



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE MECANIZACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO, APLICACIÓN Y PROPUESTA DE AUTOMATIZACIÓN DEL
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES POR RESONANCIA MAGNÉTICA
PARA LA EVALUACIÓN Y DETECCIÓN DE DEFECTOS INTERNOS DE
CALIDAD EN CÍTRICOS Y MELOCOTONES**

IVÁN DARÍO ARISTIZÁBAL TORRES

Valencia

2006



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE MECANIZACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA

**ESTUDIO, APLICACIÓN Y PROPUESTA DE AUTOMATIZACIÓN DEL
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES POR RESONANCIA MAGNÉTICA
PARA LA EVALUACIÓN Y DETECCIÓN DE DEFECTOS INTERNOS DE
CALIDAD EN CÍTRICOS Y MELOCOTONES**

IVÁN DARÍO ARISTIZÁBAL TORRES

TESIS DOCTORAL

**Presentada como requisito parcial para la
obtención del Título de Doctor en
Mecanización y Tecnología Agraria.**

**Directores: Dr. Enrique Moltó García
Dra. María Coral Ortiz Sánchez**

Valencia, febrero de 2006

© Iván Darío Aristizábal Torres

*Reproducción autorizada para
el cumplimiento de requisitos
académicos.*

Valencia, 2006.

... A mi amada esposa Miriam
... A mi adorada hija Mariana
... A mi queridísimo padre Olivio
... A mi recordada madre Cecilia

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia por la comisión de estudios otorgada para realizar el programa doctoral en el exterior.

A la Universidad Politécnica de Valencia, al Departamento de Mecanización y Tecnología Agraria y a sus docentes por la formación recibida.

Al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias IVIA y a su director, el Dr. Florentino Juste, por permitirme desarrollar ésta investigación, compartir con sus investigadores y utilizar sus instalaciones y equipos.

Al director de ésta tesis, Dr. Enrique Moltó García, por su confianza, orientación y permanente colaboración para sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Coral Ortiz Sánchez por sus acertados consejos, asesorías y apoyo incondicional durante el desarrollo del programa de estudios y de la tesis.

Al Dr. Carlos Gracia López, Director del Depto. de Mecanización y Tecnología Agraria, por brindarme su confianza, respaldo y colaboración como becario del departamento durante mi estancia en España.

Al Dr. José Blasco, investigador del laboratorio de Visión Artificial del Centro de Agroingeniería del IVIA, por sus orientaciones con el equipo RMI y por sus asesorías en el procesamiento digital de imagen.

Al Dr. Juan José Tuset y al personal de la unidad de Micología del IVIA por las asesorías y colaboración prestada en los experimentos de inoculación de hongos.

Al Dr. Francisco José Beitia de la unidad de Entomología del IVIA por su colaboración en el experimento con *Ceratitis capitata*.

A los Doctores Lluís Palou y María Bernardita Pérez del Depto. de Poscosecha del IVIA por sus asesorías y gran colaboración en los experimentos de almacenamiento de melocotón.

Al Depto. de Citricultura y otros frutales del IVIA por su colaboración en la consecución de las frutas utilizadas en los diferentes experimentos.

A todos los compañeros del Depto. de Mecanización y Tecnología Agraria, en especial a MariCarmen Fernández y Ángel Pérez por su amistad.

Al señor Juanjo Gil, Auxiliar del Centro de Agroingeniería del IVIA, por su valiosa y siempre oportuna colaboración logística.

A los compañeros colombianos, argentinos, mejicanos, cubanos, españoles y de otras nacionalidades que conocí en el programa de doctorado, con quienes compartimos momentos muy agradables.

A todos los compañeros del Centro de Agroingeniería del IVIA, que tuve oportunidad de conocer durante mi estancia, por su colaboración y por la amistad que me brindaron.

A mi familia; mi esposa Miriam por su permanente e incondicional apoyo y mi hija Mariana por haberme convertido en un orgulloso papá.

A nuestros amigos valencianos: Boro, Gloria, Carmen, Doña Vicenta, Tere y Vicente, por todos los momentos compartidos.

Al grupo de amigos colombianos estudiantes y residentes en Valencia: Oscar, Margarita, Silvio, Marina, Martín, Sandra, Jaime y Mónica, por su sincera amistad.

A todos nuestros familiares y amigos quienes desde Colombia siempre nos manifestaron, durante estos tres años de ausencia, su amor, cariño, amistad y recuerdos permanentes.

A mis compañeros profesores Elkin, Fernando y Hugo del laboratorio de Mecanización Agrícola en la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo y colaboración durante mi ausencia.

A todas las personas que de una u otra forma nos ayudaron durante la estancia y convivencia en Valencia y en España.

RESUMEN

Aunque en numerosas investigaciones se han obtenido resultados bastante prometedores con Imágenes de Resonancia Magnética (RMI) para la determinación de la calidad interna de las frutas y hortalizas, todavía existen problemas por resolver para alcanzar el uso comercial de la misma. Además, en general, se han utilizado equipos que tienen elevadísimos costes de inversión y de mantenimiento. La RMI basada en equipos de baja intensidad de campo magnético es una interesante alternativa por su menor coste. En este trabajo se utilizaron técnicas RMI con un equipo de bajo campo (0,18 T) y se desarrollaron y evaluaron algoritmos para el procesamiento digital de las imágenes obtenidas de melocotones y las naranjas, con el objetivo de detectar automáticamente diferentes daños internos, no apreciables más que con métodos destructivos convencionales.

Se estudiaron diferentes secuencias RMI y, mediante seis criterios de calidad desarrollados en esta tesis, se seleccionaron aquellas que permitieron obtener la mejor calidad de imagen del interior de los frutos. Dos secuencias eco espín, una ponderada en T_1 , y otra ponderada en T_2 , permitieron obtener imágenes RMI de alta calidad en los planos ecuatorial y longitudinal, tanto de melocotones como de naranjas, visualizando en ellas otros tipos de defectos internos.

En melocotones, los algoritmos desarrollados detectaron el 98% de frutos afectados por un hongo saprofito, con una falsa detección en fruta sana del 21%. La detección de fruta con picadura de mosca fue del 71%, con una alta falsa asignación de fruta sana con daño (42%). Para el daño por frío, los algoritmos detectaron más del 98% de la fruta con daño almacenada durante 32 días a 5°C, desde el día 22 cuando este ocurrió y con dos días de antelación a la valoración realizada con métodos destructivos.

En naranjas, los algoritmos para detectar daños por hongos permitieron discriminar más del 80% de frutos afectados, con una falsa asignación de fruta sana como dañada menor del 20%. La detección automática y anticipada del deterioro producido por hongos se realizó entre 2 y 7 días de antelación, antes de aparecer síntomas exteriores de podredumbre. Los algoritmos desarrollados para el daño por heladas en naranjas presentaron los mejores resultados de todos los defectos estudiados, con un 94% de detección acertada y un 8% de falsa detección, en promedio.

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación, se presenta al final una propuesta para desarrollar un sistema automático de inspección de la calidad interna de la fruta, basado en imágenes RMI conseguidas con un equipo de bajo campo magnético.

