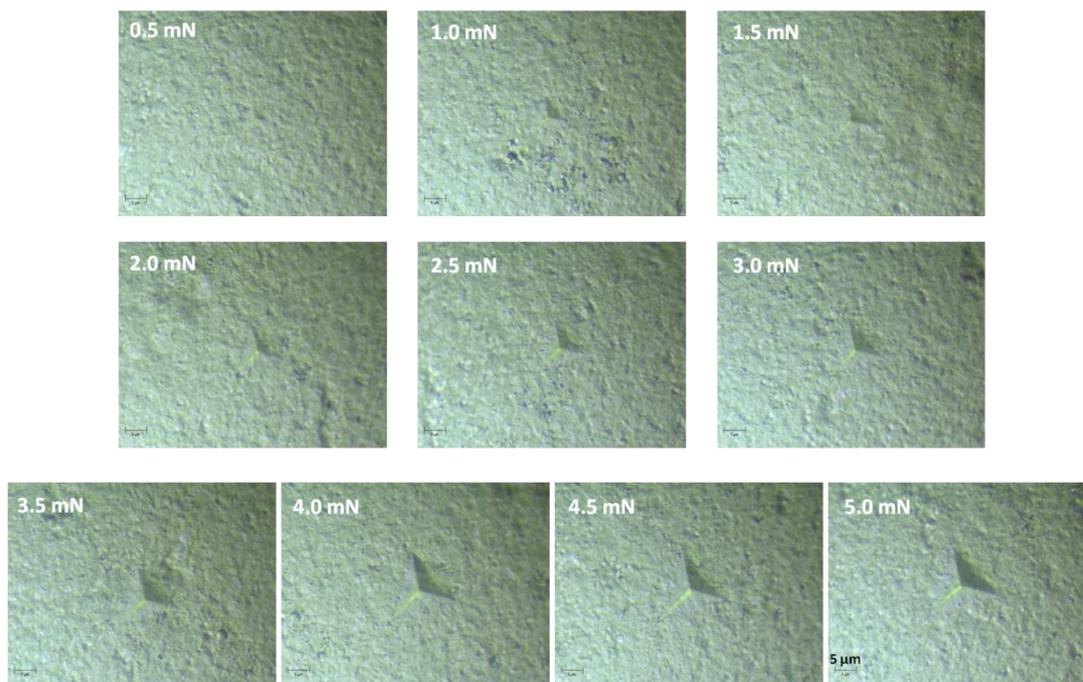


Figura 7.5. Galería de imágenes de las impresiones residuales realizadas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una película comestible de alginato.

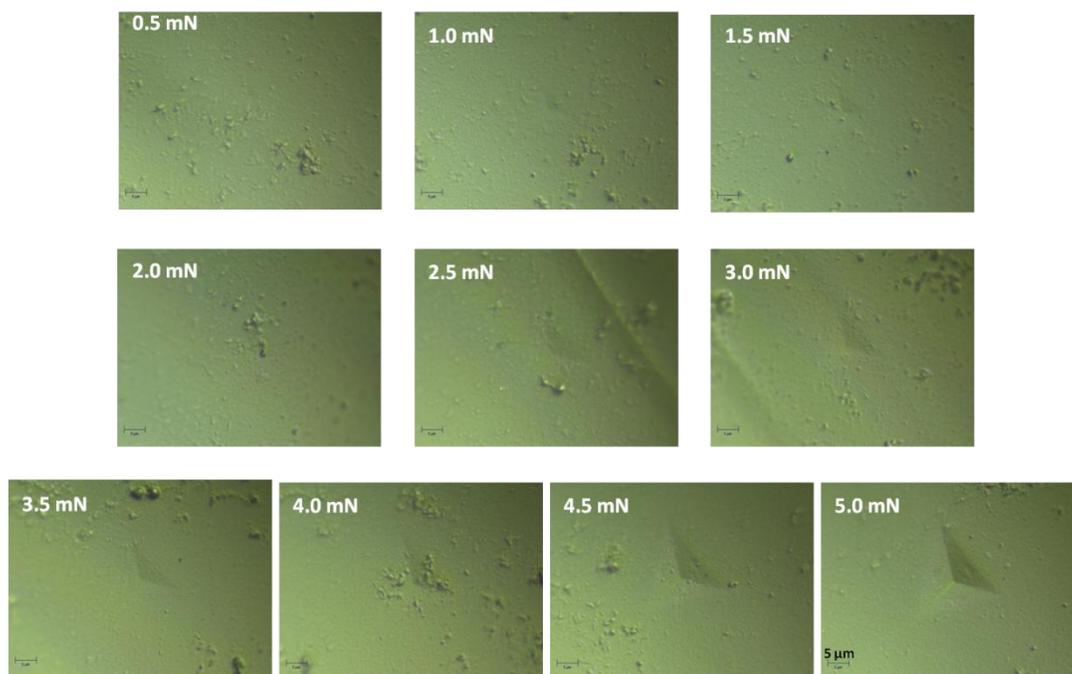


Figura 7.6. Galería de imágenes de las impresiones residuales realizadas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una película comestible de alginato/quitosano.

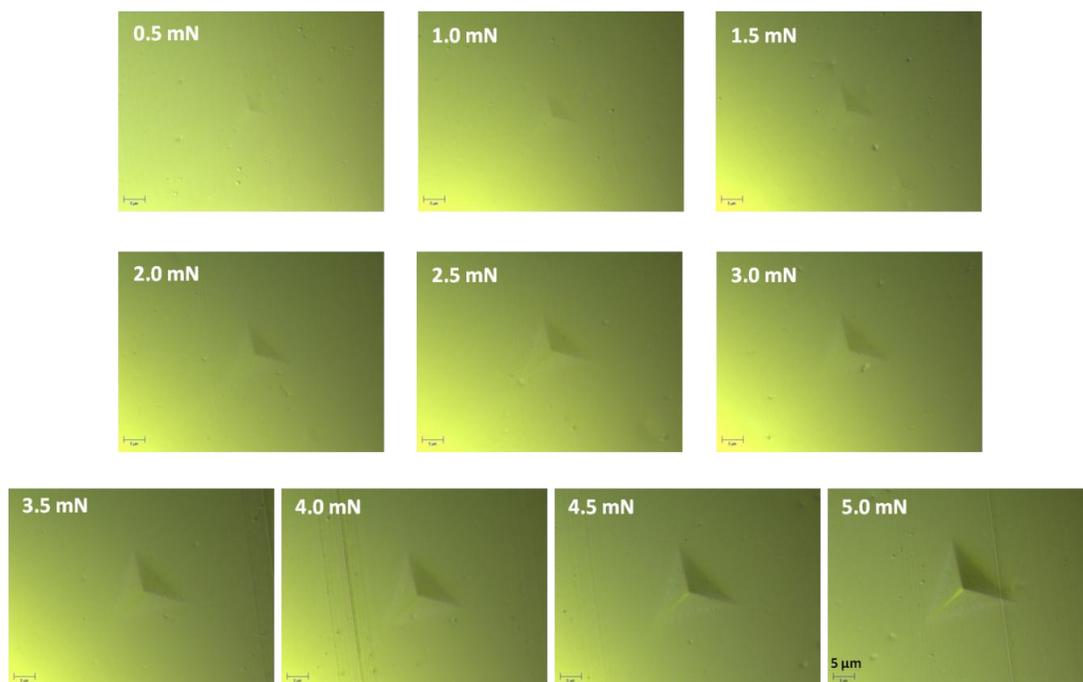


Figura 7.7. Galería de imágenes de las impresiones residuales realizadas con una punta Berkovich a diferentes cargas sobre una película comestible de quitosano.

En la Figura 7.8 se muestra una grafica que relaciona la profundidad máxima de indentación en función de la carga máxima para los tres tipos de películas elaboradas y como se nota al incrementarse la carga, la profundidad máxima de indentación se incrementa siguiendo un perfil aproximadamente lineal. Los valores de profundidad máxima de indentación a una carga de 5mN para las películas de alginato, alginato/quitosano y quitosano fueron de 3021.56 ± 245.56 , 4982.26 ± 607.43 y 3448.60 ± 122.10 nm, respectivamente. Es importante conocer la profundidad máxima de indentación, ya que para el caso de películas delgadas, en base a la norma la profundidad máxima de indentación no deberá ser mayor al 10% del espesor de la película con el propósito de evitar que haya efecto del sustrato sobre las mediciones de las propiedades mecánicas (ISO 14577, parte 4). Por lo tanto, considerando la información anterior se cumplió con la norma ya que para las tres películas la penetración máxima de indentación fue menor al 10% del

espesor de las películas, el cual se consideró como un valor promedio de los valores de las tres películas medidos con el micrómetro que fue de 6904.66 ± 381.56 nm.

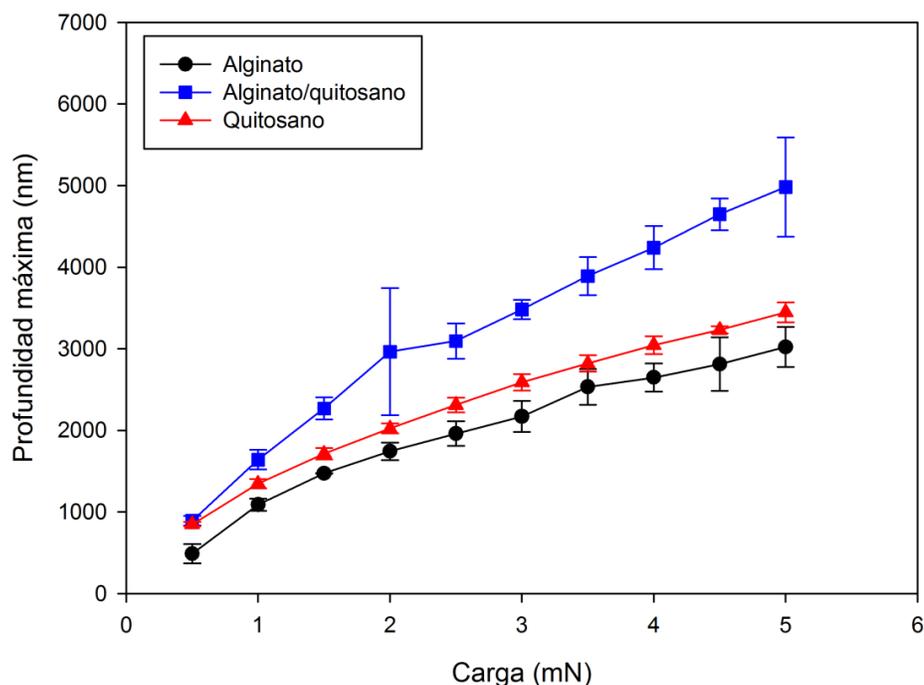


Figura 7.8. Profundidad máxima de indentación en función de la carga máxima para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.

Por otro parte, considerando los valores de profundidad máxima a una carga de 5mN para las tres películas, se puede concluir de manera preliminar que la película de alginato/quitosano es la menos dura debido a que a esta carga la profundidad máxima de indentación fue mayor en comparación con las otras películas. De manera contraria, la película de alginato se puede considerar que es la más dura debido a que su valor de profundidad fue el menor de las tres películas. Y por último, la película de quitosano se podría decir que presenta una dureza intermedia entre las tres películas considerando su valor de profundidad, aunque su dureza tendría valores muy cercanos a los de la película de alginato.

El desplazamiento de indentación es un fenómeno que ocurre en materiales que poseen propiedades viscoelásticas y éste fue observado en las películas elaboradas en este trabajo.

Valores del desplazamiento de indentación (creep indentation) en función de la carga máxima aplicada para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano son mostrados en la Figura 7.9.

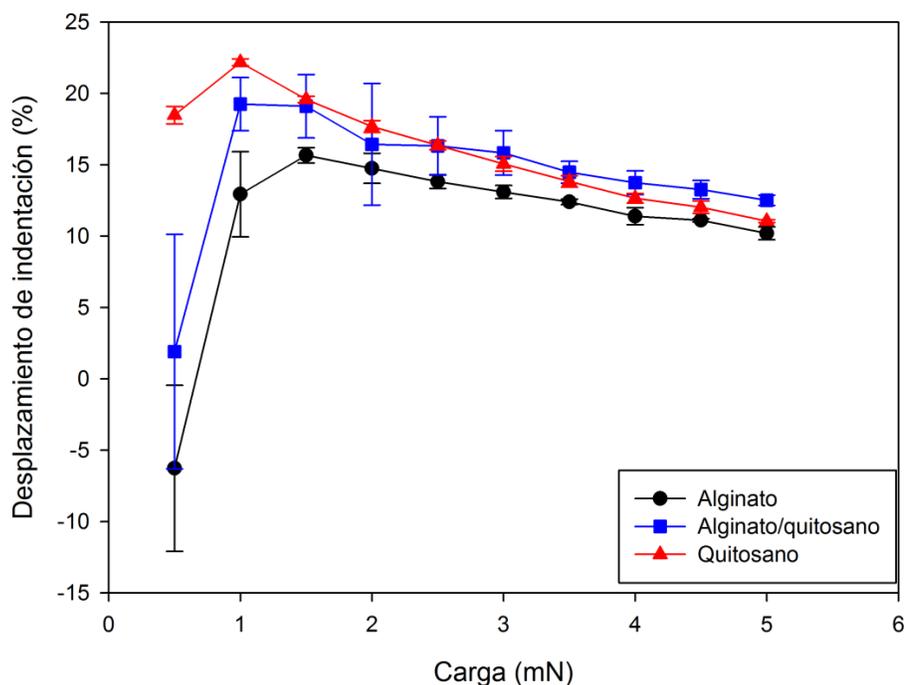


Figura 7.9. Valores del desplazamiento de indentación (creep indentation) en función de la carga máxima aplicada para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.

Para las tres películas se observó, que existe un valor máximo de desplazamiento de indentación el cual se presentó para la película de alginato (15.65 ± 0.53 %) a una carga de 1.5 mN, y para las películas de alginato/quitosano (19.25 ± 1.86 %) y quitosano (22.17 ± 0.24 %) a una carga de 1 mN. A valores de carga mayores a los mencionados anteriormente, se observó que los valores del desplazamiento de indentación disminuyen progresivamente, esto hecho puede deberse a que a profundidades mayores existe una mayor resistencia del material a ser penetrado, por lo que la carga constante al cual es sometido (periodo de pausa) sólo llega a penetrar hasta una determinada distancia máxima que va siendo cada vez menor cuando se incrementa la carga máxima de indentación. Por otro lado, bajos valores fueron observados a cargas de indentación menores donde se

presentó el valor máximo del desplazamiento de indentación; incluso valores negativos como en el caso de la película de alginato. Estos resultados pueden estar asociados a que a cargas pequeñas, se presenta en la superficie de estos materiales un efecto de rebote que está relacionado con la elasticidad del material, lo que provoca que al mantenerse la carga constante exista una fuerza de repulsión y por lo tanto la profundidad de la penetración sea pequeña en el periodo de pause.

7.1.1.4.2 Efecto del tiempo de pausa a carga constante (desplazamiento de indentación) sobre las propiedades mecánicas de películas comestibles.

Se evaluó el efecto del tiempo del periodo de pause sobre la dureza y el modulo elástico de las películas comestibles y los resultados se muestran en la Figura 7.10. Para la obtención de estos perfiles la carga aplicada fue de 2.5 mN y la velocidad de carga y descarga de 2.5 mN/min para todas las pruebas, solo se varió el tiempo de pausa desde 10 hasta 100 segundos. Como se observa, los valores del módulo elástico se ven menos influenciados por el cambio del tiempo de pause (desplazamiento de indentación) a diferencia de los valores de dureza. Un decremento en los valores de dureza hasta un tiempo de 40 segundos fue observado para la película de alginato, después de este tiempo los valores se mantuvieron relativamente constantes, por lo tanto, tiempos de pausa mayores a los 40 segundos serían los recomendados para hacer las pruebas de indentación para esta película. Un comportamiento similar fue observado para la película de quitosano pero a un tiempo de 60 segundos, donde después de este tiempo los valores permanecieron constantes y estos serían los recomendados para llevar a cabo las pruebas. Finalmente los resultados de la película de alginato/quitosano mostraron una disminución en los valores de dureza y módulo elástico, pero una tendencia similar a las películas de alginato y quitosano no fue observada. Por lo tanto, el periodo de pausa influye directamente sobre los valores de dureza y módulo elástico de las películas comestibles hechas a partir de alginato y quitosano, y el conocer los intervalos de tiempo donde las propiedades mecánicas no se ven afectadas resulta de gran importancia. Se puede concluir que tiempos de periodo de pausa de 60 segundos o mayores para las películas examinadas, serían los recomendados debido a que la variabilidad de las propiedades mecánicas es menor.

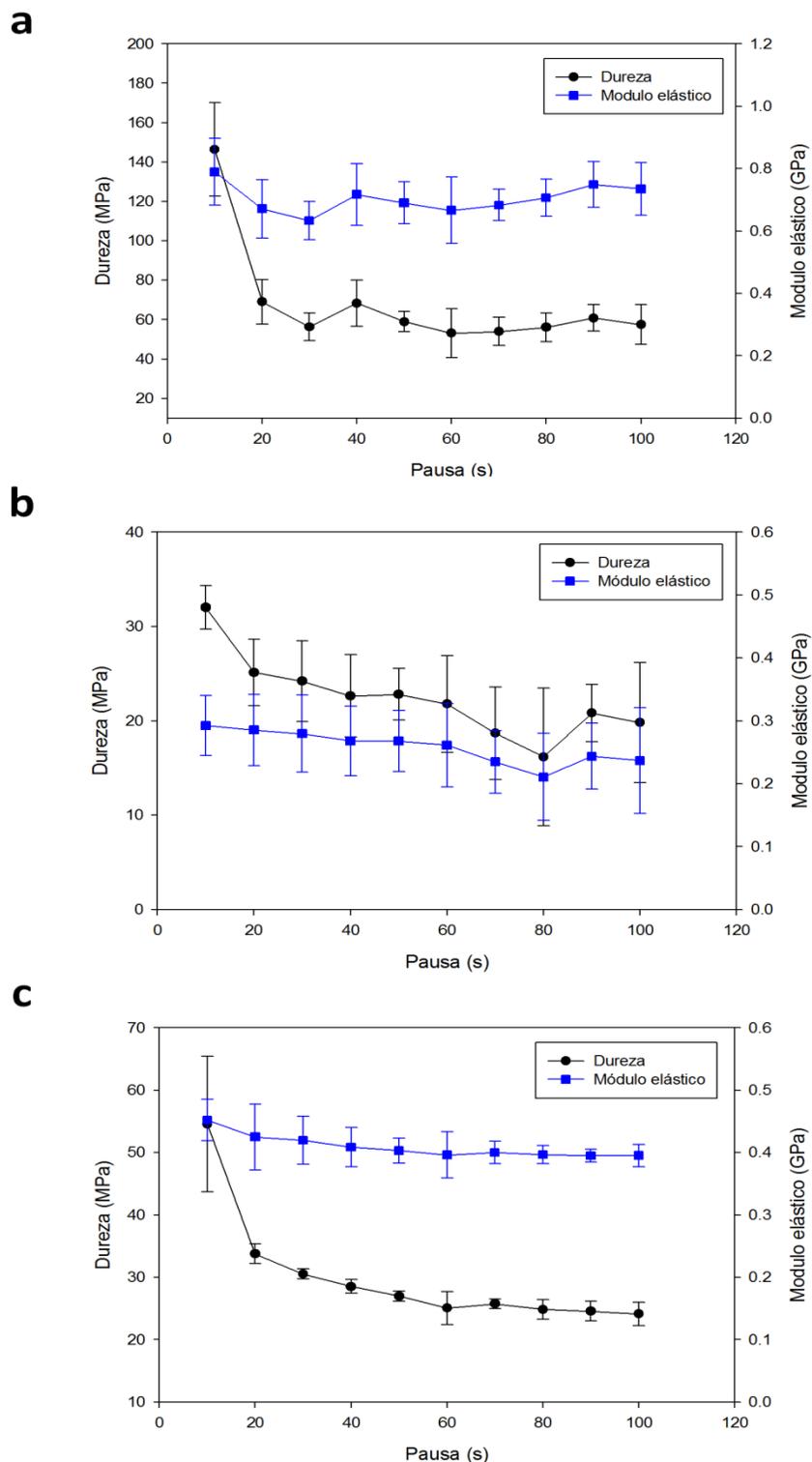


Figura 7.10. Valores de dureza y módulo elástico de películas comestibles en función del tiempo de pausa a carga constante: alginato (a), alginato/quitosano (b) y quitosano (c).