PALABRAS CLAVES: reconstrucción de imágenes por resonancia magnética, RMI, procesamiento digital de imagen, calidad de frutas, daños internos, melocotón, naranja.

RESUM

Encara que en nombroses investigacions s'han obtingut resultats prou prometedors amb Imatges de Ressonància Magnètica (RMI) per a la determinació de la qualitat interna de les fruites i hortalisses, encara hi ha problemes per resoldre per a aconseguir l'ús comercial de la mateixa. A més, en general, s'han utilitzat equips que tenen elevadíssims costos d'inversió i de manteniment. La RMI basada en equips de baixa intensitat de camp magnètic és en una interessant alternativa pel seu menor cost. En este treball es van utilitzar tècniques RMI amb un equip de baix camp (0,18 T) i es van desenvolupar i van avaluar algoritmes per al processament digital de les imatges obtingudes de bresquilles i les taronges, amb l'objectiu de detectar automàticament diferents danys interns, no apreciables més que amb mètodes destructius convencionals.

Es van estudiar diferents seqüències RMI i, per mitjà de sis criteris de qualitat desenvolupats en esta tesi, es van seleccionar aquelles que van permetre obtenir la millor qualitat d'imatge de l'interior dels fruits. Dos seqüències espí-eco, una ponderada en T_1 , i una altra ponderada en T_2 , van permetre obtenir imatges RMI d'alta qualitat en els plans equatorial i longitudinal, tant de bresquilles com de taronges, visualitzant en elles altres tipus de defectes interns.

En bresquilles, els algoritmes desenvolupats van detectar el 98% de fruits afectats per un fong sapròfit, amb una falsa detecció en fruita sana del 21%. La detecció de fruita amb picadura de mosca va ser del 71%, amb una alta falsa assignació de fruita sana amb dany (42%). Per al dany per fred, els algoritmes van detectar més del 98% de la fruita amb dany emmagatzemat durant 32 dies a 5°C, des del dia 22 quan este va ocórrer i amb dos dies d'antelació a la valoració realitzada amb mètodes destructius.

En taronges, els algoritmes per a detectar danys per fongs van permetre discriminar més del 80% de fruits afectats, amb una falsa assignació de fruita sana com danyada menor del 20%. La detecció automàtica i anticipada del deteriorament produït per fongs es va realitzar amb entre 2 i 7 dies d'antelació, abans d'aparèixer símptomes exteriors de podridura. Els algoritmes desenvolupats per al dany per gelades en taronges van presentar els millors resultats de tots els defectes estudiats, amb un 94% de detecció encertada i un 8% de falsa detecció, com a mitjana.

Considerant els resultats obtinguts en esta investigació, es presenta al final una proposta per a desenvolupar un sistema automàtic d'inspecció de la qualitat interna de la fruita, basat en imatges RMI aconseguides amb un equip de baix camp magnètic.

PARAULES CLAU: reconstrucció d'imatges per ressonància magnètica, RMI, processament digital d'imatge, qualitat de fruites, danys interns, bresquilla, taronja.

ABSTRACT

Although many researches have obtained promising results with Magnetic Resonance Imaging (MRI) techniques for fruit and vegetable internal quality assessment, many problems remain to be solved for a commercial use of such techniques. Moreover, in these researches, high cost equipment has been employed. MRI based on low magnetic field equipment can be an adequate alternative because of its low costs. In this work MRI techniques with a low magnetic field (0,18T) were used, and new algorithms for image analysis were developed and tested for the automatic detection of different internal damages of peaches and oranges that currently are only detected with conventional, destructive techniques.

Different MRI sequences were evaluated by means of six quality criteria established in this work, which allowed to select the best one to obtain internal images of the fruits. Two spin echo sequences, one weighed in T_1 , and the other in T_2 allowed to obtain high quality MRI images in the equatorial and longitudinal planes, both in peaches and oranges, that were used to visualize several types of internal defects.

In peaches, the developed algorithms detected 98% of fruits affected by a *Alternaria sp.* fungus, with 21,1% false detection of healthy fruit. 71% of fruit presenting Medfly punctures were detected, with 42% false assignment of healthy fruit. Algorithms detected up to 98% fruit presenting chilling injuries due to storage during 32 days at 5°C, from day 22, two days before than conventional, destructive methods.

In oranges, the developed algorithms detected damages caused by fungi in more than 80% of affected fruits, with 20 % false detection of healthy fruit. The automatic and anticipated fungal disease detection was carried out 2-7 days before fruit presented external symptoms. Algorithms for detecting freezing injuries in oranges presented the best detection rates, with 94% damage detection and 8% of false detections.

Considering all the contributions of this research, at the end, a proposal of a MRI automatic system for the internal quality inspection of fruit, for a low magnetic field equipment is presented.

KEY WORDS: magnetic resonance imaging, MRI, image analysis, internal quality of fruit, damages, peach, oranges.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. La Resonancia Magnética RM y el análisis de imágenes de RM.....	9
2.1.1. Principios básicos de la RM.....	10
2.1.1.1. Comportamiento del momento magnético.....	13
2.1.1.2. Efecto de una onda electromagnética.....	18
2.1.1.3. Fenómenos de relajación.....	20
2.1.1.4. Medida de la señal de inducción libre FID.....	25
2.1.1.5. Secuencias base para la determinación de los tiempos de relajación.....	28
2.1.1.6. Determinación de los tiempos de relajación.....	31
2.1.2. Equipo básico para medir RM.....	34
2.1.3. Análisis de imágenes obtenidas por resonancia magnética RMI.....	35
2.1.3.1. Codificación espacial de la señal y reconstrucción de la imagen.....	35
2.1.3.2. Pulsos en las secuencias de RMI.....	41
2.1.3.3. Campo de visión y matriz de una imagen.....	42
2.1.3.4. Tiempo de reconstrucción de una imagen.....	45
2.1.4. Principales técnicas de reconstrucción de imágenes.....	46
2.1.4.1. Secuencia de reconstrucción Espín-Eco (SE).....	46
2.1.4.2. Secuencia de reconstrucción Inversión-Recuperación (IR).....	47
2.1.4.3. Secuencia de reconstrucción Gradiente-Eco (GE).....	48
2.1.4.4. Secuencia RARE.....	49
2.1.4.5. Técnicas de imágenes instantáneas.....	49
2.1.5. Factores de calidad de la imagen.....	49
2.1.5.1. Relación señal-ruido.....	50
2.1.5.2. El Contraste.....	52
2.1.5.3. La resolución espacial.....	53
2.1.5.4. Artefactos.....	54
2.1.5.5. Relaciones entre los factores de calidad.....	56
2.2. Equipos y tecnología para RMI.....	57
2.2.1. Magneto o imán principal.....	57
2.2.2. Bobinas de gradiente.....	59
2.2.3. Bobinas de RF.....	60
2.2.4. Sistema de procesamiento y visualización.....	61
2.3. Aplicaciones de la RM en el sector agroalimentario.....	61
2.4. Estudios de RM en frutas y vegetales.....	64
2.4.1. Crecimiento de los frutos.....	64
2.4.2. Evaluación de maduración.....	65
2.4.3. Detección de defectos internos.....	67

2.4.3.1.	Daños por insectos y hongos.....	67
2.4.3.2.	Magulladuras.....	67
2.4.3.3.	Semillas y hueso.....	68
2.4.4.	Estudios de desordenes fisiológicos.....	68
2.4.4.1.	Daños por heladas en campo.....	69
2.4.4.2.	Corazón acuoso (“watercore”).....	69
2.4.4.3.	Degradación acuosa (“core breakdown”).....	70
2.4.4.4.	Pardeamiento interno (“internal browning”).....	70
2.4.4.5.	Harinosidad (“mealiness, “woolliness”) y mal radiante (“internal breakdown”).....	71
2.4.4.6.	Daño por frío (chilling injury).....	72
2.4.4.7.	Daño por congelamiento (“freezing”).....	73
2.4.4.8.	Daño por tratamiento térmico.....	74
2.4.5.	Otros estudios en procesamiento poscosecha.....	74
2.5.	Sensores de RM desarrollados para productos agrícolas.....	74
 CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....		77
3.1.	Objetivo general.....	79
3.2.	Objetivos específicos.....	79
 CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....		81
4.1.	Equipo de RMI.....	83
4.2.	Sistema de captación de imágenes RMI.....	85
4.3.	Otros equipos utilizados en la investigación.....	85
4.4.	Material vegetal y descripción de daños internos.....	86
4.4.1.	Melocotones y nectarinas.....	86
4.4.1.1.	Daño por hongo saprofito desconocido.....	86
4.4.1.2.	Daño por frío.....	86
4.4.1.3.	Daño por la mosca de la fruta <i>Ceratitis capitata</i> Wied.....	87
4.4.2.	Cítricos.....	88
4.4.2.1.	Daño por <i>Alternaria alternata</i> Keissl pv <i>citri</i>	88
4.4.2.2.	Daño por <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	89
4.4.2.3.	Daño por <i>Diplodia natalensis</i> Pole-Evans.....	89
4.4.2.4.	Daño por helada.....	90
4.5.	Selección de secuencias para la obtención de imágenes internas de alta calidad.....	91
4.5.1.	Melocotones.....	91
4.5.2.	Cítricos.....	93
4.5.3.	Procesamiento digital de las imágenes y análisis de criterios de calidad.....	94

4.6.	Preparación de muestras y adquisición de imágenes.....	97
4.6.1.	Melocotones.....	97
4.6.1.1.	Ensayo preliminar.....	97
4.6.1.2.	Frutos con hongo saprofito.....	101
4.6.1.3.	Daño por frío durante el almacenamiento.....	102
4.6.1.4.	Frutos con picadura de <i>Ceratitits capitata</i>	104
4.6.2.	Cítricos.....	106
4.6.2.1.	Inoculación de hongos.....	106
4.6.2.2.	Frutos afectados por heladas en campo.....	109
4.7.	Algoritmos desarrollados para la detección de daños.....	110
4.7.1.	Algoritmos empleados en los melocotones.....	111
4.7.1.1.	Detección de daños producidos por el hongo saprofito y por frío.....	111
4.7.1.2.	Detección del daño por picadura de mosca.....	114
4.7.2.	Algoritmos empleados para la detección de daños en cítricos.....	114
4.8.	Herramientas de análisis de imagen y de programación.....	115
4.8.1.	Calibración de los píxeles.....	116
4.8.2.	Selección de regiones de interés (ROI).....	116
4.8.3.	Herramientas estadísticas.....	116
4.8.4.	Operaciones de procesamiento de imagen.....	117
4.8.5.	Análisis de manchas.....	119
4.8.6.	Aplicación de modelos.....	120
4.8.7.	Escritura y ejecución de macros.....	121
4.9.	Evaluación de los algoritmos.....	123
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		125
5.1.	Selección de secuencias de RMI para la obtención de imágenes internas de alta calidad.....	127
5.1.1.	Melocotones.....	127
5.1.2.	Cítricos.....	144
5.2.	Resultados del ensayo preliminar en melocotones.....	153
5.2.1.	Frutos inoculados con <i>Penicillium digitatum</i>	153
5.2.2.	Daño por larvas de <i>Ceratitits capitata</i> Wied.....	160
5.2.3.	Frutos almacenados a muy baja temperatura.....	165
5.3.	Algoritmos desarrollados para la detección de daños.....	173
5.3.1.	Detección en melocotones.....	173
5.3.1.1.	Imágenes RMI con daño por hongo saprofito.....	174
5.3.1.2.	Imágenes RMI con daño por frío.....	175
5.3.1.3.	Imágenes RMI con picadura de <i>Ceratitits capitata</i> Wied.....	188
5.3.2.	Detección en cítricos.....	197
5.3.2.1.	Imágenes RMI con daño por hongos.....	197
5.3.2.2.	Imágenes RMI con daño por heladas.....	201

5.4.	Evaluación de los algoritmos.....	210
5.4.1.	Melocotones.....	210
5.4.1.1.	Seguimiento y detección anticipada del daño por frío.....	212
5.4.1.2.	Resultados en la detección automática.....	218
5.4.2.	Cítricos.....	222
5.4.2.1.	Seguimiento de la detección del daño por hongos en cítricos.....	225
5.4.2.2.	Detección del daño por heladas en campo.....	231
CAPITULO 6.	PROPUESTA DE AUTOMATIZACIÓN.....	235
CAPITULO 7.	CONCLUSIONES.....	243
CAPITULO 8.	SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS.....	249
CAPITULO 9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	253
ANEXOS	269

ÍNDICE DE ANEXOS

A1.	Reseña histórica del desarrollo de la tecnología de RM y RMI.....	271
A2.	Composición química y morfología del fruto maduro, en estado fresco.....	273
A3.	Caracterización de melocotones Calanda, variedad “Amarillo tardío” clon “Jesca”, utilizados en experimentos de daño por hongo saprofito y daño por frío.....	274
A4.	Método cualitativo-destructivo de evaluación del daño por frío en frutos de hueso.....	275
A5.	Macro MediaROI.scr.....	277
A6.	Macro DesviacionROI.scr.....	279
A7.	Macros para la calibración de los píxeles de las imágenes RMI a unidades reales de la fruta.....	280
A8.	Macro de auto-segmentación de imagen.....	282
A9.	Macros de procesamiento digital de imágenes RMI de melocotones.....	283
A10.	Macros de procesamiento digital de imágenes RMI de cítricos.....	290
A11.	Imágenes de hongos inoculados en cítricos.....	300

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 2.1	Parámetros de RM de núcleos de interés biológico.....	17
Tabla 2.2	Influencia de los parámetros programables en la calidad de la imagen RMI.....	56
Tabla 2.3	Influencia de los parámetros programables que no afectan el contraste en la calidad de la imagen RMI.....	56

Capítulo 4

Tabla 4.1	Tipos de secuencias, contraste que se obtiene y parámetros programados para la reconstrucción de imágenes de RM.....	91
Tabla 4.2	Secuencias y parámetros evaluados en los frutos de cítricos.....	93
Tabla 4.3	Criterios de calidad definidos para la selección de secuencias.....	96
Tabla 4.4	Métodos de inoculación y concentración de esporas empleados.....	98
Tabla 4.5	Tiempo de exploración de las muestras en ensayo preliminar.....	99
Tabla 4.6	Secuencias, parámetros y planos de exploración utilizados en los experimentos de RMI con melocotones.....	105
Tabla 4.7	Número de cortes (imágenes) obtenidas por secuencia y plano.....	108
Tabla 4.8	Secuencias y planos de exploración empleados para detectar daño por heladas en cítricos.....	110