Como ya se ha mencionado anteriormente, son escasos los estudios donde se emplea la técnica de nanoindentación para obtener propiedades mecánicas de películas comestibles por lo que no se cuenta con datos con que comparar nuestros resultados, sin embargo, existe mucha información en relación a otros tipos de materiales como cerámicos, polímeros, minerales, metales y materiales biológicos.

En relación a esto, se ha investigado como varían el módulo elástico y la dureza en función del tiempo de pausa sobre PMMA (polimetilmetacrilato) y los resultados mostraron una tendencia similar a la que se encontró para películas comestibles. En el estudio se reporta que la dureza es la propiedad que está más influenciada por el tiempo de pausa. Además, se encontró que para este material, sólo después de los 40 segundos el módulo elástico ya no se ve afectado por el tiempo de pausa y la dureza para tiempos mayores a 100 segundos. Estos resultados fueron reportados en un boletín de la compañía CSM Instruments (Boletín de aplicación No. 22) que es el fabricante del equipo de nanoindentación utilizado para el desarrollo de estas pruebas.

También se evaluó el efecto del tiempo de pausa sobre el desplazamiento de la indentación y los resultados son mostrados en la Figura 7.11. Como se esperaba, los resultados indicaron que al incrementarse el tiempo de pausa el desplazamiento de la indentación se incrementó, esto debido a que a un mayor tiempo el indentador tiene la posibilidad de penetrar más la superficie de la muestra. Valores de desplazamiento de indentación de 2.98 ± 0.69 a 14.89 ± 2.36 , 4.65 ± 0.23 a 20.59 ± 0.94 y 4.09 ± 0.36 a 19.26 ± 0.67 % fueron encontrados para las películas de alginato, alginato/quitosano y quitosano, respectivamente. Las muestras de quitosano y alginato/quitosano presentaron valores del desplazamiento de indentación muy similares, los cuales fueron superiores a los encontrados para la película de alginato.

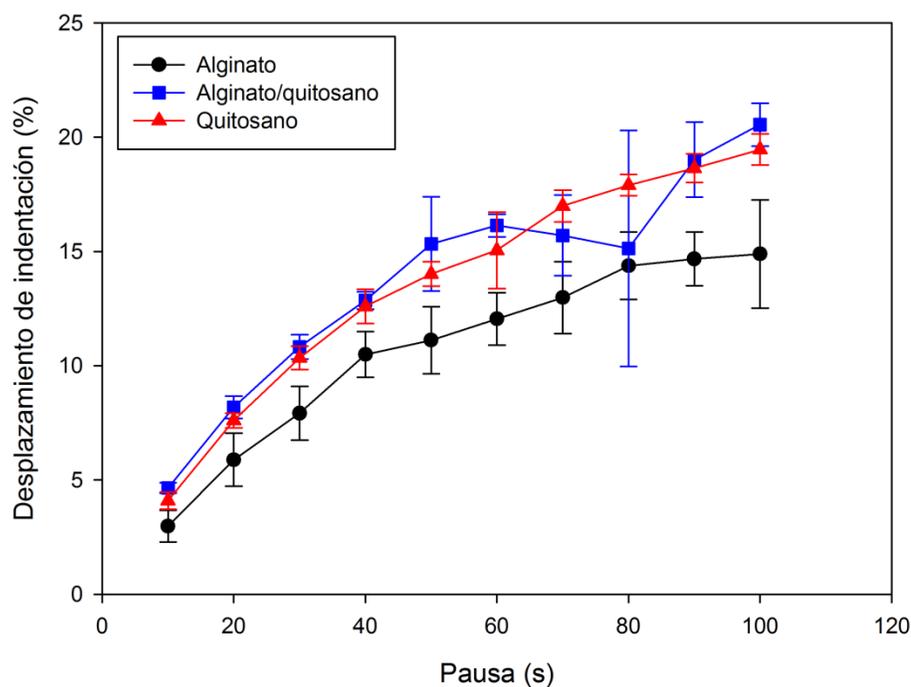


Figura 7.11. Valores de desplazamiento de indentación (creep indentation) en función del tiempo de pausa a carga constante para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.

Diversos trabajos han sido realizados enfocándose a las propiedades viscoelásticas de diversos biomateriales o tejidos biológicos incluyendo huesos, dentina desmineralizada, arterias y piel (Ebenstein & Pruitt, 2006). Por ejemplo, Wu y col. (2011) estudiaron el efecto del tiempo de pausa sobre el desplazamiento de la indentación en huesos y ajustaron sus resultados a tres modelos reológicos (sólido lineal estándar, Burgers y Kelvin). Ellos reportaron que los modelos tuvieron un adecuado ajuste a sus resultados siendo el mejor modelo el de Burgers y las constantes de tiempo de desplazamiento de indentación fueron incrementándose cuando se incrementó el tiempo de pausa.

La nanoindentación es una técnica que puede ser usada para investigar las propiedades viscoelásticas de materiales mediante el desplazamiento de indentación o conocido inglés como “creep indentation”. Los datos obtenidos pueden ser ajustados a modelos reológicos

con el propósito de determinar parámetros que describan el comportamiento viscoelástico (Wu y col., 2011). Por lo tanto, para trabajos futuros sería interesante utilizar los valores obtenidos para las películas comestibles y ajustarlos a este tipo de modelos para describir su comportamiento viscoelástico.

7.1.1.4.3 Efecto de la velocidad de carga y descarga sobre el fenómeno de desplazamiento de indentación.

La Figura 7.12 muestra los resultados del desplazamiento de indentación en función de la velocidad de carga y descarga sobre películas de alginato, alginato/quitosano y quitosano. Para estas pruebas una carga de 2.5 mN y un tiempo de pausa de 60 segundos fueron fijados y sólo se varió la velocidad de carga y descarga (1, 2.5, 5, 10 y 20 mN/min). Los resultados revelan que el desplazamiento de la indentación está altamente influenciado por la velocidad de carga y descarga usada durante las pruebas. Un incremento de manera logarítmica fue observado para los valores del desplazamiento de indentación para las tres películas. Para la película de alginato/quitosano valores negativos a una velocidad de carga y descarga de 1 mN/min fueron observados, este hecho puede estar asociado al efecto de rebote que está relacionado con la elasticidad del material como se ha mencionado anteriormente.

Comportamientos similares al encontrado para películas de alginato y quitosano han sido reportados para el polímero PMMA en relación al efecto de la velocidad de carga y descarga sobre el desplazamiento de la indentación. Por lo tanto, como el desplazamiento de la indentación está fuertemente relacionado con la deformación plástica, cada etapa dentro del régimen plástico durante la prueba de indentación está acompañada por una pequeña cantidad de desplazamiento (Boletín de aplicación No. 22, CSM Instruments).

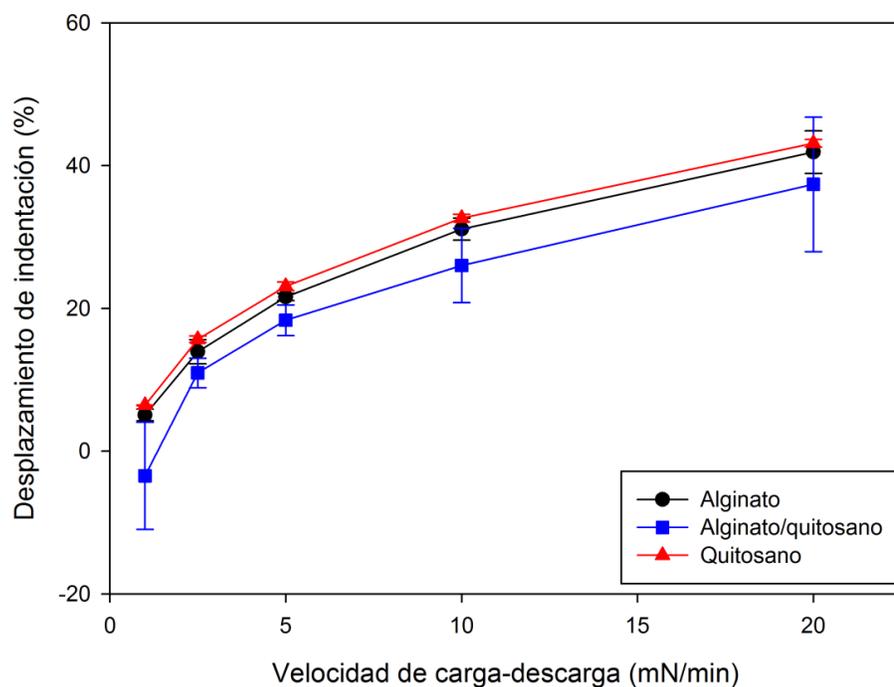


Figura 7.12. Valores de desplazamiento de indentación en función de la velocidad de carga y descarga para películas comestibles hechas a base de alginato y quitosano.

7.1.1.4.4 Propiedades mecánicas de películas comestibles hechas de alginato y quitosano

Una vez que se estudió el efecto de la carga máxima, el tiempo de pausa y la velocidad de carga y descarga sobre las propiedades mecánicas de las películas comestibles, se hicieron indentaciones fijando las condiciones de las pruebas (carga de 2.5 mN, pausa de 60 segundos y velocidad de carga y descarga de 2.5 mN/min) y los resultados de las propiedades mecánicas a dichas condiciones se resumen en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Valores de las propiedades mecánicas de películas comestibles determinadas mediante la técnica de nanoindentación a una carga de 2.5 mN, pausa de 60 segundos y velocidad de carga-descarga de 2.5 mN/min.

Tipo de película	Propiedades mecánicas			
	Dureza (MPa)	Módulo elástico (GPa)	Desplazamiento de indentación (%)	Parte elástica del trabajo de indentación (%)
Alginato	37.82±5.79 ^a	0.44±0.06 ^a	11.75±1.82 ^b	34.32±5.54 ^a
Alginato/Quitosano	16.20±2.07 ^c	0.21±0.03 ^c	15.77±2.27 ^a	28.94±2.74 ^a
Quitosano	26.32±2.67 ^b	0.35±0.04 ^b	14.99±1.95 ^a	27.80±2.40 ^b

1) Valores (promedio ± desviación estandar, n=30) en una columna con la misma letra no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$).

La película de alginato tuvo el mayor valor de dureza (37.82±5.79 MPa), seguido por la de quitosano (26.32±2.67 MPa) y por último la de alginato/quitosano (16.20±2.07 MPa). En la literatura se han reportado valores de dureza para películas de quitosano medidos con la técnica de nanoindentación. Wang y col. (2005) reportaron valores de dureza para películas de quitosano sin glicerol y con 0.4 % en peso de nanotubos de carbono de 119 MPa y 163 MPa, respectivamente. Estos valores son aproximadamente 4 veces más altos que los que se encontraron en este trabajo para las películas de quitosano. Aunque se debe tomar en cuenta que existen algunos factores a las cuales se pueden atribuir estas diferencias como son el peso molecular del quitosano, debido a que en este trabajo se usó quitosano de bajo peso molecular a diferencia del usado por Wang y col. (2005) que fue de alto peso molecular. Otro factor es que en nuestro caso, se utilizó glicerol como plastificante y en el de ellos no se usó ningún plastificante, y es bastante conocido que el glicerol es un compuesto que modifica drásticamente las propiedades mecánicas de las películas comestibles haciéndolas más flexibles debido a que el glicerol interfiere con las cadenas de quitosano, disminuyendo las fuerzas de atracción intermoleculares e incrementando la

movilidad del polímero (Ziani y col. 2008). En otro trabajo, Lavorgna y col. (2010) reportaron valores de dureza para películas de quitosano de alto peso molecular sin y con glicerol de 180 MPa y 50 MPa, respectivamente. El valor reportado en este trabajo para la película de quitosano con glicerol (50 MPa) es aproximadamente el doble del que se reporta (26.32 MPa), y este resultado parece ser lógico considerando que el contenido de glicerol en su formulación fue la mitad del que se ocupó para la elaboración de las películas, por lo que se esperaría que la película fuera menos dura en comparación con la de ellos. Por lo tanto, analizando los resultados obtenidos y los reportados en la literatura se puede decir que el glicerol juega un papel importante en la dureza de películas comestibles hechas a base de quitosano. Con relación a las películas de alginato y de la mezcla, no se encontraron en la literatura valores de dureza reportados con la técnica de nanoindentación.

Con respecto a los valores del módulo elástico, los resultados obtenidos mostraron una tendencia similar a la encontrada para los valores de dureza, donde la película de alginato presentó el valor más alto (0.44 ± 0.06 GPa), seguido por la de quitosano (0.35 ± 0.04 GPa) y por último la de alginato/quitosano (0.21 ± 0.03 GPa). Lo anterior significa que la película que se consideraría más elástica es la película de alginato/quitosano debido a que presenta el valor más bajo de modulo elástico. Valores de módulo elástico para películas de quitosano con y sin glicerol de 1.70 y 5.76 GPa han sido reportados por Lavorgna y col.; los cuales son considerablemente mayores a los encontrados y estas diferencias pueden estar asociadas al efecto del glicerol sobre la matriz del polímero como se ha discutido anteriormente.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los valores del desplazamiento de la indentación para las películas de alginato y alginato/quitosano. La película de alginato mostró un valor de desplazamiento de indentación bajo en comparación con los otros dos tipos de películas que fue de 11.75 ± 1.82 %. Como se ha mencionado anteriormente los materiales que presentan el fenómeno de desplazamiento de indentación poseen propiedades viscoelásticas, por lo tanto las tres películas evaluadas en este trabajo poseen propiedades viscoelásticas. Finalmente, valores de la parte elástica del trabajo de

indentación estuvieron entre un rango de 27.80 a 34.32 % para las películas hechas de alginato y quitosano. No se encontraron en la literatura valores de estos parámetros para películas comestibles elaboradas de cualquier biopolímero, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo resultan trascendentales.

Mediante el uso de la técnica de nanoindentación fue posible caracterizar las propiedades mecánicas a nivel nanométrico de las películas comestibles elaboradas en este trabajo y los resultados obtenidos resultan importantes y trascendentales para el área de películas y recubrimientos comestibles debido a que aportan información para el entendimiento de las propiedades a estos niveles así como del comportamiento viscoelástico de dichos biomateriales. Además, las diferencias encontradas en las películas pueden estar asociadas principalmente a la microestructura por lo que sería importante realizar estudios más detallados acerca de la relación de la microestructura con las propiedades nanomecánicas.

7.1.2 Caracterización cuantitativa de la microestructura de películas comestibles

7.1.2.1 Microscopia de Luz

La Figura 7.13 muestra micrografías de microscopía de luz (ML) de las películas a diferentes magnificaciones, donde se observa que las películas de alginato y quitosano presentan superficies lisas a todos los niveles de magnificación en comparación con la película de alginato/quitosano la cual presentó una superficie extremadamente rugosa.

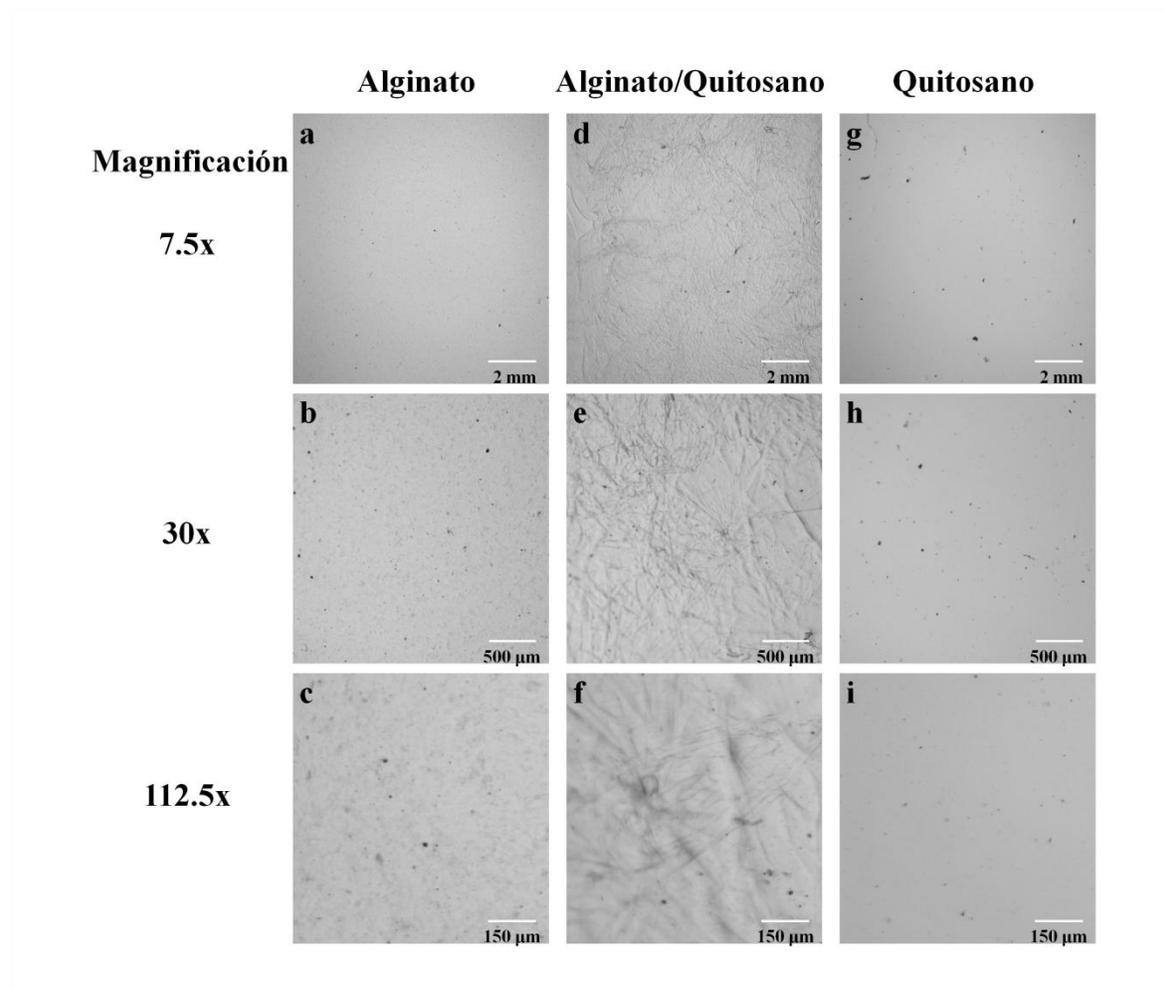


Figura 7.13. Galería de imágenes (escala de grises) de las superficies de películas comestibles examinadas con un microscopio de luz a diferentes ampliaciones: 7.5x, 30x y 112.5x.