Capítulo 5

Tabla 5.1	Imágenes RMI de frutos de hueso obtenidas según secuencias y parámetros de programación aplicados.....	128
Tabla 5.2	Señales medias y variables utilizadas para evaluar los criterios de calidad de las imágenes RMI.....	140
Tabla 5.3	Número de imágenes RMI que cumplieron los criterios de calidad establecidos.....	141
Tabla 5.4	Secuencias seleccionadas y parámetros de calidad obtenidos.....	141
Tabla 5.5	Imágenes RMI obtenidas de los frutos de hueso con las secuencias y parámetros de reconstrucción seleccionados.....	143
Tabla 5.6	Imágenes RMI de frutos de cítricos obtenidas según secuencias y parámetros de programación aplicados.....	144
Tabla 5.7	Resultados del procesamiento digital de las imágenes RMI de cítricos según secuencia empleada y ponderación de la señal.....	148
Tabla 5.8	Variables utilizadas para evaluar los criterios de calidad de las imágenes RMI de cítricos.....	150
Tabla 5.9	Número de imágenes RMI que cumplieron los criterios de calidad establecidos.....	153
Tabla 5.10	Secuencias seleccionadas y parámetros de calidad obtenidos.....	153
Tabla 5.11	Imágenes MRI de melocotones inoculados con <i>Penicillium digitatum</i> usando el método 1.....	154
Tabla 5.12	Imágenes MRI de melocotones inoculados con <i>P. digitatum</i> usando el método 2.....	155
Tabla 5.13	Señal media (nivel de gris) de la región pulpa obtenida en las imágenes RMI de los frutos estudiados.....	156

Tabla 5.14	Señal media de la región con daño por <i>Penicillium digitatum</i> obtenida en las imágenes RMI de los frutos estudiados.....	157
Tabla 5.15	Contraste pulpa-daño obtenido en las imágenes RMI estudiadas.....	158
Tabla 5.16	Evolución del área (mm ²) de las regiones de pulpa y daño en los frutos infestados con <i>Penicillium digitatum</i>	158
Tabla 5.17	Imágenes de los frutos de melocotón a las 20 y 92 horas después de la inoculación de <i>Penicillium digitatum</i>	159
Tabla 5.18	Imágenes RMI que muestran la evolución del daño interno en melocotón ocasionado por larvas de la mosca de la fruta.....	161
Tabla 5.19	Señal media y contraste obtenido entre las regiones del melocotón infestado por <i>C. capitata</i>	164
Tabla 5.20	Variación del área de la pulpa y del daño durante el ensayo.....	164
Tabla 5.21	Imágenes del daño interno en melocotón ocasionado por larvas de mosca.....	165
Tabla 5.22	Imágenes MRI de melocotones almacenados a 1°C y a -10°C.....	166
Tabla 5.23	Señal media obtenida según temperatura de almacenamiento y región estudiada del fruto de melocotón.....	170
Tabla 5.24	Contrastes medios entre las regiones estudiadas.....	171
Tabla 5.25	Evolución del área (mm ²) de las regiones estudiadas en los frutos de melocotón almacenados a bajas temperaturas.....	171
Tabla 5.26	Imágenes de los melocotones al inicio y final del almacenamiento a bajas temperaturas.....	172
Tabla 5.27	Imágenes RMI de melocotones obtenidas, según experimento, para el desarrollo de los algoritmos de procesamiento digital.....	173
Tabla 5.28	Imágenes RMI contrastadas en T ₁ y en T ₂ de melocotones, variedad Calanda, con daño por hongo saprofito y sin daño.....	175
Tabla 5.29	Imágenes RMI contrastadas en T ₁ y en T ₂ de melocotones, variedad Calanda, con daño por frío y sin daño.....	176
Tabla 5.30	Umbral de segmentación de la pulpa, el hueso y el daño.....	179
Tabla 5.31	Características seleccionadas e intervalos de clase para eliminación de manchas en imágenes RMI para la detección de daños por hongo y por frío.....	187
Tabla 5.32	Imágenes RMI de melocotón, variedad Baby Gold, sin daño y con daño por la mosca de la fruta <i>Ceratitis capitata</i>	188
Tabla 5.33	Características seleccionadas en el análisis de manchas e intervalos de clase en las imágenes RMI con daño por <i>Ceratitis capitata</i>	196
Tabla 5.34	Número de imágenes RMI de cítricos, con daño y sin daño, obtenidas según experimento y utilizadas para el desarrollo y evaluación de los algoritmos de procesamiento digital.....	198
Tabla 5.35	Imágenes RMI contrastadas en T ₁ y en T ₂ de cítricos, sin y con daño por <i>Alternaria alternata</i> pv <i>citri</i>	199
Tabla 5.36	Imágenes RMI contrastadas en T ₁ y en T ₂ de cítricos, sin y con daño por <i>Botrytis cinerea</i>	200
Tabla 5.37	Imágenes RMI contrastadas en T ₁ y en T ₂ de cítricos, sin y con daño por <i>Diplodia natalensis</i>	201
Tabla 5.38	Imágenes RMI contrastadas en T ₁ y en T ₂ de cítricos, sin y con daño, producido por heladas en campo.....	202

Tabla 5.39	Umbral de segmentación de regiones en cítricos.....	203
Tabla 5.40	Imágenes típicas obtenidas del procesamiento digital para cada uno de los daños estudiados en cítricos.....	206
Tabla 5.41	Características seleccionadas e intervalos de clase para eliminación de manchas no deseadas en la detección de daños en imágenes RMI de cítricos.....	208
Tabla 5.42	Detección de daños en cítricos afectados por hongos y por heladas en campo obtenida en la fase de validación del algoritmo.....	209
Tabla 5.43	Resultados de detección en melocotones de los algoritmos desarrollados según tipo de daño, contraste y plano de exploración.....	210
Tabla 5.44	Porcentajes de falsa detección en frutos sanos de melocotón obtenidos con los algoritmos desarrollados.....	211
Tabla 5.45	Evolución de algunas propiedades de los frutos de melocotón durante los tratamientos de almacenamiento.....	213
Tabla 5.46	Imágenes exteriores e interiores de frutos de melocotón en diferentes días de evaluación según el tratamiento de almacenamiento inicial.....	214
Tabla 5.47	Evolución del color de la epidermis, la firmeza y el contenido de azúcares de la pulpa durante el período de maduración a 20°C y 85% de HR.....	216
Tabla 5.48	Evolución del color del mesocarpio y de los síntomas del daño por frío durante la fase de maduración de los frutos de melocotón según la temperatura previa de almacenamiento.....	217
Tabla 5.49	Porcentajes de aciertos y de falsa detección del daño por frío en melocotones almacenados previamente a 1°C y a 5°C , en diferentes días de maduración según contraste y plano de exploración de las imágenes RMI.....	219
Tabla 5.50	Imágenes exteriores e interiores de frutos de melocotón en diferentes días de la fase de maduración según el tratamiento de almacenamiento previo.....	221
Tabla 5.51	Resultados de detección en cítricos de los algoritmos desarrollados según tipo de daño, contraste y plano de exploración.....	222
Tabla 5.52	Porcentajes de falsa detección en frutos sanos de cítricos obtenidos con los algoritmos desarrollados.....	224
Tabla 5.53	Porcentaje de detección de daño y tiempo de anticipación de la detección en ensayo preliminar de inoculación de tres hongos.....	225
Tabla 5.54	Resultados en la evolución de la detección de daños internos ocasionados por hongos en cítricos.....	227
Tabla 5.55	Apariencia externa e interna de los frutos con daño por hongos y controles en diferentes días del experimento.....	230
Tabla 5.56	Comparación de características físicas de frutos con y sin daño por heladas.....	231
Tabla 5.57	Apariencia externa e interna de los frutos con daño por helada y del control.....	232
Capítulo 6		
Tabla 6.1	Dimensiones máximas de la fruta a explorar según la bobina utilizada en el equipo RMI del IVIA.....	238
Tabla 6.2	Integración de algoritmos para el procesamiento digital de las imágenes RMI según el tipo de fruta a inspeccionar.....	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1	Momentos resultantes sobre un protón.....	11
Figura 2.2	Orientaciones posibles de \vec{S} en z para el protón.....	12
Figura 2.3	Orientación posible de \vec{m} en un campo \vec{B}_0	14
Figura 2.4	Orientación de los momentos \vec{m} y \vec{M} en un campo externo \vec{B}_0	14
Figura 2.5	Diagrama de nivel de energía de los estados paralelo (α) y antiparalelo (β)...	15
Figura 2.6	Rotación de \vec{M} alrededor de \vec{B}_0 debido a \vec{B}_1	19
Figura 2.7	Movimiento de precesión de \vec{M}	19
Figura 2.8	Relajación longitudinal T_1	21
Figura 2.9	Relajación transversal T_2	23
Figura 2.10	Funciones Fourier pares de uso común en RM.....	26
Figura 2.11	FT de la señal de FID.....	27
Figura 2.12	Representación esquemática de la 2DTF.....	27
Figura 2.13	Secuencia 90 FID.....	28
Figura 2.14	Secuencia de espín-eco (SE).....	29
Figura 2.15	Secuencia Inversión Recuperación.....	30
Figura 2.16	Curva inversión-recuperación.....	31
Figura 2.17	Esquema de un equipo básico para medir RM.....	34
Figura 2.18	Aplicación de gradiente dimensional para codificar la frecuencia.....	37
Figura 2.19	Principio de la retroproyección en RMI.....	38
Figura 2.20	Gradiente de selección de corte G_z	40
Figura 2.21	Secuencia simplificada de reconstrucción de una imagen FT bidimensional..	42
Figura 2.22	Esquema del proceso de reconstrucción de una imagen por RMI.....	43
Figura 2.23	Principio de la adquisición por multicortes.....	46
Figura 2.24	Secuencia de reconstrucción Espín-Eco.....	47
Figura 2.25	Secuencia de reconstrucción Inversión-Recuperación.....	47
Figura 2.26	Secuencia de reconstrucción Gradiente-Eco.....	48
Figura 2.27	Valoración de la señal-ruido en una imagen RMI.....	52
Figura 2.28	Configuración de las bobinas de gradiente G_z	59
Figura 2.29	Configuración de las bobinas de gradiente G_x y G_y	59
Figura 2.30	Tipos de antenas de RF.....	60

Capítulo 4

Figura 4.1	Equipo RMI Artoscan Esaote Biomédica®.....	83
Figura 4.2	Sistema magnético del equipo RMI.....	84
Figura 4.3	Bobina de gradiente.....	84
Figura 4.4	Bobinas receptoras y transmisoras de RF.....	84
Figura 4.5	Daño producido en campo por hongo saprofito desconocido.....	86
Figura 4.6	Daño por frío durante el almacenamiento.....	87
Figura 4.7	Daño interno producido por la mosca de la fruta.....	88
Figura 4.8	Podredumbre interna producida por <i>Alternaria citri</i>	88

Figura 4.9	Podredumbre interna producida por <i>Botrytis cinerea</i>	89
Figura 4.10	Podredumbre interna producida por <i>Diplodia natalensis</i>	89
Figura 4.11	Daño producido por helada en campo.....	90
Figura 4.12	Procesamiento digital de las imágenes RMI.....	95
Figura 4.13	Regiones de interés ROI procesadas.....	95
Figura 4.14	Procesamiento de imágenes del ensayo preliminar.....	101
Figura 4.15	Hongos inoculados en fase de micelio.....	106
Figura 4.16	Método de inoculación del micelio.....	107
Figura 4.17	Cristalizadores con los frutos inoculados.....	107
Figura 4.18	Esquema del algoritmo para la detección de daños por hongo saprofito y por frío en melocotón.....	112
Figura 4.19	Estructura de una macro en lenguaje C-script.....	122

Capítulo 5

Figura 5.1	Relación S/R de las imágenes RMI contrastadas en T_1 , T_2 y densidad protónica DP y secuencias que presentaron algún tipo de artefacto.....	133
Figura 5.2	Volumen del voxel de las imágenes RMI originales.....	134
Figura 5.3	Contraste pulpa-fondo y pulpa-hueso obtenido en T_1 , T_2 y en densidad protónica DP con las secuencias ensayadas.....	136
Figura 5.4	Relación S/R para las imágenes del fondo obtenida para las secuencias ensayadas.....	139
Figura 5.5	Histogramas de distribución de niveles de gris para las regiones de pulpa, hueso y daño para el melocotón en el tiempo.....	163
Figura 5.6	Histogramas de distribución de niveles de gris para las regiones de pulpa, hueso y semilla en los melocotones almacenados a 1°C	168
Figura 5.7	Histogramas de distribución de niveles de gris para las regiones de pulpa, hueso y semilla en los melocotones almacenados a -10°C	169
Figura 5.8	Esquema de algoritmo de búsqueda del contorno en imágenes con daño por hongo saprofito y por frío contrastadas en T_1 -plano ecuatorial.....	177
Figura 5.9	Esquema de algoritmo de búsqueda del contorno en imágenes con daño por hongo saprofito y por frío contrastadas en T_1 -plano longitudinal.....	178
Figura 5.10	Esquema de algoritmo de búsqueda del contorno en imágenes con daño por hongo saprofito y por frío contrastadas en T_2 -plano ecuatorial.....	179
Figura 5.11	Esquema del algoritmo de procesamiento para la detección de daños por hongo saprofito y por frío en melocotón para imágenes en T_1 -plano ecuatorial.....	181
Figura 5.12	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 -plano ecuatorial, con daño por hongo saprofito.....	182
Figura 5.13	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 -plano ecuatorial, con daño por frío.....	182
Figura 5.14	Esquema del algoritmo de procesamiento para la detección de daños por hongo saprofito y por frío en melocotón para imágenes en T_1 -plano longitudinal.....	183
Figura 5.15	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 -plano longitudinal con daño por hongo saprofito.....	184
Figura 5.16	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 -plano longitudinal, con daño por frío.....	184