Asimismo, como puede ser visto las películas de alginato exhibieron una textura lisa con pequeñas irregularidades distribuidas homogéneamente sobre la superficie. En las micrografías tomadas a altos niveles de magnificación se pueden observar con más detalle las irregularidades de la superficie de la película. La formación de dichas irregularidades puede estar asociada a la aglomeración de moléculas de alginato, así como también a la matriz de alginato que se forma cuando la película es secada (Norajit, Kim & Ryu, 2010; Meng y col., 2010). Imágenes con un alto grado de rugosidad y estructura fibrilada fueron observadas para las películas de alginato/quitosano (ver Figura 7.13). La microestructura

observada en las películas de alginato/quitosano puede deberse a las interacciones electrostáticas establecidas entre las moléculas de alginato y quitosano (Ke, Xu, & Yu, 2010). Finalmente, las superficies de las películas de quitosano mostraron ser muy lisas, homogéneas y sin irregularidades, además de que grietas y hoyos sobre las películas no fueron observados. La superficie lisa y homogénea de las películas de quitosano puede estar asociada a las moléculas de quitosano que están fuertemente empaquetadas (Meng y col, 2010).

Complementariamente a la descripción de la microestructura de las películas, parámetros texturales basados en los algoritmos GLCM y SDBC fueron obtenidos a partir de imágenes de ML y sus valores son listados en la Tabla 7.4. Como se esperaba, los parámetros texturales describieron adecuadamente la textura de las películas observadas con microscopía de luz. Con respecto al parámetro de energía, a una magnificación de 7.5x no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de las diferentes películas. Por lo tanto, como el parámetro de energía mide la uniformidad textural de una imagen; es posible decir que a bajos valores de magnificación, la uniformidad textural de las películas fue similar. En contraste, los valores de energía estimados a una magnificación de 112.5x fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$); como ejemplo el valor de energía para la película de quitosano fue de $700.00 \pm 0.00 \times 10^{-5}$, debido a posee una textura uniforme, mientras que para la película de alginato/quitosano fue de $233 \pm 0.00 \times 10^{-5}$ mostrando una textura irregular.

Para el parámetro de homogeneidad, los tres tipos de películas evaluadas a una magnificación de 7.5x mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo este parámetro aquel que permite diferenciar la textura superficial de las películas cuando son analizadas a una baja magnificación en comparación con el parámetro de energía donde no se presentaron diferencias significativas entre las películas estudiadas. Además, las películas de quitosano no tuvieron diferencias significativas en los valores de homogeneidad a las diferentes magnificaciones, lo cual puede ser explicado como resultado de texturas lisas y homogéneas en todos los casos.

En lo que respecta al contraste, las películas de alginato/quitosano tuvieron los valores más altos en comparación con las películas de alginato y quitosano a magnificaciones de 7.5x y 30x. Los altos valores de contraste medidos sobre las películas de alginato/quitosano pueden ser debidos a la microestructura fibrilar formada en las películas (Ke y col., 2010).

El valor más alto del parámetro de entropía (8.51 ± 0.04) correspondió a la película de alginato/quitosano a una magnificación de 7.5x.

Finalmente, los valores de dimensión fractal para todas las películas pueden estar asociados con la rugosidad observada en sus respectivas imágenes, donde como era de esperarse, la película de alginato/quitosano tuvo el valor de dimensión fractal más alto (2.40 ± 0.01), mientras que bajos valores fueron observados para las películas de alginato y quitosano (superficies lisas). Los valores de dimensión fractal para cada una de las películas a los diferentes niveles de magnificación no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con excepción de la película de alginato/quitosano a 112.5x. Sin embargo, diferencias fueron encontradas ($p > 0.05$) cuando los diferentes tipos de películas son comparadas entre ellas a un mismo nivel de magnificación; con excepción de la comparación entre las películas de alginato y alginato/quitosano a una magnificación de 112.5x.

Tabla 7.4. Valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de películas comestibles obtenidas por un microscopio de luz (ML) a diferentes magnificaciones.

Tipo de película	Magnificación/ Campo de Visión (mm ²)	Parámetros de textura				
		Energía (x 10 ⁻⁵)	Contraste	Homogeneidad (x 10 ⁻²)	Entropía	Dimensión fractal
Alginato	7.5x/28.44	86.00±3.00 ^{de}	25.04±1.81 ^{de}	28.56±0.55 ^{bc}	7.50±0.04 ^b	2.25±0.00 ^b
	30x/7.36	100.00±0.00 ^{de}	49.53±3.11 ^{cd}	26.80±0.81 ^c	7.02±0.01 ^{bc}	2.28±0.02 ^b
	112.5x/0.63	467.00±58.00 ^b	56.62±1.01 ^c	33.03±0.58 ^{ab}	5.79±0.02 ^{de}	2.23±0.00 ^b
Alginato/quitosano	7.5x/28.44	30.00±2.00 ^c	111.09±1.99 ^a	13.50±0.72 ^e	8.51±0.04 ^a	2.40±0.01 ^a
	30x/7.36	78.00±15.00 ^{de}	84.27±10.00 ^b	19.60±0.70 ^d	7.68±0.16 ^b	2.41±0.00 ^a
	112.5x/0.63	233.00±115.00 ^c	56.65±8.28 ^c	30.63±4.35 ^{bc}	6.55±0.69 ^c	2.27±0.06 ^b
Qitosano	7.5x/28.44	100.00±0.00 ^{de}	17.97±0.40 ^e	35.86±0.15 ^a	7.11±0.02 ^{bc}	2.16±0.01 ^c
	30x/7.36	200.00±0.00 ^{cd}	37.56±3.28 ^d	35.63±0.50 ^a	6.47±0.03 ^{cd}	2.14±0.01 ^c
	112.5x/0.63	700.00±0.00 ^a	50.76±1.75 ^{cd}	36.63±0.66 ^a	5.32±0.09 ^e	2.10±0.00 ^c

1) Valores (promedio ± desviación estandar, n=5) en una columna con la misma letra no muestran diferencias significativas (p > 0.05).

El análisis de textura de imágenes mostró ser una herramienta efectiva para cuantificar la microestructura de películas comestibles observadas por LM; este hecho ha sido reportado para otras superficies alimenticias en trabajos previos (Fernández y col., 2005; Briones & Aguilera, 2005; Mendoza y col., 2007; Quevedo y col., 2008; Quevedo y col., 2009). Villalobos y col. (2005) estudiaron el efecto de la adición de surfactantes sobre la microestructura y parámetros ópticos de películas de hidroxipropil metilcelulosa. Mediante el uso de microscopía de luz, ellos evaluaron la complejidad de la superficie de las películas usando el parámetro de dimensión fractal. En otro trabajo, Veiga-Santos y col. (2008) estudiaron la eficacia de la microscopía de luz, como una herramienta para generar imágenes, para evaluar la microestructura de biopelículas. En un trabajo reciente, Liu y col. (2009) publicaron resultados acerca de la influencia que tiene la proporción de los componentes sobre la morfología de membranas de almidón/quitosano mediante el uso de ML y en base a sus resultados obtenidos ellos pudieron observar fácilmente la separación de las fases de estos componentes. Por lo tanto, es posible decir que la ML es una herramienta esencial para estudios cualitativos de morfologías de superficie de películas comestibles y además esta tiene algunas ventajas tales como el ser una herramienta económica y rápida, que permite analizar grandes áreas de las muestras.

7.1.2.2 Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental

Micrografías seleccionadas de ESEM de la sección transversal de las películas son mostradas en la Figura 7.14. Como se puede observar, las películas de alginato y quitosano presentaron estructuras compactas y homogéneas, sin poros ni fracturas (Figura 7.14a-c). Por otra parte, la morfología de sección transversal de la película de alginato/quitosano fue menos homogénea que las películas de alginato y quitosano, y algunos poros fueron observados (Figura 7.14b).

En la Figura 7.15 se muestran micrografías de las superficies de las películas comestibles examinadas a diferentes magnificaciones: 350x, 500x y 650x. Las superficies de las películas de alginato fueron homogéneas, lisas, sin poros y con pequeñas irregularidades como se muestra en la Figura 7.15. Norajit y col. (2010) reportaron que películas de

alginate sin glicerol y con iones de calcio presentaron morfologías de superficie lisas y homogéneas y que la morfología de sección transversal presentó una estructura fibrilar. Por otra parte, morfologías de superficie lisas para películas de alginato sin glicerol y conteniendo barberina fueron reportados por Ke y col. (2010). En otro estudio, Meng y col. (2010) publicaron que la morfología de sección transversal de películas de alginato sin glicerol y conteniendo sulfadiazina de plata fueron homogéneas y compactas.

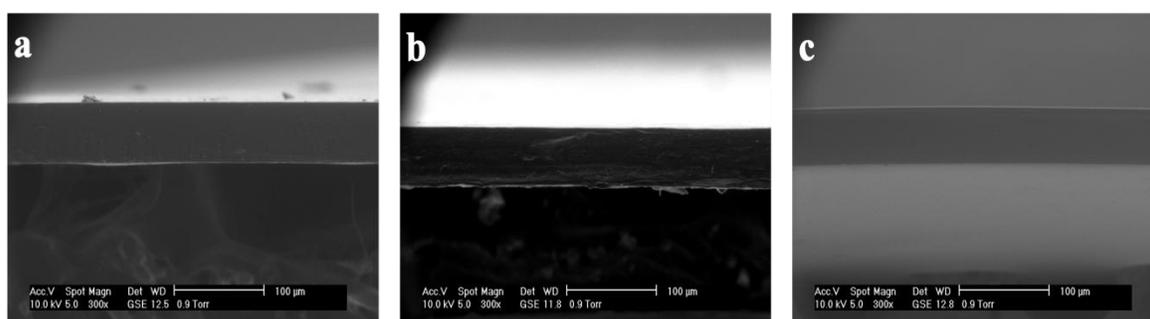


Figura 7.14. Micrografías de sección transversal de las películas comestibles obtenidas con MEBA: alginato (a), alginato/quitosano (b) y quitosano (c).

En el caso de las micrografías de superficie de las películas de alginato/quitosano, fue posible observar una red fibrilar, la cual es típica para películas o membranas hechas con mezclas de estos polisacáridos (Ke y col., 2010; Meng y col., 2010). Finalmente, para las películas de quitosano se observaron morfologías de superficies lisas, homogéneas y sin poros. Descripciones similares de la morfología de películas hechas a base de quitosano examinadas con microscopía electrónica de barrido han sido recientemente reportadas por otros autores (Silva y col., 2007; Ke y col., 2010; Meng y col., 2010).

La microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) ha sido a lo largo de los años ampliamente usada como una herramienta para el estudio y caracterización de la microestructura y morfología de películas comestibles. Esta técnica tiene ventajas tales como: alta resolución, rápida velocidad de barrido y actualmente es posible analizar muestras en su estado nativo usando el modo ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés).

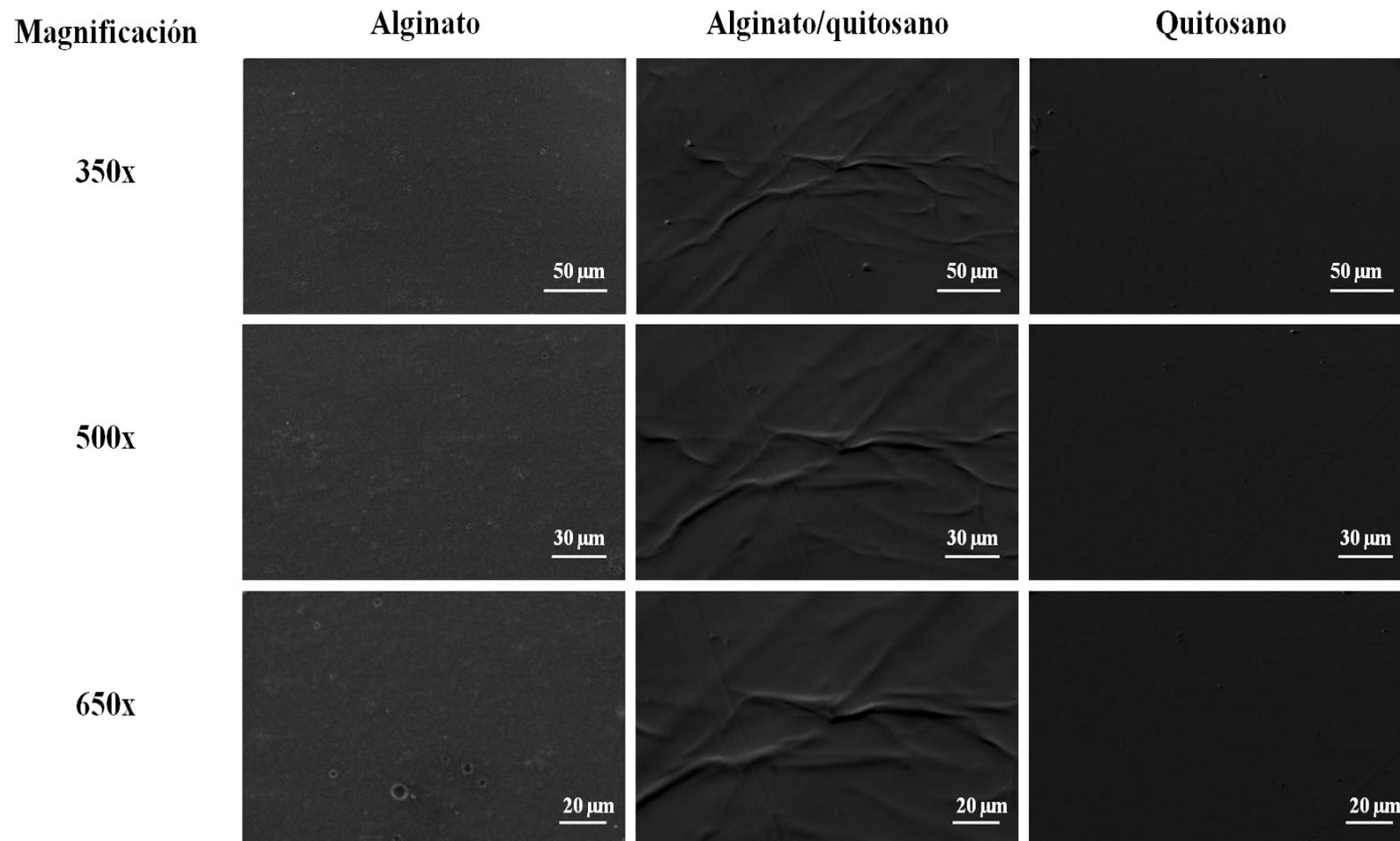


Figura 7.15. Galería de imágenes de la superficie de películas comestibles obtenidas con MEBA a diferentes magnificaciones: 350x, 500x y 650x.

Sin embargo, una desventaja de este tipo de microscopio es que el análisis morfológico desarrollado es sólo de carácter cualitativo, pero a través de las técnicas de procesamiento de imágenes, información cuantitativa puede ser extraída a partir de estas imágenes de ESEM. En este contexto y como una manera para ilustrar la aplicación del análisis de textura de imágenes sobre micrografías de ESEM, una caracterización cuantitativa de la morfología de las superficies de las películas fue desarrollada y los valores obtenidos de los parámetros de textura son mostrados en la Tabla 7.5. Como se esperaba también para este nivel de observación los parámetros de textura permitieron cuantificar la morfología de las imágenes de las películas obtenidas por ESEM. Los resultados obtenidos revelaron que las películas de quitosano presentaron altos valores de energía (6.79 a 10.20) en comparación con los otros dos tipos de películas; las películas de alginato/quitosano exhibieron los valores más bajos de dicho parámetro (1.51 a 1.63). En relación al parámetro de homogeneidad, se observó que valores altos fueron mostrados para las películas de alginato y quitosano, los cuales no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$), mientras que los valores más bajos los presentaron las películas de alginato/quitosano. Valores altos del parámetro de energía son alcanzados cuando la distribución de los niveles de grises de los píxeles presenta una forma periódica o constante, mientras que la homogeneidad está asociada con la homogeneidad local de los píxeles de la imagen. Bajos valores de la energía y homogeneidad indican una distribución irregular y heterogeneidad local de los píxeles de la imagen, respectivamente (Fernández y col., 2005; Mendoza y col., 2007). Estas tendencias pueden estar asociadas a superficies homogéneas como las de alginato y quitosano y a superficies heterogéneas como las películas de alginato/quitosano debido a la red de fibras por las que están formadas.

Continuando con la discusión, altos valores de contraste fueron observados para las películas de alginato/quitosano (64.09 a 77.51) y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las tres magnificaciones evaluadas. Lo anterior puede ser atribuido a la presencia de fibras, las cuales provocan que se incrementen los valores de contraste, indicando un alto grado de variaciones locales de los píxeles dentro de la imagen.

Tabla 7.5. Valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de películas comestibles obtenidas con un microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) a diferentes magnificaciones.

Tipo de película	Magnificación/ Campo de Visión (μm^2)	Parámetros de textura				
		Energía ($\times 10^{-2}$)	Contraste	Homogeneidad ($\times 10^{-2}$)	Entropía	Dimensión fractal
Alginato	350x/61571	5.30±0.01 ^c	12.74±1.05 ^b	43.00±0.35 ^a	3.28±0.05 ^b	2.16±0.02 ^b
	500x/35063	5.66±0.01 ^c	10.37±0.59 ^b	45.90±0.26 ^a	3.19±0.02 ^{bc}	2.12±0.00 ^{bc}
	650x/21125	6.30±0.00 ^c	9.08±0.81 ^b	46.57±0.12 ^a	3.14±0.03 ^{bc}	2.11±0.00 ^{bc}
Alginato/ Quitosano	350x/61571	1.63±1.11 ^d	77.51±39.63 ^a	20.04±7.60 ^b	5.38±0.58 ^a	2.52±0.06 ^a
Quitosano	500x/35063	1.57±0.93 ^d	64.09±26.25 ^a	20.40±7.43 ^b	5.39±0.49 ^a	2.53±0.05 ^a
	650x/21125	1.51±0.87 ^d	73.87±34.18 ^a	20.57±7.45 ^b	5.50±0.52 ^a	2.51±0.04 ^a
Quitosano	350x/61571	6.79±0.80 ^c	7.82±1.01 ^b	50.28±1.11 ^a	2.69±0.12 ^{bcd}	2.06±0.01 ^c
	500x/35063	8.68±0.70 ^b	7.14±0.25 ^b	49.56±0.46 ^a	2.42±0.06 ^{cd}	2.04±0.00 ^c
	650x/21125	10.20±0.10 ^a	5.84±0.20 ^b	52.66±0.30 ^a	2.27±0.02 ^d	2.03±0.00 ^c

1) Valores (promedio \pm desviación estandar, n=5) en una columna con la misma letra no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$).

Los valores de entropía y dimensión fractal obtenidos para las películas de alginato/quitosano fueron los más altos en comparación con las otras dos películas y este hecho puede ser explicado por la red de fibras que genera un alto grado de complejidad y rugosidad sobre la superficie (ver Tabla 7.5). De manera contraria, bajos valores de entropía y dimensión fractal fueron observados para las películas de alginato y quitosano, lo que significa que las texturas de las superficies son homogéneas y lisas (ver Tabla 7.5).

7.1.2.3 Microscopía de Fuerza Atómica

Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM) fueron usadas como otro ejemplo de aplicación del análisis de textura de imágenes. Por lo tanto, en la Figura 7.16 se muestran imágenes topográficas en escala de grises de las superficies de las películas comestibles a diferentes áreas de escaneo $225 \mu\text{m}^2$, $100 \mu\text{m}^2$ y $25 \mu\text{m}^2$; la barra de escala de altura fue de $1 \mu\text{m}$ para todas las imágenes. Con base a los resultados obtenidos, se encontró que las películas de alginato poseen superficies altamente rugosas y heterogéneas formadas por aglomerados de materia de diversos tamaños y formas, los cuales se pueden distinguir claramente en la imagen a un campo de visión de $25 \mu\text{m}^2$.

Por otro lado, se pudieron visualizar claramente las fibras que se forman en las películas de alginato/quitosano generando crestas y valles sobre la superficie y en consecuencia provocando un alto grado de rugosidad sobre la muestra. Al disminuir el área de escaneo, se pudo observar que esta película está conformada por aglomerados de tamaños nanométricos. Finalmente, la topografía de la superficie de las películas de quitosano fue extremadamente lisa y homogénea, como se puede observar en la Figura 7.16. El resultado anterior puede ser explicado debido a que la película de quitosano está formada por partículas de tamaño nanométrico, las cuales se encuentran muy bien compactadas y por lo tanto generan una superficie extremadamente lisa.

Un factor clave para poder comparar la topografía de la superficie de las películas comestibles es que se debe de tener la misma escala de alturas para todas las imágenes y que estas no deben ser modificadas mediante operaciones de procesamiento de imágenes

tales como el “flatten” o aplanado, debido a que alteran la información original de las imágenes y por lo tanto valores de rugosidad erróneos pueden ser obtenidos.

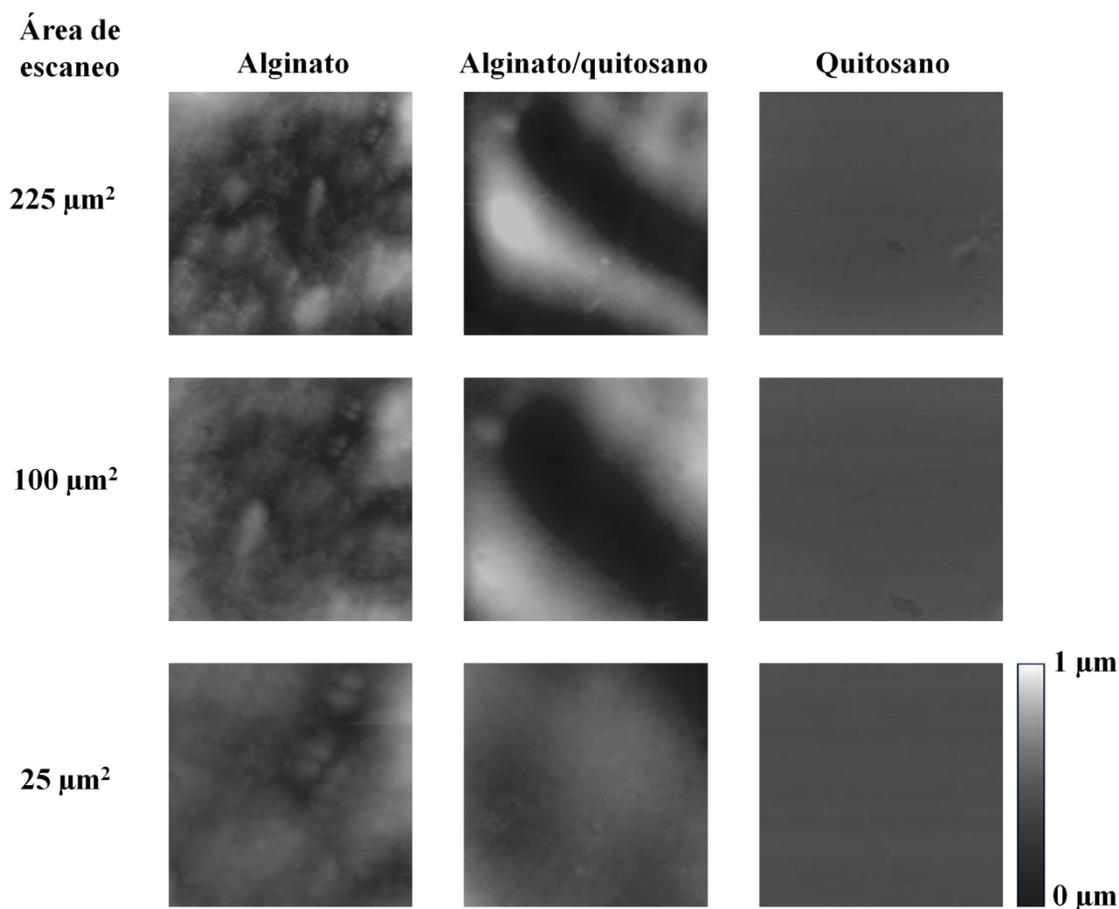


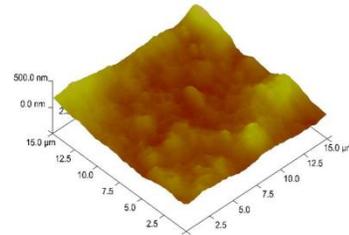
Figura 7.16. Galería de imágenes topográficas (escala de grises) de la superficie de películas comestibles obtenidas con un AFM a diferentes áreas de escaneo: 225 μm^2 , 100 μm^2 y 25 μm^2 . En la esquina inferior derecha se muestra la barra de escala de alturas que es de 1 μm para todas las imágenes.

Gráficos topográficos 3D fueron hechos a partir de las imágenes topográficas y estos son mostrados en la Figura 7.17. Con la ayuda de este tipo de gráficos se puede concebir de manera más clara el grado de rugosidad de la superficie de cada una de las muestras así como el efecto del área de escaneo sobre la rugosidad de las mismas.

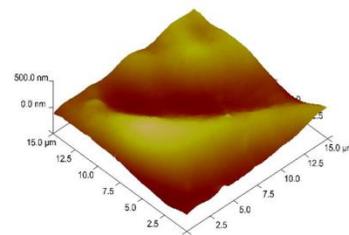
Área de
escaneo

225 μm^2

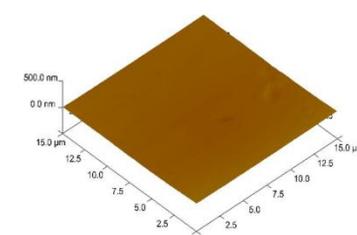
Alginato



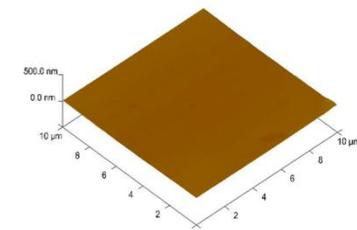
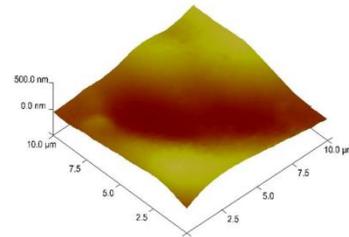
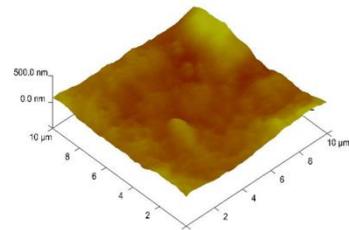
Alginato/quitosano



Quitosano



100 μm^2



25 μm^2

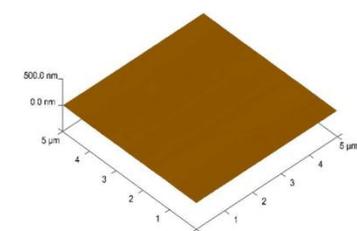
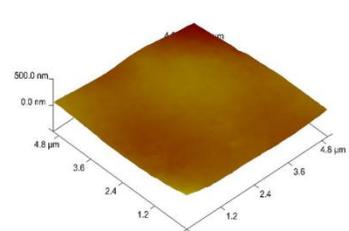
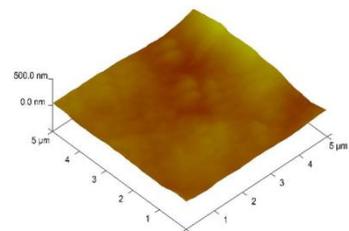


Figura 7.17. Galería de imágenes topográficas 3D de la superficie de películas comestibles obtenidas con un MFA a diferentes áreas de escaneo: 225 μm^2 , 100 μm^2 y 25 μm^2 .

El microscopio de fuerza atómica permite obtener parámetros de rugosidad cuantitativos tales como R_a y R_q y estos fueron calculados para las superficies de las películas a las diferentes áreas de escaneo; estos valores son listados en la Tabla 7.6. Los resultados indican que altos valores de R_a fueron observados para las películas de alginato y alginato/quitosano los cuales corresponden a valores de entre 21.15 a 54.25 nm y 23.36 a 53.95 nm, respectivamente. Mientras que bajos valores entre 2.85 y 8.60 nm fueron observados para las películas de quitosano. Un comportamiento similar al anterior presentaron los valores de R_q con la diferencia de que los valores del parámetro de rugosidad R_q fueron mayores que los del parámetro R_a . Silva y col., (2007) reportaron valores de rugosidad para películas de quitosano de 1.8 ± 0.9 nm, el cual es un valor muy similar al medido en este trabajo a un área de escaneo de $25 \mu\text{m}^2$ que fue de 2.85 ± 1.38 nm, pero ambos resultados describen superficies extremadamente lisas.

Asimismo, se observó que al disminuir el área de escaneo (campo de visión), los valores de los parámetros de rugosidad R_a y R_q disminuyeron para las tres muestras, lo que corresponden con lo observado en las imágenes topográficas 3D que tienden a ser menos rugosas cuando se disminuye el área de escaneo.

Los valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes topográficas de AFM de las películas comestibles son resumidos en la Tabla 7.6. Bajos valores de energía que no tuvieron diferencia significativas ($p > 0.05$) entre ellos fueron observados para las películas de alginato y alginato/quitosano, este hecho puede ser explicado considerando que las imágenes de ambas películas a este nivel de análisis son estructuralmente complejas. Por otra parte, valores considerablemente mayores entre 86.33×10^{-3} a 162.25×10^{-3} fueron observados para las películas de quitosano en comparación con las otros dos tipos de películas, este resultado se debe a que la película de quitosano presenta un alto grado de uniformidad. Los resultados del parámetro de homogeneidad presentaron un comportamiento similar al encontrado para el parámetro de energía, donde los valores más altos fueron observados para la película de quitosano (84.63×10^{-2} a 93.62×10^{-2}).

Tabla 7.6. Parámetros de textura y rugosidad extraídos desde las imágenes topográficas de AFM a diferentes áreas de escaneo (Campos de Visión).

Tipo de película	Campo de visión (μm^2)	Parámetros de textura					Parámetros de rugosidad	
		Energía ($\times 10^{-3}$)	Contraste	Homogeneidad ($\times 10^{-2}$)	Entropía	Dimensión fractal	R_a (nm)	R_q (nm)
Alginato	225	2.14±0.37 ^c	38.04±11.99 ^a	43.90±1.27 ^d	6.53±0.11 ^a	2.14±0.01 ^a	54.25±14.04 ^a	68.37±16.17 ^a
	100	2.66±0.81 ^c	31.95±9.09 ^a	52.70±3.85 ^{cd}	6.31±0.33 ^a	2.11±0.03 ^{ab}	38.91±14.89 ^{ab}	49.76±19.48 ^a
	25	8.00±2.75 ^c	27.64±6.62 ^a	68.46±4.82 ^b	5.31±0.39 ^b	2.11±0.02 ^{ab}	21.15±4.95 ^{bc}	26.65±6.31 ^{bc}
Alginato/	225	3.18±1.94 ^c	32.73±14.77 ^a	47.00±8.80 ^d	6.44±0.52 ^a	2.16±0.04 ^a	53.95±22.20 ^a	69.59±27.21 ^a
Quitosano	100	5.00±1.22 ^c	24.35±5.17 ^a	59.80±6.61 ^{bc}	5.93±0.36 ^{ab}	2.16±0.05 ^a	26.52±6.67 ^{bc}	34.10±7.46 ^{bc}
	25	10.00±5.78 ^c	24.26±3.25 ^a	70.40±5.81 ^b	5.15±0.46 ^b	2.10±0.03 ^{ab}	22.36±9.57 ^{bc}	27.38±11.29 ^{bc}
Quitosano	225	86.33±22.36 ^b	26.68±1.32 ^a	84.63±5.34 ^a	3.13±0.42 ^c	2.03±0.04 ^b	8.60±2.06 ^{bc}	11.26±2.56 ^{bc}
	100	71.75±32.01 ^b	24.58±0.66 ^a	90.50±4.00 ^a	3.17±0.49 ^c	2.06±0.04 ^b	6.08±2.20 ^c	7.34±2.19 ^c
	25	162.25±70.21 ^a	23.18±0.50 ^a	93.62±2.76 ^a	2.35±0.51 ^c	2.02±0.02 ^b	2.85±1.38 ^c	3.64±1.78 ^c

1) Valores (promedio ± desviación estandar, n=5) en una columna con la misma letra no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$)

En particular para los valores de contraste, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de las tres películas a las diferentes áreas de escaneo, esto puede deberse a que todas las imágenes obtenidas tuvieron una misma escala de alturas ($1 \mu\text{m}$), lo cual influye directamente en el contraste de las imágenes.

Comportamientos opuestos a los observados para los valores de energía y homogeneidad fueron exhibidos para los parámetros de entropía y dimensión fractal. Valores aproximadamente dos veces más grandes de entropía fueron observados para las muestras de alginato y alginato/quitosano en comparación con los de la película de quitosano; este hecho está asociado a la complejidad estructural observada en las imágenes topográficas de las superficies de las películas. Por último, tendencias similares fueron observadas para los valores de dimensión fractal, donde valores entre 2.02 a 2.06 fueron vistos para las películas de quitosano; estos valores son muy cercanos a dos, lo que indican que la rugosidad de la superficie es extremadamente lisa. Con base a los resultados obtenidos, se encontró que hubo una relación entre los valores de dimensión fractal y los parámetros de rugosidad como era de esperarse, ya que la dimensión fractal es un parámetro que está asociado directamente con la rugosidad de una imagen. Por lo tanto, las películas que tuvieron altos valores de rugosidad (alginato y alginato/quitosano) presentaron altos valores de dimensión fractal, mientras que en el caso de las películas de quitosano, que exhibieron valores bajos de R_a y R_q , presentaron valores de dimensión fractal bajos cercanos a dos. En trabajos previos, una relación entre los parámetros de rugosidad y valores de dimensión fractal ya ha sido reportada, Villalobos y col. (2005) mencionaron que los valores de dimensión fractal de biopelículas de hidroxipropil metilcelulosa conteniendo surfactantes presentaron un patrón similar a los parámetros de rugosidad R_a y R_q .

Considerando los resultados obtenidos, se demostró la eficacia del análisis de textura de imágenes para la caracterización cuantitativa de la textura de imágenes topográficas de las superficies de las películas comestibles, encontrando resultados interesantes y relaciones entre los parámetros de textura y rugosidad, como la observada para la dimensión fractal y R_a y R_q .

7.1.2.4 Estudio del efecto de Campo de Visión (CDV) sobre los parámetros de textura en las diferentes técnicas de microscopía

Con el objetivo de estudiar el efecto que tiene el Campo de Visión (CDV) sobre los parámetros texturales en cada una de las técnicas de microscopía empleadas, gráficos 3D fueron hechos. Los valores de los parámetros de textura (z) fueron graficados en función de la proporción de alginato en peso (x) que tienen las películas comestibles y de los campos de visión (y) empleados en cada una de las técnicas. Se expresaron las películas de esta manera para poder representarlas numéricamente en los gráficos, de esta forma la película de alginato corresponde a la película que tiene una proporción de alginato de 1.0, la de alginato/quitosano a la de 0.5 y la de quitosano a la de 0.0 en proporción de alginato. Estos gráficos son presentados en las Figuras 7.18, 7.19 y 7.20 que corresponden a las técnicas de microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía de fuerza atómica, respectivamente.

Los datos de todos los gráficos fueron ajustados a ecuaciones de segundo orden, con sus respectivos coeficientes (R^2) y los valores de P de las constantes de las ecuaciones, todos estos resultados se muestran en la Tabla 7.7. Este análisis de correlación entre las variables fue seleccionado para este estudio por que las ecuaciones de segundo orden representan un modelo simple para visualizar principalmente el efecto del campo de visión sobre los parámetros de textura. Además, se obtuvieron adecuados coeficientes de determinación (R^2) para la mayoría de los parámetros de textura estimados en este estudio (ver Tabla 7.7).

En la Figura 7.18 se muestran gráficos 3D de los valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes de ML en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión, además se muestran las ecuaciones de segundo orden que se ajustaron a los datos. Como se puede observar en la figura, los parámetros de energía y homogeneidad presentan tendencias similares, donde un ligero incremento en los valores de energía y homogeneidad es observado al existir un decremento en el campo de visión, para las tres películas. Asimismo, los valores más bajos de dichos parámetros correspondieron a las películas con una proporción de 0.5 de alginato (película de alginato/quitosano). Por otro lado, tendencias

opuestas a los parámetros de energía y homogeneidad fueron observadas para la entropía y dimensión fractal. En la Figura 7.18c-d, se visualiza que al disminuir el campo de visión, los valores de entropía y dimensión fractal disminuyen, este hecho puede deberse a que el área de análisis es cada vez más pequeño y por lo tanto la complejidad y rugosidad de las superficies se va disminuyendo. En ambos gráficos los valores más altos de entropía y dimensión fractal son exhibidos por la película de 0.5 en proporción de alginato que corresponde a la película formada por ambos polisacáridos. Todas estas tendencias están asociadas a la microestructura observada en las imágenes de LM discutidas anteriormente.