Figura 5.17	Diagrama de flujo del procesamiento de imágenes RMI en T ₂ -plano ecuatorial, de los experimentos de daño por hongo saprofito y por frío.....	185
Figura 5.18	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T ₂ -plano ecuatorial, con daño por hongo saprofito.....	186
Figura 5.19	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T ₂ -plano ecuatorial, con daño por frío.....	186
Figura 5.20	Detección del daño en melocotones afectados por hongo saprofito (color azul) y con deterioro por frío (color violeta).....	187
Figura 5.21	Líneas de perfil de la señal del mesocarpio sin daño y con daño por picadura de <i>C. capitata</i>	189
Figura 5.22	Modelo para la detección de picaduras de <i>C. capitata</i>	190
Figura 5.23	Procesamiento para la obtención del contorno del mesocarpio del melocotón.....	191
Figura 5.24	Procesamiento digital de imagen RMI, para la obtención del contorno del mesocarpio con picadura por <i>C. capiata</i>	192
Figura 5.25	Procesamiento para la obtención del contorno del mesocarpio del melocotón sin la epidermis.....	193
Figura 5.26	Procesamiento para la obtención del contorno del mesocarpio con picadura de <i>C. capitata</i> sin la epidermis.....	193
Figura 5.27	Diagrama de flujo del procesamiento de las imágenes RMI del experimento de daño por <i>Ceratitís capitata</i>	195
Figura 5.28	Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T ₁ -plano longitudinal, con daño por <i>Ceratitís capitata</i>	195
Figura 5.29	Detección del daño por picadura de <i>C. capitata</i> en melocotón.....	196
Figura 5.30	Esquema del algoritmo para la detección de daños en cítricos ocasionados por hongos y por heladas en el campo.....	204
Figura 5.31	Evolución del índice de color de la piel y del contenido de azúcares del zumo en los cítricos inoculados con hongos.....	229
Capítulo 6		
Figura 6.1	Esquema del sistema automático de inspección de fruta basado en RMI.....	237
Figura 6.2	Orientaciones de la fruta respecto a la bobina de RF del equipo RMI.....	238
Figura 6.3	Esquema del procesamiento digital del sistema automático de detección.....	240

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área
A_0	Amplitud inicial de la señal de onda
$A_{(t)}$	Señal de onda en el tiempo
AND	Operador lógico
a^*	Coordenada cromática
\vec{B}_1	Campo magnético oscilante o pulso de radiofrecuencia
b^*	Coordenada cromática
C	Compactación
$C_{i,j}$	Contraste: diferencia de la señal entre dos regiones adyacentes de una imagen
D	Coefficiente de difusión
DE	Desviación típica
d_x, d_y, d_z	Dimensiones del voxel
E_1	Nivel de energía en estado antiparalelo (α)
E_2	Nivel de energía en estado paralelo (β)
f, f'	Datos en el dominio de la frecuencia
FOV	Campo de visión de una imagen, "Field of view"
f_s	Tasa de muestreo para la transformada de Fourier
$f_{(t)}$	Función en el dominio del tiempo
$f_{(w)}$	Función en el dominio de la frecuencia
G	Gradiente dimensional lineal de campo magnético
G_x, G_w, G_f	Gradiente de campo en x ó gradiente de frecuencia ó gradiente de lectura
G_y, G_f	Gradiente de campo en la dirección y ó gradiente de codificación de fase
G_z, G_s	Gradiente de campo en la dirección z ó gradiente de selección de corte
h	Constante de Planck [$6,626 \times 10^{-34} / (2\pi)$ J·s]
I	Número cuántico del espín nuclear
IC	Índice de color
I_TEX	Índice de la textura de la pulpa
I_PARD	Índice del pardeamiento de la pulpa
k	Constante de Boltzmann [$1,3805 \times 10^{-23}$ J/°K] y constante de proporcionalidad en las ecuaciones de señal
L	Longitud
L^*	Luminosidad
m	Número cuántico magnético orbital y número de filas de la matriz de datos de una imagen
\vec{M}	Momento magnético macroscópico
\vec{M}_o	Momento magnético macroscópico en estado de equilibrio
\vec{M}_{xy}	Vector de imantación transversal
\vec{M}_z	Vector de imantación longitudinal
n	Número de columnas de la matriz de datos de una imagen y número cuántico principal
N_d	Número total de imágenes de entrenamiento con daño
N_{ex}	Número de excitaciones
N_T	Número total de imágenes de entrenamiento, con daño y sin daño
N_1	Número de protones en el nivel E_1 (antiparalelo β)
N_2	Número de protones en el nivel E_2 (paralelo α)

P	Perímetro
Pc	Perímetro convexo
R	Rugosidad
\vec{S}	Momento cinético espín del protón
\vec{S}_z	Momento angular orbital del espín
S	Señal
S_i	Intensidad de nivel de gris del píxel i
S_m	Señal media en una zona homogénea de la imagen
S/R	Relación señal-ruido
S/R_{fondo}	Relación señal- ruido para el fondo de la imagen
SUBS	Operador lógico de sustracción
t	Tiempo
t', t''	Datos en el dominio del tiempo
T	Tesla
T_{ad}	Tiempo de adquisición de una imagen de resonancia magnética
TE	Tiempo transcurrido entre dos pulsos ó tiempo eco
T_I	Tiempo de inversión
T_R	Tiempo transcurrido entre dos secuencias elementales ó tiempo de repetición
T₁	Tiempo de relajación longitudinal ó espín-medio
T₂	Tiempo de relajación transversal ó relajación espín-espín
T₂*	Tiempo eficaz de relajación transversal
U_{max} _i	Máximo umbral en la imagen i
U_{medio}	Umbral promedio
U_{min}	Umbral mínimo medio
U_{min} _i	Mínimo umbral en la imagen i
U₁, U₂	Umbrales de segmentación de contornos
V	Volumen del voxel
Xc , Yc	Coordenadas del centroide
#H	Número de huecos
g	Constante de giro magnético del núcleo, para el ^1H [42,58 MHz/T]
dw, Dw	Ancho de la banda de frecuencia
DE	Diferencia de energía entre los niveles E_1 y E_2
Dz	Espesor del plano de corte
q	Ángulo de rotación de \vec{M} alrededor de \vec{B}_0 y ángulo de basculación en la secuencia gradiente eco
$\vec{\mu}$	Momento magnético microscópico del protón
p	Constante = 3,1416
r	Densidad protónica
t_p	Tiempo de duración del pulso electromagnético
n_o	Frecuencia de precesión de un fotón ó frecuencia cíclica [Hz]
f	Ángulo de fase del vector de magnetización transversal
w_o	Frecuencia de Larmor o frecuencia angular [rad·s ⁻¹]
w_r	Frecuencia angular de un pulso electromagnético