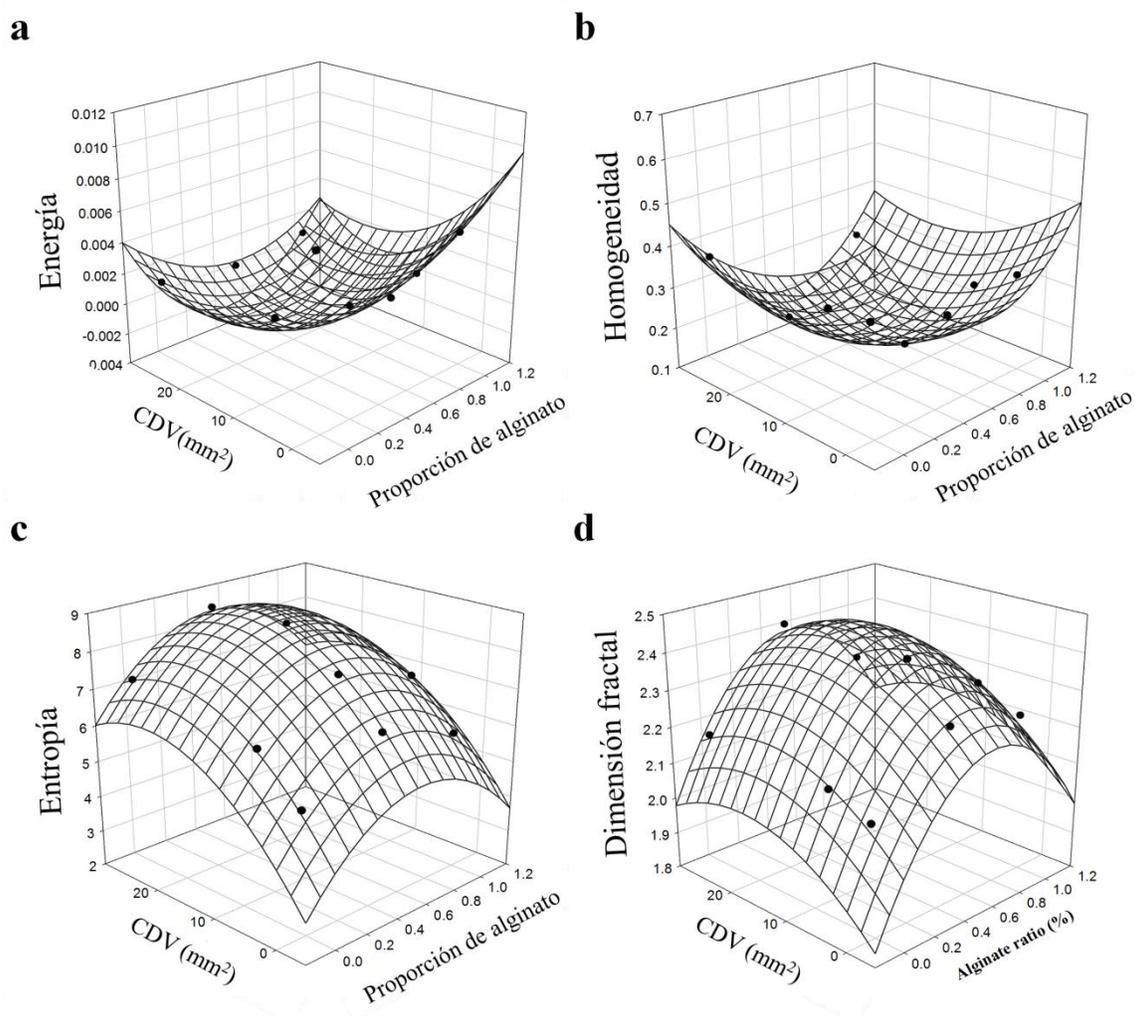


Figura 7.18. Valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes de ML en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión: energía (a), homogeneidad (b), entropía (c) y dimensión fractal (d).

En la Tabla 7.7 se en listan las ecuaciones de segundo orden con sus respectivos coeficientes de correlación para los parámetros de textura, en particular para la técnica de microscopía de luz, coeficientes de 0.99 y 0.95 fueron presentados para la entropía y dimensión fractal, respectivamente, mientras que valores de 0.88 y 0.85 fueron observados para la energía y homogeneidad, respectivamente. El contraste presentó un valor de coeficiente de determinación bajo de 0.62 y debido a esto su gráfico no fue presentado.

En relación a la técnica de microscopía electrónica de barrido ambiental, gráficos 3D de los parámetros de textura en función del campo de visión y de la proporción de alginato son mostrados en la Figura 7.19. Tendencias similares a las encontradas en microscopía de luz fueron observadas para esta técnica para los parámetros de energía, homogeneidad, entropía y dimensión fractal. En los todos los gráficos de la Figura 7.19 se observa claramente que no existen un efecto directo del campo de visión sobre los valores de los parámetros de textura debido a que estos permanecen relativamente constantes. Sin embargo, se pudieron distinguir diferencias notorias con respecto a la composición de las películas comestibles, donde altos valores de entropía y dimensión fractal fueron exhibidos para las películas de 0.5 en proporción de alginato y de manera contraria bajos valores de energía y homogeneidad. Por el contrario, los valores más altos de energía y homogeneidad; y los valores más bajos de entropía y dimensión fractal fueron presentados para las películas con una proporción de alginato de 0.0 que corresponden a la película de quitosano. Mediante estos tipos de gráficos, se puede ver claramente que los parámetros de energía y homogeneidad que son medidas de la uniformidad y homogeneidad local de una imagen respectivamente, son parámetros totalmente opuestos a la entropía y dimensión fractal que son parámetros asociados a la complejidad y rugosidad de las imágenes.

Para la técnica de microscopía electrónica de barrido ambiental se observaron coeficientes de determinación altos (R^2) para los cinco parámetros de textura evaluados en función del campo de visión y de la composición de las películas.

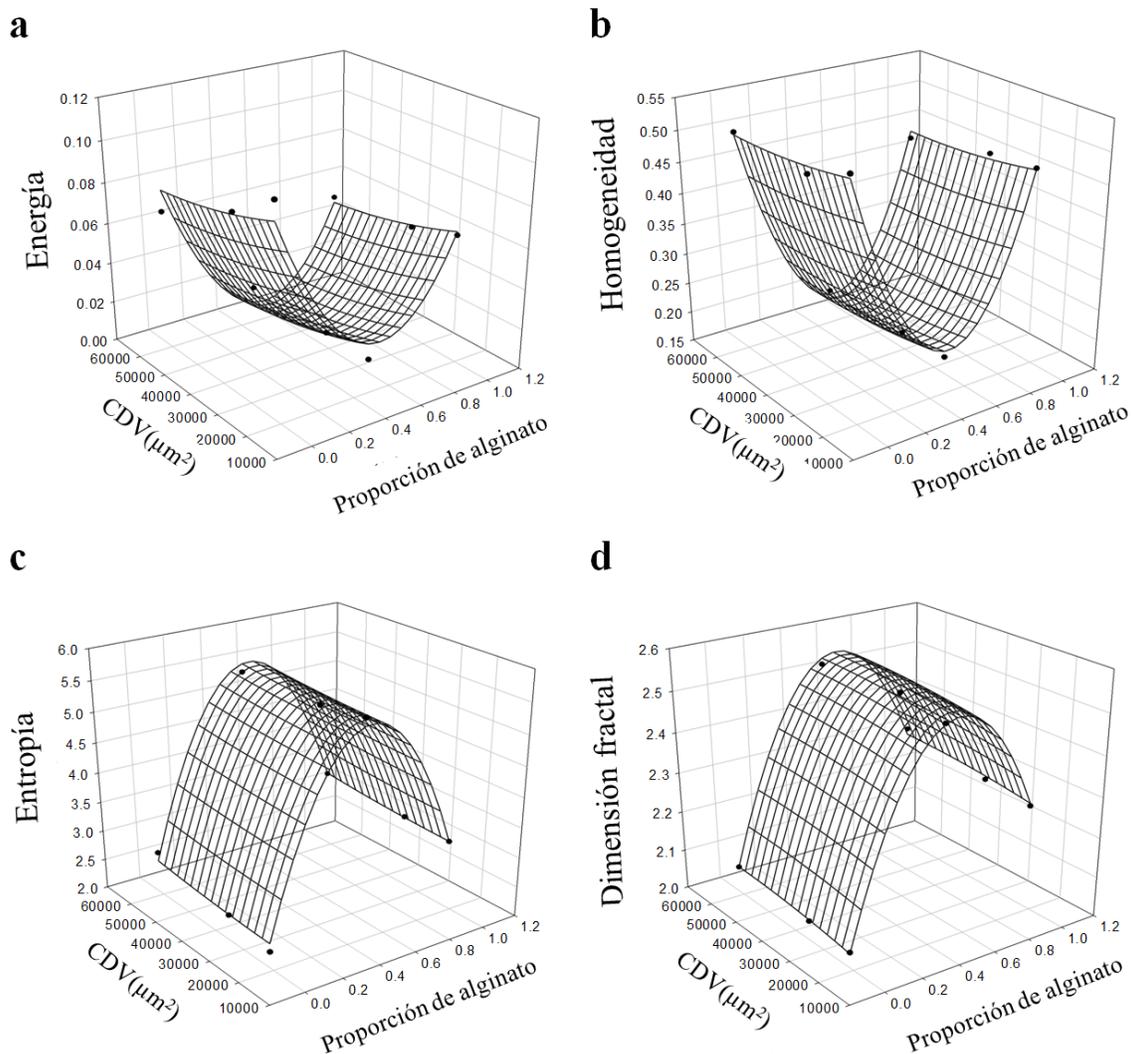


Figura 7.19. Valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes de MEBA en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión: energía (a), homogeneidad (b), entropía (c) y dimensión fractal (d).

En la Figura 7.20 se muestran los valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes topográficas de AFM en función de la proporción de alginato y del campo de visión, así como también las superficies de segundo orden que se ajustaron a los datos de los parámetros. En particular para la energía, los resultados mostraron que existe un ligero incremento en los valores de energía al disminuir el campo de visión o para este caso el área de escaneo; además se observó que los valores más altos fueron presentados por las

películas con una proporción de alginato de 0.0 que corresponden a las películas de quitosano.

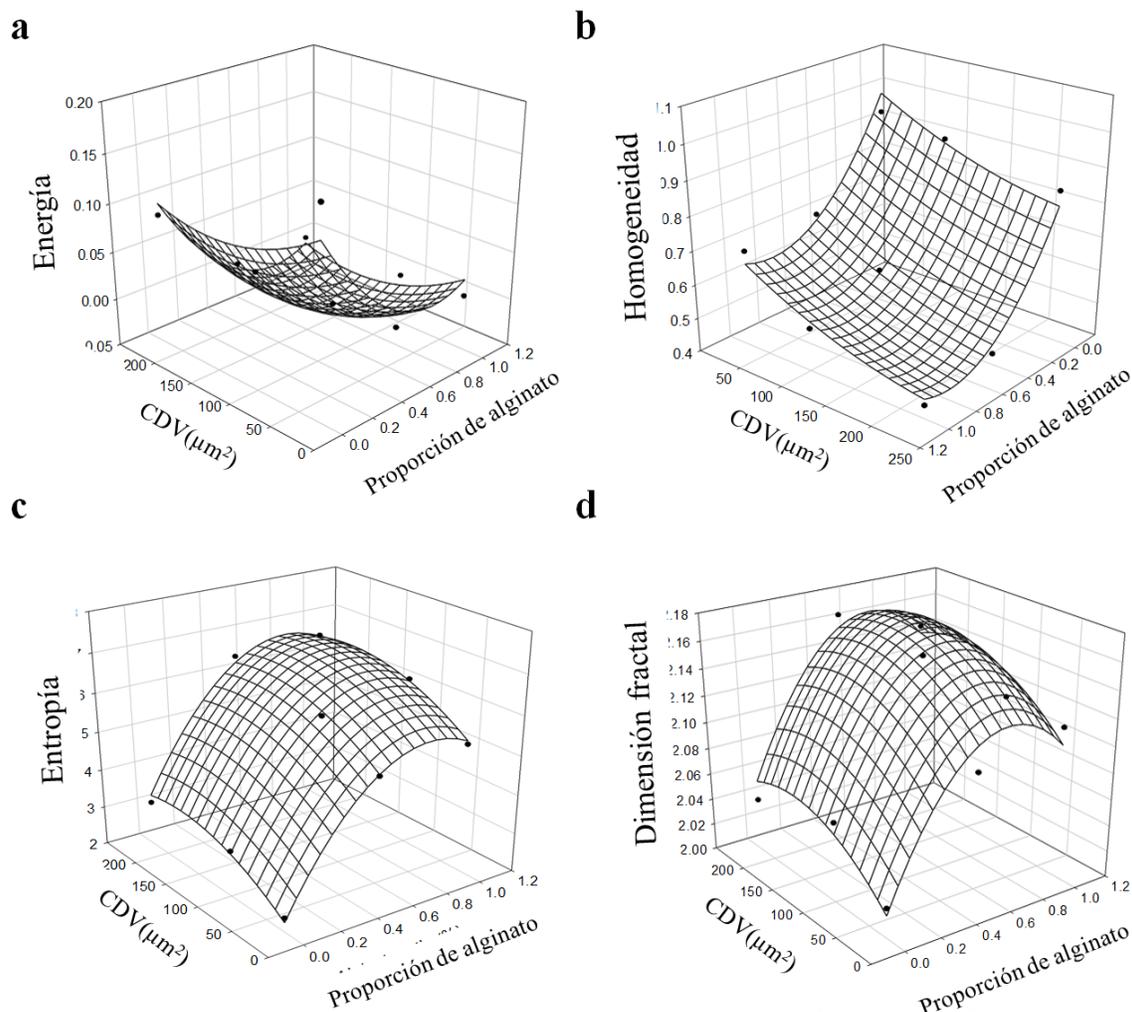


Figura 7.20. Valores de los parámetros texturales extraídos de imágenes topográficas de MFA en función de la proporción de alginato y del Campo de Visión: energía (a), homogeneidad (b), entropía (c) y dimensión fractal (d).

Con respecto a la homogeneidad, un efecto claro del campo de visión y la proporción de alginato fue exhibida. Al disminuir el campo de visión, los valores de homogeneidad se incrementaron gradualmente para las tres películas; por otra parte, al existir un decremento en la proporción de alginato de las películas, los valores del parámetro de homogeneidad

aumentaron. De tal manera, que el valor más alto de homogeneidad se tuvo a una proporción de alginato de 0 (película de quitosano) y a un campo de visión de $25 \mu\text{m}^2$, y el menor valor se presentó a una proporción de alginato 1 (película de alginato) y un campo de visión de $225 \mu\text{m}^2$. Estos resultados corresponden de manera adecuada con la microestructura observada en las imágenes topográficas y gráficos 3D de las superficies de las películas comestibles.

Para los parámetros de entropía y dimensión fractal tendencias similares fueron encontradas. Para ambos casos, al disminuirse el campo de visión los valores de ambos parámetros disminuyeron, mientras que al incrementarse la proporción de alginato en las películas se observó que los valores de ambos parámetros se incrementaron drásticamente. Los resultados anteriores pueden ser explicados considerando que al incrementarse la proporción de alginato, la complejidad y rugosidad de la superficie de las películas evaluadas se incrementó.

Los coeficientes de determinación (R^2) de las ecuaciones que se ajustaron a los parámetros de textura en función del campo de visión y de la proporción de alginato para el análisis con AFM fueron 0.89, 0.90, 0.96, 0.99 y 0.93 que corresponden a los parámetros de energía, contraste, homogeneidad, entropía y dimensión fractal, respectivamente.

Los resultados presentados para las tres técnicas de microscopía revelaron que si existe un efecto del campo de visión y de la proporción de alginato de las películas sobre los parámetros de textura evaluados, siendo este efecto más notorio en las técnicas de microscopía de luz y microscopía de fuerza atómica. Para la microscopia electrónica de barrido ambiental se observó que no existe un efecto directo del campo de visión sobre los parámetros de textura evaluados y por lo tanto para esta técnica no sería tan importante la magnificación para evaluar la microestructura de la superficie de las películas comestibles.

Tabla 7.7. Ecuaciones de segundo orden que se ajustaron a los parámetros de textura (z) en función de la proporción de alginato (x) y del campo de visión (y) para las tres técnicas de microscopía usadas en este trabajo.

Técnica	Parámetro de textura	Ecuación ($z=y_0+ax+by+cx^2+dy^2$)	Coefficiente (R^2)
Microscopía de luz	Energía	$z = 0.0062 - 0.0076x - 0.0003y + 0.0065x^2 + 3.98x10^{-6}y^2$ ($y_0=0.021, a=0.076, b=0.0219, c=0.1043, d=0.0382$)	0.88
	Contraste	$z = 35.38 + 186.00x + 0.2624y - 177.70x^2 - 0.0053y^2$ ($y_0=0.1544, a=0.0657, b=0.8998, c=0.0667, d=0.8695$)	0.62
	Homogeneidad	$z = 0.4127 - 0.5262x - 0.0055y + 0.4604x^2 - 6.96x10^{-5}y^2$ ($y_0=0.0003, a=0.0153, b=0.1833, c=0.0209, d=0.2574$)	0.85
	Entropía	$z = 5.1699 + 4.6527x + 0.1035y - 4.1791x^2 - 0.0012y^2$ ($y_0<0.0001, a<0.0001, b=0.0001, c<0.0001, d=0.0004$)	0.99
	Dimensión fractal	$z = 2.0784 + 0.7904x + 0.0072y - 0.6706x^2 - 9.90x10^{-5}y^2$ ($y_0=0.0001, a=0.0013, b=0.0488, c=0.0020, d=0.0671$)	0.95
Microscopía electrónica de barrido ambiental	Energía	$z = 0.1076 - 0.2512x - 8.23x10^{-7}y + 0.2232x^2 + 5.28x10^{-12}y^2$ ($y_0=0.0182, a=0.007, b=0.6133, c=0.0010, d=0.7640$)	0.95
	Contraste	$z = 17.26 + 255.09x - 0.0007y - 251.96x^2 + 9.36x10^{-9}y^2$ ($y_0=0.2191, a<0.0001, b=0.3370, c<0.0001, d=0.2810$)	0.99
	Homogeneidad	$z = 0.5513 - 1.1629x - 1.81x10^{-6}y + 1.1062x^2 + 1.54x10^{-11}y^2$ ($y_0=0.0001, a<0.0001, b=0.4035, c<0.0001, d=0.5350$)	0.99
	Entropía	$z = 2.4076 + 11.12x - 1.33x10^{-6}y - 10.3825x^2 + 5.98x10^{-11}y^2$ ($y_0=0.0047, a<0.0001, b=0.9563, c<0.0001, d=0.8342$)	0.99
	Dimensión fractal	$z = 2.0005 + 1.6670x + 1.96x10^{-6}y - 1.4345x^2 - 1.43x10^{-11}y^2$ ($y_0<0.0001, a<0.0001, b=0.4252, c<0.0001, d=0.6089$)	0.99
Microscopía de fuerza atómica	Energía	$z = 0.1450 - 0.3004x - 0.0007y + 0.1979x^2 + 2.40x10^{-6}y^2$ ($y_0=0.0061, a=0.0177, b=0.2274, c=0.0559, d=0.2952$)	0.89
	Contraste	$z = 21.26 + 1.4735x + 0.0143y + 6.2599x^2 + 2.40x10^{-5}y^2$ ($y_0=0.0007, a=0.8267, b=0.7551, c=0.3599, d=0.6043$)	0.90
	Homogeneidad	$z = 1.0319 - 0.8750x - 0.0017y + 0.5294x^2 + 2.89x10^{-6}y^2$ ($y_0<0.0001, a=0.0030, b=0.1448, c=0.0154, d=0.4568$)	0.96
	Entropía	$z = 1.8273 + 8.6474x + 0.0177y - 5.4830x^2 - 4.87x10^{-5}y^2$ ($y_0=0.0005, a<0.0001, b=0.0060, c=0.0003, d=0.0180$)	0.99
	Dimensión fractal	$z = 1.9998 + 0.3234x + 0.0007y - 0.2389x^2 - 2.21x10^{-6}y^2$ ($y_0<0.0001, a=0.0041, b=0.1178, c=0.0105, d=0.1936$)	0.93

1) Las constantes de las ecuaciones con $P > 0.05$ no son significativos, estos valores se encuentran de bajo de cada ecuación.