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

Alg. AutoUmb.	Algoritmo de autoumbralización o autosegmentación
art	Artefacto
CCD	Dispositivo electrónico de captura digital, "Charge Coupled Device"
CIELab	Sistema de medición del color
CPMG	Secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSS	Concentración de sólidos solubles
Cte	Contraste
DAFD	Detección acertada de fruto dañado
DAFS	Detección acertada de fruto sano
DET	Número total de imágenes utilizadas en la evaluación de un algoritmo
DP	Densidad protónica
DPPF	Daño por frío real en la fruta
Ecuat.	Ecuatorial
ENT	Número total de imágenes usadas para el entrenamiento
FDFD	Falsa detección de fruto dañado
FDFS	Falsa detección de fruto sano
FID	Señal de inducción libre, "Free Induction Decay"
FLASH	Secuencia "Fast Low Angle Shot"
FT	Transformada de Fourier
GE	Secuencia Gradiente Eco
GE STIR	Secuencia eco gradiente con inversión recuperación con corto tiempo de inversión T_1
HR	Humedad Relativa
HSE	Secuencia espín eco con muy corto T_E
I_1	Imagen uno
IR	Secuencia Inversión Recuperación
IVIA	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
Long.	Longitudinal
LPF-TAG	Laboratorio de Propiedades Físicas y Tecnologías Avanzadas en Agroalimentación
LSD	Diferencia mínima significativa, "Least Significant Difference"
ME	Secuencia Multi Eco
n.g.	Nivel de gris
PCT	Empresa "Process Control Technology"
RARE	Secuencia "Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement"
RF	Radiofrecuencia
RM	Resonancia Magnética
RMI	Resonancia Magnética de Imagen ó reconstrucción de imagen por RM
ROI	Región de interés
RX	Rayos X
SE	Secuencia eco espín, "Spin Echo"
Sin. inf.	Sin influencia
STIR	Secuencia inversión recuperación con corto tiempo de inversión T_1
TC	Tomografía computarizada
TME	Secuencia similar a "Fast Spin Eco"
TSE	Secuencia turbo espín eco similar a "fast spin eco"
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
2DTF	Transformada de Fourier en dos dimensiones
3DTF	Transformada de Fourier en tres dimensiones

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

Desde hace unas décadas se investiga en el desarrollo de tecnología que permita examinar la calidad de las frutas y las hortalizas, de una manera rápida, controlada y precisa (Abbott *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Chen y Sun, 1991; Chen 2001; Chen *et al.*, 2002; Sipahioglu y Barringer, 2003; Wang *et al.*, 2003; SINCLAIR, 2003; Allende *et al.*, 2004; Ferry, 2004; Herold *et al.*, 2005). Para ello se aprovecha alguna o varias de las propiedades físicas que estos materiales biológicos exhiben para ser medidas, en muchos casos de forma tan rápida, que permiten la implementación de la tecnología directamente en las líneas de clasificación y destrío de las centrales hortofrutícolas.

La medición de fenómenos como la reflexión, transmisión y absorción de las ondas electromagnéticas en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja cercana, han permitido desarrollar con éxito técnicas no destructivas para evaluar la calidad de muchos productos agroalimentarios. Es por esto que en los últimos 10 años ha crecido el interés por el desarrollo de sistemas automáticos basados en el análisis de imágenes, capaces de reemplazar la inspección visual humana, por lo que se denominan de visión artificial.

La visión artificial obtiene información acerca de la distribución espacial de la intensidad y del contenido espectral de la luz. Para ello se necesita la captura, el procesamiento de la imagen y el reconocimiento de ciertos patrones para distinguir entre colores, formas, etc., que permitan diferenciar ciertos factores de calidad, tales como el tamaño de los individuos, su color, estado de maduración, la presencia o ausencia de defectos, daños e infecciones, etc. Con el avance en hardware y software que ha permitido la disminución de costes de computación, más el desarrollo de nuevos algoritmos, se ha logrado realizar sistemas que son capaces de evaluar la calidad de los productos agrícolas a muy alta velocidad. En la literatura se reportan gran cantidad de estudios relacionados con estos métodos y hoy en día son numerosos los sistemas comerciales de clasificación en línea que han incorporado sistemas de visión y análisis de imágenes para frutas y hortalizas (Chen y Sun, 1991; Abbott *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002, Kondo *et al.*, 2004; Unay and Gosselin, 2004).

Sin embargo, estos sistemas no alcanzan a observar el interior de la fruta a profundidades superiores a unos pocos milímetros por debajo de la epidermis, por lo que resultan poco efectivos para examinar la calidad interna del producto. Por este motivo, se han explorado otras tecnologías, basadas en

radiaciones electromagnéticas de muy corta longitud de onda ($<100\text{nm}$), que son capaces de penetrar en la mayoría de productos agrícolas y producir imágenes de su interior. Algunas técnicas, como las basadas en rayos X y en rayos gamma, han resultado ser, incluso operando en línea, bastante eficientes para inspeccionar el interior de las frutas, pero desafortunadamente con un cierto riesgo para la salud humana, a veces mínimo, pero que produce un enorme rechazo en el consumidor (Chen y Sun, 1991; Abbott *et al.*, 1997).

Otra alternativa de inspección interna de productos agroalimentarios, que se ha ido extendiendo a muchas otras áreas de investigación, es la resonancia magnética (RM). La RM puede definirse, de manera simple, como el fenómeno de interacción entre una onda de radio frecuencia (2 a 200 MHz) y los núcleos atómicos (protones) sometidos a un campo magnético estático externamente aplicado. En los materiales biológicos, como las frutas y los vegetales, el hidrógeno es el principal componente del agua, de los azúcares y de los aceites presentes en estos materiales. Este núcleo, precisamente, produce una de las más fuertes señales de RM, propiedad que ha sido aprovechada por los investigadores para inferir, de manera no destructiva, la composición interior y otros factores de calidad interna que no son apreciables a simple vista, ni detectables por la mayoría de técnicas no destructivas desarrolladas hasta hoy. La principal ventaja que ofrece la RM frente a las técnicas de rayos X y rayos gama, es su inocuidad para el ser humano, para el producto y para el ambiente.

A pesar de que se pueden encontrar resultados de numerosas investigaciones en las que se han obtenido avances, bastante prometedores, con la tecnología de RM aplicada para la determinación de la calidad interna de las frutas y hortalizas, aún existen problemas por resolver para alcanzar el uso comercial de la misma. Los esfuerzos para desarrollar sensores basados en RM, no han permitido todavía alcanzar un desempeño comercial en cuanto a capacidad (velocidad de muestreo). Además, en la gran mayoría de las investigaciones, se han utilizado equipos para aplicaciones médicas, que aplican campos magnéticos de media y alta intensidad, que tienen elevadísimos costos de inversión y de mantenimiento, lo que hace muy difícil su utilización en el sector.

Por el contrario, la tecnología de RM basada en equipos de baja intensidad de campo magnético se convierte en una interesante alternativa, por su menor costo, para el desarrollo de sensores destinados a la inspección interna de la calidad. Sin embargo, en la literatura científica, son relativamente pocos los trabajos publicados que están relacionados con aplicaciones en frutas.

Productos como los frutales de hueso y los cítricos, de relevante importancia económica para el sector agrícola español, se ven afectados por plagas, enfermedades, desordenes fisiológicos y factores ambientales, que deterioran la calidad de la fruta y generan cuantiosas pérdidas económicas al sector. No toda la fruta afectada internamente que llega del campo a las plantas de procesamiento, es identificada por los sistemas actuales de clasificación y de inspección de calidad. Un porcentaje, aunque sea bajo, que pase los controles actuales y se exporte, puede, al llegar a su destino, exhibir síntomas externos del daño y provocar la devolución de lotes completos de fruta, generando graves pérdidas económicas y poniendo en duda la reconocida calidad de los productos agrícolas españoles en el exterior.