7.1.2.5 Análisis de la relación entropía/dimensión fractal

Valores de la relación entropía/dimensión fractal contra los campos de visión evaluados en cada una de las técnicas de microscopía son mostrados en la Figura 7.21. Esta figura fue dividida en tres zonas que corresponden a las técnicas de microscopía usadas en este trabajo: microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía de fuerza atómica. Esta relación es un parámetro compuesto, el cual asocia la complejidad de una imagen en términos de valores de entropía y la rugosidad de la imagen como valores de dimensión fractal.

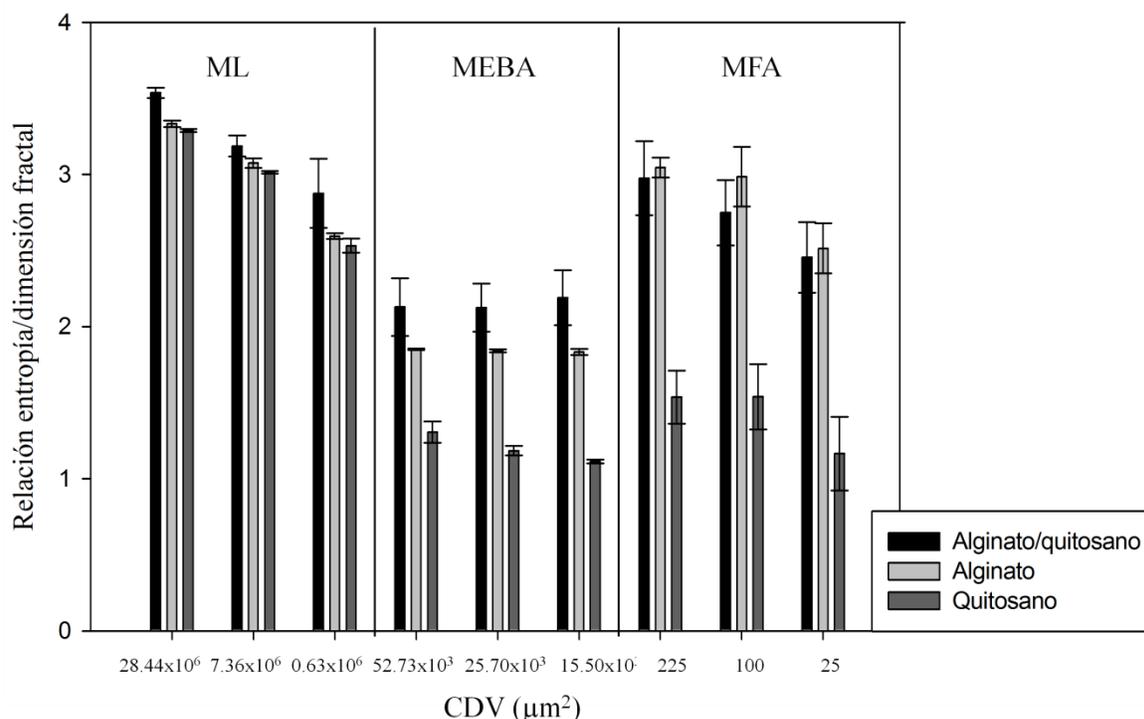


Figura 7.21. Valores de la relación entropía/dimensión fractal de las imágenes obtenidas por ML, MEBA y MFA, a diferentes Campos de Visión. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Con respecto a los resultados de la relación entropía/dimensión fractal de las imágenes de microscopía de luz, valores de esta relación entre 3.53 ± 0.03 a 2.53 ± 0.04 fueron obtenidos. Para los tres campos de visión evaluados para esta técnica, se observó que la

película de alginato/quitosano presentó los valores más altos de esta relación, seguida de la película de alginato y por último la de quitosano. Estos resultados concuerdan con la microestructura observada en las micrografías las cuales ya fueron discutidas anteriormente. Asimismo, los resultados mostraron que el campo de visión tuvo un efecto sobre la relación entropía/dimensión fractal, donde los valores de esta relación disminuyeron cuando el campo de visión fue disminuido. Este hecho se debe a que los cambios de magnificación promueven una reducción del campo de visión y como consecuencia la complejidad y rugosidad de la imagen disminuyen.

Para los resultados de microscopía electrónica de barrido ambiental, valores de la relación entropía/dimensión fractal entre 2.12 ± 0.18 a 1.11 ± 0.01 fueron obtenidos. Una tendencia similar a la encontrada en microscopía de luz fue encontrada para esta técnica, donde la película de alginato/quitosano presentó los valores más altos de esta relación, seguida de la película de alginato y por último la de quitosano. Sin embargo, el campo de visión no tuvo ningún efecto sobre los valores de la relación entropía/dimensión fractal, ya que diferencias significativas entre los valores de cada película a los diferentes campos de visión no fueron encontradas.

Por último, para la microscopía de fuerza atómica los resultados mostraron que las películas de alginato y alginato/quitosano exhibieron valores altos de la relación entropía/dimensión fractal en comparación con la película de quitosano y además se pudo observar que los valores de las tres películas tuvieron un ligero efecto del campo de visión evaluado. Todos estos resultados concuerdan con la microestructura observada en las imágenes topográficas obtenidas.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con otros reportes que mencionan el efecto del campo de visión o magnificación sobre las características de complejidad y rugosidad de las imágenes. Peleg & Normand (1985) reportaron que el uso de niveles de magnificación grandes pueden proveer bajos valores de rugosidad (dimensión fractal) en el estudio de aglomerados de café. Pedreschi y col. (2000) encontraron un punto de inflexión

llamado cruce liso-rugoso para la estimación de valores de dimensión fractal, esto hecho lo observaron cuando las imágenes eran escaneadas a diferentes tamaños de parches triangulares, y por lo tanto tamaños de parches grandes proveen superficies lisas. Estos resultados pueden ser importantes para la selección del nivel de magnificación y la técnica de microscopía usada en el estudio de películas comestibles. Además, la relación entropía/dimensión fractal resultó exitosa para caracterizar el grado de complejidad y rugosidad de la superficie de películas comestibles observadas a diferentes campos de visión y de técnicas de microscopía.

7.2 Caracterización cuantitativa de los cambios superficiales del aguacate variedad Hass y su clasificación en etapas de madurez

7.2.1 Parámetros de madurez

7.2.1.1 Firmeza y pérdida de peso

Cambios de los parámetros de firmeza y pérdida de peso en función del tiempo se muestran en la Figura 7.22. Como se puede observar la pérdida de firmeza durante el proceso de maduración sigue un patrón sigmoideal y la ecuación (7.1) se ajustó a los datos experimentales con un aceptable coeficiente de correlación cuadrado.

$$y = \frac{73.79}{1 + e^{-\left(\frac{x-6.62}{-1.18}\right)}} \quad R^2 = 0.79 \quad (7.1)$$

Resultados similares han sido reportados previamente por Cox y col. (2004) y Ochoa y col. (2009). La pérdida de firmeza está asociada a la degradación enzimática de la pared celular que promueve la pérdida de turgencia entre las células (Goulao & Oliveira, 2008). Por otra parte, la pérdida de masa presentó una tendencia lineal (ecuación 7.2), la cual incrementó en función del tiempo, este hecho está relacionado específicamente a la pérdida de vapor de agua debido a los procesos metabólicos y también con la pérdida de turgencia. El valor promedio de la pérdida de masa de los aguacates al día doce fue de $11.17 \pm 0.90\%$.

$$y = 1.012x - 0.7231 \quad R^2 = 0.99 \quad (7.2)$$

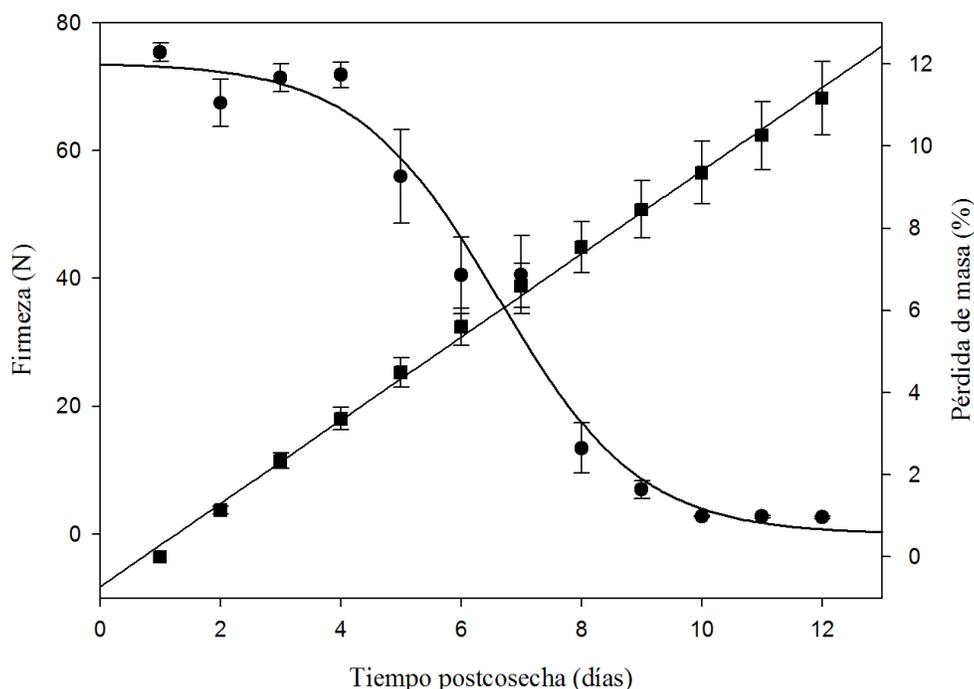


Figura 7.22. Cambios de los valores promedio de firmeza (●) y pérdida de peso (■) de los aguacates variedad Hass durante el proceso de maduración (12 días, 20°C y 75% de humedad relativa).

7.2.1.2 Mediciones colorimétricas con colorímetro y con IP

En la Figura 7.23 se muestran los valores promedio de las coordenadas del espacio de color CIELab y de las diferencias de color ΔE de los aguacates Hass medidos con el colorímetro y mediante técnicas de procesamiento de imágenes. En la Figura 7.23a se observa que no hubo cambios significativos durante los primeros 6 días con respecto a los valores de las coordenadas L^* , a^* , b^* y ΔE , mientras que después de este día cambios drásticos en los valores fueron detectados donde L^* y b^* disminuyeron, y los valores de a^* y ΔE tuvieron un incremento. La coordenada de cromaticidad a^* (verde al rojo) incrementó progresivamente desde el primer día hasta el día 12. Después del día 10 cambios menos

drásticos fueron observados para todas las variables. Las tendencias de los cambios de color durante el proceso de maduración fueron usadas para establecer tres etapas de madurez de los aguacates, para esto se determinaron las pendientes que corresponden a los periodos de tiempo de las tres etapas (Figura 7.23a).

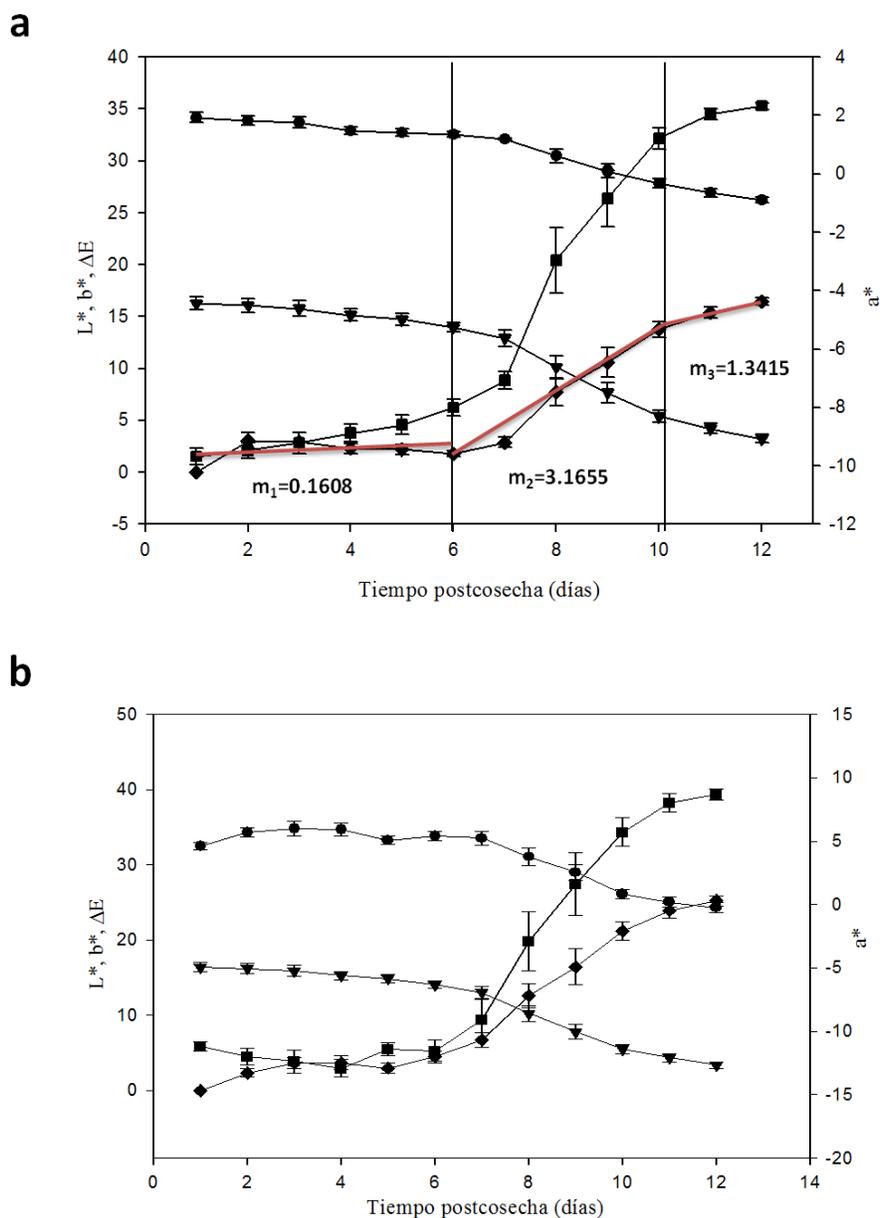


Figura 7.23. Cambios de los valores promedio de las coordenadas de color L^* (\bullet), a^* (\blacksquare), b^* (\blacktriangledown) y ΔE (\blacklozenge) durante el proceso de maduración medidos con el colorímetro (a) y con PI (b).

La primer etapa de maduración abarcó del día 1 al 6, cuya pendiente en base a los cambios de ΔE fue de 0.1608 (m_1), la segunda del día 6 al 10 con una pendiente de 3.1655 (m_2) y la tercera etapa de madurez del día 10 al 12 con una pendiente de 1.3415 (m_3). Estas tres clases fueron utilizadas como criterios para la clasificación de los aguacates Hass mediante parámetros extraídos de técnicas de procesamiento de imágenes.

Comparando los resultados de color obtenidos mediante técnicas de procesamiento de imágenes (Figura 7.23b) con los obtenidos a partir del colorímetro (Figura 7.23a), tendencias similares fueron encontradas, lo que significa que ambos métodos pueden ser usados.

7.2.2 Parámetros de textura

Además del cambio de color, también se evaluaron los cambios de textura de la cáscara mediante parámetros de textura y dimensión fractal. En la Figura 7.24 se muestra una galería de imágenes de los cambios de color y estructurales de la cáscara de aguacate Hass durante el proceso de maduración, así como también superficies de intensidad en escala de grises que fueron analizadas. Como se puede observar a través de las imágenes de la cáscara de aguacate en escala de grises (Figura 7.24b), durante la maduración se van produciendo cambios en la textura de la superficie de la cascara los cuales fueron cuantificados a través de los parámetros de textura y que pueden estar asociados a diversos procesos metabólicos como la pérdida de firmeza y de agua.

En la Figura 7.25 se muestran gráficos de los cambios de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de las cáscaras de aguacates en función del tiempo. Sólo se muestran los cambios de los parámetros que tuvieron tendencias definidas los cuales fueron la energía, contraste, entropía y la dimensión fractal. La energía mostró un incremento en función del tiempo con una tendencia lineal, lo que significa que la homogeneidad de las imágenes se fue incrementando. Por otra parte, los valores de contraste durante los primeros seis días se mantuvieron constantes, y después del sexto día los valores de este parámetro se incrementaron drásticamente.

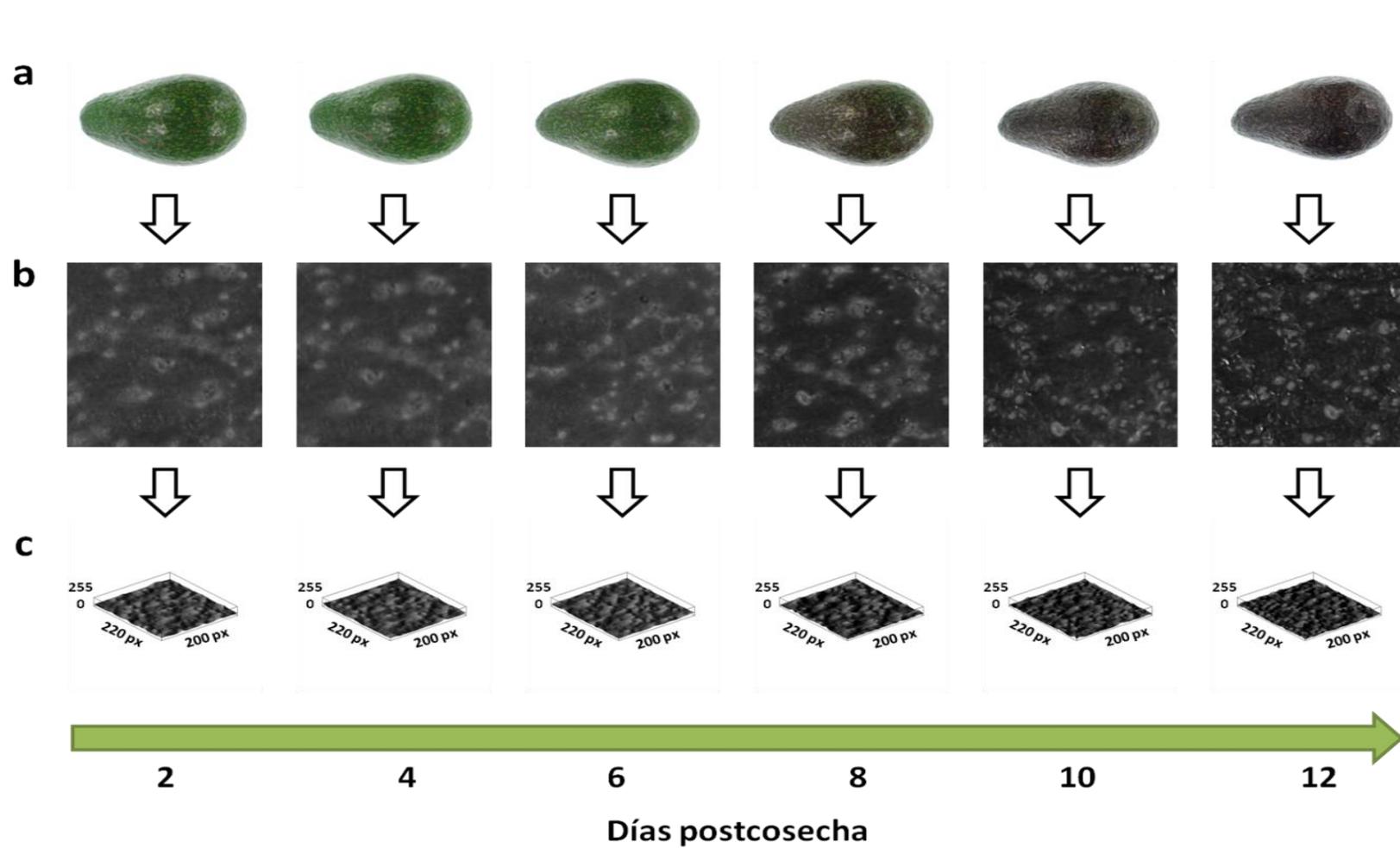


Figura 7.24. Galería de imágenes de los cambios de color y estructurales de la cáscara de aguacate Hass durante el proceso de maduración: cambios de color (a), cambios estructurales de la cáscara (b) y superficies de intensidad en escala de grises (c).

Este incremento en los valores de contraste puede estar relacionado a los cambios de color en la cáscara de los aguacates (verde a negro) ocurrido en el mismo intervalo de tiempo.

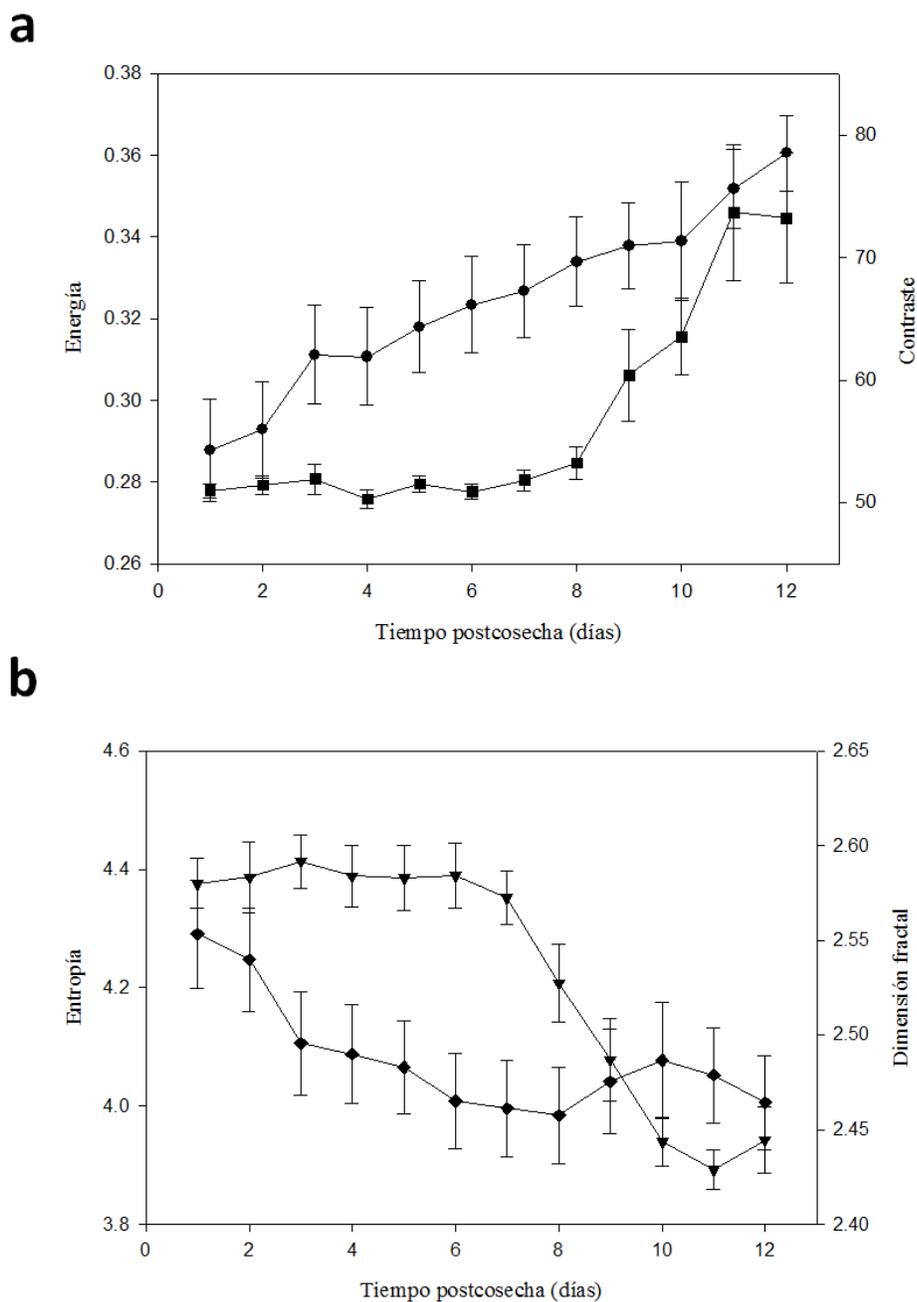


Figura 7.25. Cambios de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de las cáscaras de aguacates en función del tiempo. Energía (●), contraste (■), entropía (◆) y dimensión fractal (▼).

Para los valores de dimensión fractal o textura fractal, se mostró una tendencia similar al contraste pero de manera inversa, donde durante los primeros seis días no hubo diferencias significativas entre los valores de dimensión fractal y hasta después del sexto día, un decremento drástico fue observado (Figura 7.25b). Finalmente, los valores de entropía disminuyeron gradualmente durante los primeros 8 días, posteriormente un pequeño incremento en los valores fue observado (Figura 7.25b). Por lo tanto en base a los resultados obtenidos, se demostró que los parámetros de textura son útiles debido a que proveen información acerca de los cambios estructurales que ocurren en la cáscara durante la maduración.

7.2.3 Relación entre los parámetros de madurez y textura

Una vez que se demostró la eficacia del uso de los parámetros de textura así, como la evaluación de los cambios de color mediante técnicas de procesamiento de imágenes, se procedió a llevar cabo relaciones entre los parámetros extraídos de las imágenes con los parámetros de madurez (color y firmeza) y dos de las relaciones más importantes son mostradas en la Figura 7.26. En la Figura 7.26a, se muestra que la coordenada de cromaticidad a^* que es el parámetro que mejor describe los cambios de color durante la maduración, tuvo una relación lineal con la dimensión fractal con un alto coeficiente de determinación (ecuación 7.3). Por lo tanto, cuando el color verde de la cáscara disminuyó, se observó que los valores de dimensión fractal también decrecieron, este hecho puede estar asociado a los cambios estructurales en la cáscara (una baja rugosidad).

$$y = 0.013x + 2.4699 \quad R^2 = 0.97 \quad (7.3)$$

Por otra parte, los valores de firmeza y dimensión fractal se ajustaron a una tendencia logarítmica (ecuación 7.4), y la ecuación se muestra a continuación con su respectivo coeficiente de determinación:

$$y = 2.3630 + 0.0814\ln x - 0.0068(\ln x)^2 \quad R^2 = 0.98 \quad (7.4)$$

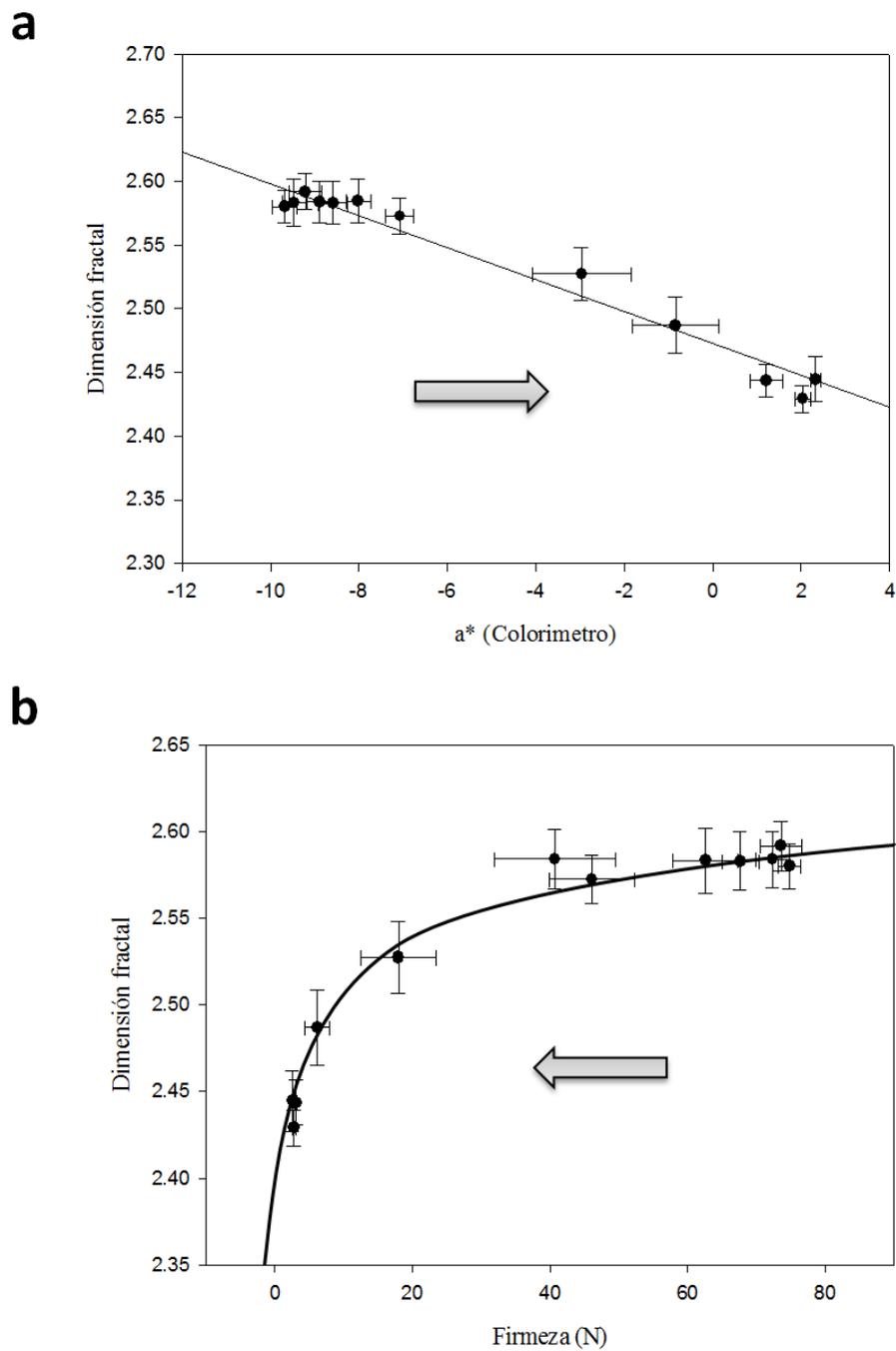


Figura 7.26. Relaciones entre los parámetros de madurez y textura: a* contra dimensión fractal (a) y firmeza contra dimensión fractal (b). Las flechas indican la dirección del proceso de maduración.

Por lo tanto, cuando los valores de dimensión fractal disminuyen, también los valores de firmeza decrecen. El parámetro de dimensión fractal mostró una adecuada correlación entre los parámetros de calidad medidos mediante métodos tradicionales, y consecuentemente, las imágenes podrían ser usadas como indicadores para evaluar la maduración de los aguacates a nivel laboratorio. Los otros parámetros mostraron relaciones complejas con ecuaciones polinomiales y exponentes de tercer grado que resultan poco útiles por lo que no son mostrados.

7.2.4 Proceso de clasificación

Una vez que se demostró que el procesamiento de imágenes es una eficaz herramienta para evaluar los cambios ocurridos en la cáscara de aguacate Hass durante la maduración, se procedió a realizar un proceso de clasificación de las etapas de madurez establecidas en base a los cambios de color mediante el uso de los parámetros extraídos de las imágenes.

Inicialmente se desarrollaron dos experimentos de clasificación usando para ambos 240 imágenes de la cáscara de los aguacates (dos imágenes de cada aguacate durante los doce días del experimento, y diez aguacates por día, por lo tanto 240 patrones). Tres clases de madurez fueron establecidas en base a los cambios de color de la cáscara. El 70% de las imágenes (168) se emplearon para la fase de aprendizaje y el 30% restante (72) para la fase de validación. En breve, primero se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales para ordenar cada una de las características (parámetros extraídos de las imágenes) y posteriormente se asignaron pesos a cada una de las características en base a su orden en el que quedaron establecidas, de tal manera que para el primer experimento donde sólo se utilizaron las coordenadas de espacio de color CIELab (L^* , a^* y b^*) el orden de estas características con sus respectivos pesos fue el siguiente: a^* (0.6), seguido de b^* (0.3) y por último L^* (0.1). La suma de los pesos debe ser igual a 1. Para el segundo experimento se usaron las seis características más relevantes que quedaron ordenadas de la siguiente manera: a^* (0.5), correlación (0.2), energía (0.2), homogeneidad (0.05), dimensión fractal (0.025) y entropía (0.025).

Posteriormente, se definió un clasificador que toma patrones de entrada (que son los parámetros extraídos de las imágenes de la cáscara de los aguacates ordenados en base al análisis de componentes principales) y como salida las etapas de madurez de la imagen del aguacate respectivo; para lo anterior se empleó el algoritmo de clasificación KNN (K-Nearest Neighbors) con un esquema de voto rápido, el cual se basa en el patrón más representativo de cada clase como prototipo.

Los resultados revelaron que para el primer experimento una clasificación exitosa fue encontrada, donde 58 de 72 imágenes fueron adecuadamente clasificadas, lo cual representa un porcentaje del 80.5%. En el segundo experimento, 59 de 72 imágenes para la etapa de validación fueron correctamente clasificadas, lo cual corresponde a un porcentaje del 81.9%. En ambos experimentos, la coordenada de cromaticidad a^* fue el parámetro que describió mejor el proceso de maduración del aguacate variedad Hass.

8. CONCLUSIONES

8.1 Caracterización física y mecánica

- Con relación a las mediciones colorimétricas de las películas comestibles, los resultados mostraron que las películas de alginato fueron las más transparentes y tuvieron el menor valor de la diferencia de color (ΔE) con respecto al plato de calibración en comparación con las otras dos películas.
- Altos valores de brillo para las películas comestibles fueron encontrados a un ángulo de 60° , siendo la película de quitosano la que exhibió el valor más alto y el menor la película de alginato/quitosano.
- En particular para la caracterización de las propiedades mecánicas, los resultados mostraron que al incrementarse la carga aplicada de las pruebas de indentación, los valores de dureza y módulo elástico disminuyen gradualmente para las tres películas.
- Para las pruebas de indentación que se realizaron a una carga de 5mN, los valores de profundidad máxima que se alcanzaron sobre las muestras fueron menores al 10 % del espesor promedio de las películas con lo que se evitó el efecto del sustrato sobre las propiedades mecánicas evaluadas.
- Todas las películas comestibles analizadas exhibieron el fenómeno de desplazamiento de indentación (creep indentation) lo que significa que estos biomateriales poseen propiedades viscoelásticas. Además, los resultados indicaron que al incrementarse el tiempo de pausa el desplazamiento de la indentación se incrementó.
- En relación al efecto de la velocidad de carga y descarga sobre el desplazamiento de indentación, los resultados revelaron que el desplazamiento de la indentación está

altamente influenciado por dicha variable y un incremento de manera logarítmica fue observado para los valores del desplazamiento de indentación para las tres películas.

- Los resultados de las pruebas de indentación a las mismas condiciones para las tres películas mostraron que la película de alginato presentó los valores más altos de dureza y módulo elástico, seguida por la película de quitosano y por último la de alginato/quitosano.
- Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los valores del desplazamiento de la indentación para las películas de alginato y alginato/quitosano y la película de alginato mostró un valor de desplazamiento de indentación bajo en comparación con los otros dos tipos de películas. Asimismo, valores de la parte elástica del trabajo de indentación estuvieron entre un rango de 27.80 a 34.32 % para las películas elaboradas.
- La técnica de nanoindentación resultó ser una herramienta útil para caracterizar las propiedades mecánicas a micro y nanoescala de películas comestibles, así como también para estudiar fenómenos acerca de las propiedades viscoelásticas de estos biomateriales. Con los resultados presentados en este trabajo se abre un área de oportunidad para poder explorar las propiedades mecánicas a estos niveles para las películas comestibles y por lo tanto a futuro más trabajos en este tema deberán ser desarrollados.

8.2 Caracterización cuantitativa de la microestructura mediante análisis de textura de imágenes

- Con base en el análisis cualitativo desarrollado con todas las técnicas de microscopía usadas (microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía de fuerza atómica), se pudo observar mediante las

micrografías que las películas preparadas empleando una mezcla de alginato y quitosano presentaron una estructura rugosa formada por una red de fibras, mientras que las películas de alginato y quitosano mostraron estructuras lisas.

- Los parámetros de textura extraídos a partir de las imágenes generadas mediante las técnicas de microscopía fueron exitosos para describir cuantitativamente la microestructura de la superficie de las películas comestibles estudiadas.
- Con respecto al análisis de microscopía de luz y microscopía electrónica, las películas de alginato/quitosano mostraron altos valores de los parámetros de energía y homogeneidad en comparación con las películas de alginato y quitosano. Tendencias opuestas fueron exhibidas para los parámetros de entropía y dimensión fractal para las tres películas.
- En particular para la microscopía de fuerza atómica, altos valores de entropía y dimensión fractal fueron exhibidos por las películas de alginato y alginato/quitosano en comparación con la película de quitosano. Además, se encontró que hubo una relación directa entre la dimensión fractal y los parámetros de rugosidad R_a y R_q .
- En base a los resultados obtenidos para las tres técnicas de microscopía se encontró que si existe un efecto del campo de visión y de la composición de las películas sobre los parámetros de textura evaluados, siendo este efecto más notorio en las técnicas de microscopía de luz y microscopía de fuerza atómica. Para la microscopía electrónica de barrido ambiental se observó que no existe un efecto significativo del campo de visión sobre los parámetros de textura evaluados.
- Los parámetros de entropía y dimensión fractal fueron útiles para evaluar la complejidad y rugosidad de la superficie de las películas. Por lo tanto, la relación entropía/dimensión fractal propuesta fue exitosa para evaluar la complejidad y rugosidad de las películas de manera conjunta.

- El presente estudio mostró que el análisis de textura de imágenes fue una herramienta eficiente para evaluar cuantitativamente las microestructuras de películas elaboradas con alginato y quitosano examinadas mediante las técnicas de microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía de fuerza atómica, además de que tal estudio podría ser una guía para seleccionar las condiciones de captura y las técnicas de microscopía para el estudio de películas comestibles.

8.3 Caracterización cuantitativa de los cambios superficiales del aguacate variedad Hass y su clasificación en etapas de madurez

- Los parámetros de las imágenes estimados mediante técnicas de procesamiento de imágenes proveyeron una buena descripción del proceso de maduración del aguacate variedad Hass. Además, el color y los parámetros de textura evaluados desde las imágenes, en particular los valores de dimensión fractal mostraron una adecuada correlación con los parámetros de calidad (color y firmeza).
- Se establecieron 3 clases de madurez considerando los cambios de color del aguacate Hass durante el proceso de maduración. Asimismo, la coordenada de cromaticidad a^* fue el parámetro que describió mejor el proceso de maduración del aguacate Hass, al evaluar los cambios de tonalidad verde en la cáscara del fruto.
- En un primer experimento las coordenadas del espacio de color CIELab (L^* , a^* y b^*) fueron útiles para clasificar las etapas de madurez de los aguacates logrando clasificar correctamente un 80.5% de las muestras; mientras que en otro experimento, seis parámetros de la imagen (a^* , correlación, energía, uniformidad, dimensión fractal y entropía) tuvieron un porcentaje de clasificación ligeramente mayor de 81.9%.

- En base a los resultados obtenidos es posible establecer que la metodología del procesamiento de imágenes resultó ser una herramienta útil para la clasificación de aguacates a nivel laboratorio. Para futuros trabajos, será necesario realizar más experimentos usando un mayor número de muestras y diferentes condiciones de almacenamiento con el fin de lograr un estudio más completo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT – Food Science and Technology*, doi:10.1016/j.lwt.2010.01.021
- Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L. G. M., & Smid, E. J. (2000). High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf life extension of minimally processed carrots. *Journal Food Science*, 65: 61-66.
- Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2009). Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin based films. *Food Research International*, 42, 1113-1121.
- Ashikin, W. H. N. S., Wong, T. W., & Law, C. L. (2010). Plasticity of hot air-dried mannuronate and guluronate-rich alginate films. *Carbohydrate Polymers*, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.02.002.
- Bangyekan, C., Aht-Ong, D., & Srikulkit, K. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 63: 61-71.
- Baudrier, E., Nicolier, F., Millon, G., & Ruan, S. (2008). Binary-image comparison with local-dissimilar quantification. *Pattern Recognition*, 41: 1461-1478.
- Boletín de Aplicación No. 22. Investigation of creep behavior using micro or Nanoindentation Tester (MHT/NHT). CSM Instruments, Switzerland.
- Bosquez, E., (2007). Desarrollo de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para la conservación de frutas.
- Bravin, B., Perissini, D., & Sensidoni A. (2006). Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Journal of Food Engineering*, 76: 280–290.
- Briones, V., & Aguilera, J M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38: 87-94.
- Cai, K., Rechtenbach, A., Hao, J., Bossert, J., Jandt, K. (2005). Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*, 26: 5960-5971.

- Chanona, J., Alamilla, L., Gutierrez, G. (2001). Caos y geometría de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *Biotecnología*, 5(3): 117-126.
- Chien, P., Sheu, F., & Yang, F. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78: 225–229.
- Chien, P., Sheu, F., & Lin, H., (2007). Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry*, 100: 1160–1164.
- Chiparus, O., & Chen, Y. (2003). An image method to evaluate bagasse fiber dimensions. *Bioresource Technology*, 90: 305–309.
- Cho, S., & Rhee, Ch. (2004). Mechanical properties and water vapor permability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT*, 37: 833-839.
- Cox, K. A., McGhie, T. K., White, A., & Wolf, A. B. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of Hass avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31 (1): 287-294.
- Da Silva, M. A., Krause, A. C., & Kieckbush, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736-742.
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D. R., Añón, M. C., Sobral, P. J. A., Mauri, A. N., & Menegalli, F. C. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, 90, 341-349.
- Dogan, N., & McHugh, T. (2007). Effects of Microcrystalline Cellulose on Functional Properties of Hydroxy Propyl Methyl Cellulose Microcomposite Films. *Journal of Food Science*, 72 (1): E16-E22.
- Du, C., & Sun, D. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 230–249.
- Du, C., & Sun, D. (2006). Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: a review. *Journal of Food Engineering*, 72: 39–55.

- Ebenstein, D. M., & Pruitt, L. A. (2006). Nanoindentation of biological materials. *Nanotoday*, 1(3): 26-33.
- Fahs, A., Brogly, M., Bistac, S., & Schmitt, M. (2010). Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) formulated films: Relevance to adhesion and friction surface properties. *Carbohydrate Polymers*, 80, 105-114.
- Fischer-Cripps, A. C. 2006. Critical review of analysis and interpretation of nanoindentation test data. *Surface & Coatings Technology*, 200: 4153:4165.
- Fisk, C., Silver, A., Strik, B., Zhao, Y. (2007). Postharvest quality of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* ‘Ananasnaya’) associated with packaging and storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*. Article in Press.
- Fernández, L., Castellero, C., & Aguilera, J. M. (2005). An application of image analysis to dehydration of apple discs. *Journal of Food Engineering*, 67: 185-193.
- Fernández, L., Díaz, E., Cebrián, M., Villarán, M., & Maté, J., (2007). Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. *Europa Food Research Technology*, 224: 415–420.
- García, M., Pinotti, A., Martino, M., Zaritzky, N., (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56: 339-345.
- Gosselin, R., Duchesne, C., & Rodrigue, D. (2008). On the characterization of polymer powders mixing dynamics by texture analysis. *Powder Technology*, 183: 177-188.
- Goulao, L., & Oliveira C. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not de fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 19 (1): 4-25.
- Guo, G., Wang, H., Bell, D., Bi, Y., & Greer, K. (2003). KNN Model-Based Approach in classification. In Proc. of the Move to Meaningful Internet Systems 2003: CoopIS, DOA, and ODBASE. pp 986-996.
- Haralick, R., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics SMC*, 3(6): 610-621.
- Hsu, B. L., Weng, Y. M., Liao, Y.H., & Chen, W. (2005). Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53: 5089-5095.

- ISO. (2007). 14577-4, Metallic materials – Instrumented Indentation Test for Hardness and materials parameters – Part 4: Test method for metallic and non-metallic coatings. ISO, Geneva, Switzerland.
- Jagannath, J., Nanajappa, C., Gupta, D., & Bawa, A. (2006). Studies on the stability of an edible film and its use for the preservation of carrot (*Daucus carota*). *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 498–506.
- James, B. (2009). Advances in wet electron microscopy techniques and their application to the study of food structure. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 114-124.
- Jolliffe, I. T. (2002). Principal component analysis. Series: Springer Series in Statistics. Segunda edición. Springer, NY.
- Ke, G., Xu, W., & Yu, W. (2010). Preparation and properties of drug-loaded chitosan-sodium alginate complex membrane. *International Journal of Polymeric Materials*, 59: 184-191.
- Kumar, S., & Mittal, G. (2008). Geometric and optical characteristics of five microorganisms for rapid detection using image processing. *Biosystems Engineering*, 99: 1-8.
- Kumar, M., Garg, P., & Khare, D. (2008). Monitoring and modelling of urban sprawl using remote sensing and GIS techniques. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 10: 26–43.
- Lai, M., & Wang, L. (2008). Automatic shoe-pattern boundary extraction by image-processing techniques. *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing*, 24: 217–227.
- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., & Buonocore, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glicerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82: 291-298.
- Lee, J., Park, H., Lee, C., & Choi, W. (2003). Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 323–329.
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(1): 1084-1091.

- Lin, D., Zhao, Y., (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 6: 60-76.
- Liu, F., Qin, B., He, L., & Song, R. (2009). Novel starch/chitosan blending membrane: Antibacterial, permeable and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 78, 146-150.
- Loukas, C., & Linney, A. (2004). A survey on histological image analysis-based assessment of three major biological factors influencing radiotherapy: proliferation, hypoxia and vasculature. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 74: 183-199.
- Lucca, D. A., Herrmann, K., & Klopstein, M. J. (2010). Nanoindentation: Measuring methods and applications. *CIRP Annals-Manufacturing Technology*, 59: 803-819.
- Maftoonazad, N., & Ramaswamy, H. (2005). Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT*, 38: 617–624.
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H., Moalemiyan, M., & Kushalappa, A., (2007). Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasioidiplodia theobromae* infection. *Carbohydrate Polymers*, 68: 341–349.
- Maia, R., Ferreira, N., Alvarenga, D., & Almeida, L. (2007). Characterization and effect of edible coatings on minimally processed garlic quality. *Carbohydrate Polymers*. Article in Press.
- Mandelbrot, B.M. 1977. *The Fractal Geometry of Nature*. W. H. Freeman. New York, USA. pp.10-41.
- Mendoza, E., & Aguilera, J. (2004). Application of image analysis for classification of ripening bananas. *Journal of Food Science*, 69 (9): E471 – E477.
- Mendoza, F., Dejmek, P., & Aguilera, J. M. (2006). Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3): 285-295.

- Mendoza, F., Dejmek, P., & Aguilera, J. (2007). Colour and image texture analysis in classification of commercial potato chips. *Food Research International*, *40*: 1146–1154.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, *106*: 501–508.
- Meng, X., Tian, F., Yang, J., He, C.-N., Xing, N., & Li, F. (2010). Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal Material Science: Material Medical*, *21*: 1751-1759.
- Nazan, K., & Sahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, *61*: 459–466.
- NMX-FF-016-2002. Productos alimenticios no industrializados para uso humano – fruta seca – aguacate (*Persea americana* Mill). Visitada en línea en febrero 2009. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-016-2002.PDF>
- No, H., Meyers, S., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Concise Reviews/Hypotheses in Food Science*, *72* (5): R87-R100.
- Norajit, K., Kim, K .M., & Ryu, G H. (2010). Comparative studies and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, *98*: 377-384.
- Nussinovitch, A. (2009). Biopolymer films and composite coatings. *Modern Biopolymer Science, Chapter 10*: 295-326.
- Ochoa, S., Hertog, M., & Nicolai, B. (2009). Modelling the transient effect of 1-MCP on Hass avocado softening: a mexican comparative study. *Postharvest Biology and Technology*, *51*(1): 62-72.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hashem, S. M. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward wáter. *Food Chemistry*, *122*: 161-166.

- Olivas, G. I., Mattinson, D. S., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Alginate coatings for preservation of minimally processed Gala apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45:601 89-96.
- Oliver, W.C., & Pharr, G. M. (2004). Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of Materials Research*, 19 (1): 3-20.
- Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S. A., Cruz-Orea, A., & Maté, J. I. (2009). Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal Food Engineering*, 92, 56-62.
- Ostrowska-Czubenko, J., & Gierszewska-Druzynska, M. (2009). Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, 77, 590-598.
- Ozdemir, M., & Floros, J. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*. 84:116–123.
- Papadakis, S., Abdul-Malek, S., Kamen, R., & Yam, K. (2000). A versatile and expensive technique for measuring color of foods. *Food Technology*, 54 (12): 48-51.
- Pedreschi, F., Aguilera, J. M., & Brown, C. A. (2000). Characterization of food surfaces using scale-sensitive fractal analysis. *Journal of Food Process Engineering*, 23: 127-143.
- Pedreschi, F., Mery, D., Mendoza, F., & Aguilera, J., (2004), Classification of potato chips using pattern recognition. *Journal of Food Science*, 69 (6): E1-E5.
- Peleng, M., & Normand, M. D. (1985). Characterization of the ruggedness of instant coffee particle shape by natural fractals. *Journal of Food Science*, 50: 829-831.
- Pentland, A. (1984). Fractal based description of natural scenes. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 6: 661-674.
- Perea-Flores, M. J., Chanona-Perez, J. J., Garibay-Febles, V., Calderón-Dominguez, G., Terrés-Rojas, E., Mendoza-Pérez, J. A., & Herrera-Bucio, R. (2011). Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical

- properties and morphological features for sedes of the castor oil plant (*Ricinus communis*). *Industrial Crops and Products*. Article in Press.
- Peressini, D., Bravin, B., Lapasin R., Rizzotti, C., & Sensidoni, A. (2003). Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59: 25–32.
- Perez, M., Serra, M., & Río, M. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39: 84–92.
- Pérez-Nieto, A., Chanona-Pérez, J. J., Farrera-Rebollo, R. R., Gutiérrez-López, G. F., Alamilla-Beltrán, L., & Calderón-Domínguez, G. (2010). Image analysis of structural changes in dough during baking. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT Food Science and Technology*, 43(3): 535-543.
- Phan, T., Debeaufort, F., Luu, D., & Voilley, A. (2005). Functional Properties of Edible Agar-Based and Starch-Based Films for Food Quality Preservation. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53: 973-981.
- Quevedo, R., Carlos, L. P., Aguilera, J. M. & Cadoche, L. (2002). Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering*, 53: 361-371.
- Quevedo, R., Mendoza, F., Aguilera, J., Chanona, J., & Gutierrez, G. (2008). Determination of senescent spotting in banana (*Musa cavendish*) using fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 84: 509–515.
- Quevedo, R., Jaramillo, M., Díaz, O., Pedreschi, F., & Aguilera. (2009). Quantification of enzymatic browning in Apple slices applying the fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 95: 285-290.
- Quevedo, R., Ronceros, B., García, K., López P., & Pedreschi, F. (2011). Enzymatic browning in sliced and pureed avocado: A fractal kinetic study. *Journal of Food Engineering*, 105(2): 210-215.
- Rhim, J. W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT*, 37: 323-330.

- Ribeiro, C., Vicente, A., Teixeira, J., & Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 44: 63–70.
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90: 531-539.
- Rodríguez, R., & Gutierrez, I. (2003). Correlation between nanoindentation and tensile properties influence of the indentation size effect. *Materials Science and Engineering*, A361: 377-384.
- Rojas, M., Raybaudi, R., Soliva, R., Avena, R., McHugh, T., & Martin, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 254–264.
- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., Rodríguez, F. J., Carmona, A. J., & Martín-Belloso, O. (2007a). Alginate and gellan based edible coatings as support of antibrowning agents applied on fresh cut Fuji apple. *Food Hydrocolloids*, 21, 118-127.
- Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Martín-Belloso, O. (2007b). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 254-264.
- Schmitt, O., & Hasee, M. (2007). Radial symmetries based decomposition of cell clusters in binary and gray level images. *Pattern Recognition*, Article in Press.
- Serizawa, T., Iida, K., Matsuno H., Kurita, K. (2006). Prolonged degradation of end-capped polyelectrolyte multilayer films. *Polymer Bulletin*, 57: 407–413.
- Silva, S. S., Goodfellow, B. J., Benesch, J., Rocha, J., Mano, J. F. & Reis, R. L. (2007). Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydrate Polymers*, 70: 25-31.
- Sime, W. J. (1990). Alginates. In Harris, P. (Ed.), *Food gels*. Elsevier Applied Science, London, pp. 53-58.
- Sinha, P., Muthukumar, S., & Mukherjee, S. (2008). Analysis of first mode of metal transfer in friction stir welded plates by image processing technique. *Journal of Materials Processing Technology*, 197: 17-21.

- Sui, Z., [En línea], USA (2004). Characterization and applications of pH-responsive polyelectrolyte complex and multilayers. Florida State University. Visitada el 10 de septiembre de 2007.
- Tapia, M., Rojas, M., Rodriguez, F., Ramirez, J., Carmona, A., Martin, O. (2007). Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. *Journal of Food Science*, 72 (4): E190-E196.
- Tay, S. L., & Perera, C. O. (2004). Effect of 1-methylcyclopropene treatment and edible coatings on the quality of minimally processed lettuce. *Journal Food Science*, 69: C131-135.
- Tessier, J., Duchesne, C., Gauthier C., & Dufour, G. (2008). Estimation of alumina content of anode cover materials using multivariate image analysis techniques. *Chemical Engineering Science*, 63:1370-1380.
- Varahramyan, K., Lvov, Y., [En línea], USA (2007). Nanomanufacturing by Layer-by-Layer Assembly Institute for Micromanufacturing. Louisiana Tech University. Visitada el 12 de octubre de 2007.
- Veiga-Santos, P., Suzuki, C. K., Nery, K. F., Cereda, M.P., & Scamparini, A. R. P. (2008). Evaluation of optical microscopy efficacy in evaluating cassava starch biofilms microstructure. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT*, 41: 1506-1513.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., & Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19: 53-61.
- Wang, S.-F., Shen, L., Zhang, W.-D., & Tong, Y.J. (2005). Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules*, 6: 3067-3072.
- Weiss, J., Takhistov, P., McClements, J., (2006). Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*. 71(9): R107-R116.
- Wen-Shiung, C., Shang-Yuan, Y., & Chih-Ming, H. (2003). Two algorithms to estimate fractal dimension of gray-level images. *Optical Engineering*, 42(8): 2452-2464.

- Wu, Z., Baker, T. A., Ovaert, T. C., & Niebur, G. L. (2011). The effect of holding time on nanoindentation measurements of creep in bone. *Journal of Biomechanics*, 44: 1066-1072.
- Xu, S., Chen, X., & Sun, D. (2001). Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *Journal Food Engineering*, 50:211–216.
- Yang, H., An, H., Feng, G., & Li, Y. (2005). Visualization and quantitative roughness analysis of peach skin by atomic force microscopy under storage. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT*, 38: 571-577.
- Yang, Y., He, Q., Duana, L., Cui, Y., Li, J. (2007). Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials*. 28: 3083–3090.
- Yoshino, T., Isobe, S., & Maekawa, T. (2000). Physical Evaluation of Pure Zein Films by Atomic Force Microscopy and Thermal Mechanical Analysis. *JAOCS*. 77(7): 699-704.
- Yong, S., Park, J., Batt, H., & Thomas, R. (2007). Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT*, 40: 418–423.
- Zhang, Y., & Han, J.H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71: 253-261.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V., & Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glicerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie LWT*, 41: 2159-2165.
- Yang, H., Wang, Y., Lai, S., An, H., Li, Y., & Chen, F. (2007). Application of atomic force microscopy as a nanotechnology tool in food science. *Journal of Food Science*, 72 (4), R65-R75.