En el caso de los melocotones y las nectarinas, el daño por frío es un defecto que se produce durante el almacenamiento, pero no es visible externamente hasta que alcanza un estado muy avanzado de progreso. En la actualidad, para detectarlo, se requiere realizar muestreos destructivos de cientos de frutas, lo que consume mucho tiempo y resulta poco práctico. Las heladas en campo ocasionan un defecto interno en los cítricos que también es difícil de detectar, pues mientras la apariencia externa de la fruta permanece intacta, porciones internas de los gajos quedan secas, dejando la fruta incomedible y sin valor comercial. Muchos hongos de importancia económica, como *Alternaria citri* penetran por vía peduncular en los frutos de los cítricos cuando aún no se han cosechado, y permanecen latentes en la fruta. Determinadas condiciones de almacenamiento favorecen su desarrollo interior, manifestándose la podredumbre cuando la fruta ya ha pasado los controles de calidad. Las picaduras de la mosca del Mediterráneo afectan también la calidad de muchos tipos de fruta, incluidos los frutos de hueso y los cítricos. Sin embargo, los síntomas de este daño no son detectados con frecuencia, lo que ha provocado el rechazo de la fruta en países importadores, con las lamentables repercusiones económicas para los productores.

Por todo lo anterior, la presente tesis doctoral busca aportar nuevos conocimientos en las aplicaciones de las técnicas de RMI para el estudio de la calidad de las frutas y contribuir al desarrollo de sistemas automáticos de detección de defectos basado en imágenes obtenidas por resonancia magnética, con el fin de garantizar la calidad integral de nuestras frutas y hortalizas en el mercado nacional e internacional.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se presenta una exposición de los principios físicos que sustentan y explican la resonancia magnética (RM) y la reconstrucción de imágenes por resonancia magnética (RMI), así como el equipo básico requerido para medir las señales de RM de cualquier muestra biológica. Luego se comentan las principales técnicas que existen para la adquisición de una imagen de RM y los factores que afectan la calidad de la misma. También, se explica la tecnología y el equipamiento que se utiliza actualmente en RMI. Al final del capítulo, el lector encontrará una completa revisión de las principales aplicaciones de la RM y RMI en el sector agroalimentario, destacando principalmente los estudios desarrollados con esta tecnología para examinar la calidad interna de las frutas y los vegetales, además se hace una referencia a los sensores de RM desarrollados y aplicados en productos agrícolas, por los diferentes grupos de investigación que han venido trabajando con esta tecnología en el sector hortofrutícola.

2.1. La Resonancia Magnética RM y el análisis de imágenes de RM

Los antecedentes al desarrollo de la resonancia magnética (RM) y a la reconstrucción de imágenes por resonancia magnética (RMI) se remontan a las primeras investigaciones que se hicieron sobre la naturaleza del átomo, y al posterior desarrollo de la mecánica cuántica y de las propiedades magnéticas que poseen ciertos núcleos como el ^1H ; varias décadas antes de que en 1945 se conociera el primer experimento de RM, publicado de manera simultánea e independiente por los grupos de investigación liderados por Edward Purcell en la Universidad de Harvard y por Felix Bloch en la Universidad de Standford. Más adelante en 1973 y de manera independiente, Paul Lauterbur en Estados Unidos y Peter Mansfield en Inglaterra, propusieron la utilización de gradientes lineales de campo magnético para la obtención de una imagen mediante la localización espacial de la señal de RM. Precisamente a Lauterbur se le atribuyen las primeras imágenes bidimensionales RMI, que fueron reconstruidas a partir de las señales de RM emitidas por los protones de un tallo vegetal, del cadáver de un pavo y de una falange humana (Desgrez *et al.*, 1991; Schrader *et al.*, 1992; Conlan, 2001).

A partir de la década de los años 80, las numerosas investigaciones realizadas en RM permitieron la expansión comercial de esta tecnología, contribuyendo de esta forma al desarrollo de importantes avances científicos en diversas disciplinas del conocimiento.

Los avances alcanzados en los últimos años en RM y RMI no solamente cubren las aplicaciones médicas sino también en otros sectores; como en los procesos de refinado del petróleo (análisis de flujos, combinación y destilación del crudo y derivados), en la ciencia de los materiales (caracterización y análisis de polímeros), en biotecnología (espectrometría y química analítica de células y tejidos, y el análisis de bioreactores), y en aplicaciones agroalimentarias (determinación de características físicas y químicas de carnes, pescados, productos lácteos, jugos, pastas y vinos, frutas y vegetales) (Castiñeira, 1989; Chen y Sun, 1991; Ablett, 1992; Schrader *et al.*, 1992; McCarthy, 1994; Clark *et al.*, 1997; Hammer, 1998; Hills, 1998; Ruan y Chen, 1998; McCarthy y McCarthy, 2000; Ishida *et al.*, 2000; Van As, 2003; Hills y Clark, 2003).

El lector puede remitirse al Anexo A1 en donde encontrará una breve reseña histórica del desarrollo de las tecnologías de RM y RMI.

2.1.1. Principios básicos de la RM

Conceptos físicos del magnetismo nuclear

La tecnología de la RM se basa en los momentos magnéticos que presentan los núcleos atómicos. El núcleo del átomo está constituido por un determinado número de protones y neutrones (la única excepción es el núcleo de hidrógeno que es un solo protón), y tiene un movimiento colectivo complejo de rotación sobre su propio eje (Figura 2.1). Esta rotación le confiere al protón, desde el punto de vista mecánico, un **momento cinético** denominado *espín*, representado por el vector \vec{S} , con la misma dirección de su eje de rotación y magnitud expresada en [rad/s] o en [Hz] y, desde el punto de vista eléctrico, un **momento magnético** representado por el vector de imantación \vec{m} cuya magnitud se expresa en teslas [T]. Similar a una barra de imán, \vec{m} tiene un polo norte y un polo sur (dipolo magnético) (Fullerton, 1982; Desgrez *et al.*, 1991; Kastler *et al.*, 1997; Ruan y Chen, 1998).

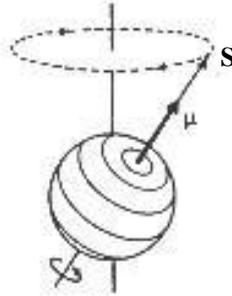


Figura 2.1. Momentos resultantes sobre un protón.

De acuerdo con la mecánica cuántica el espín \vec{S} viene dado por la siguiente ecuación:

$$\vec{S} = \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (2.1)$$

Donde:

\hbar : constante de Planck = $6,626 \times 10^{-34} / (2\pi)$ J·s

I : número cuántico del espín nuclear (adimensional)

El número cuántico I , que es característico de cada isótopo, puede tomar los valores $I=n/2$, donde n es el número cuántico principal que indica la cercanía del protón al núcleo atómico (nivel de energía). Los valores permitidos para este número cuántico son $n = 0,1,2,\dots$. De este modo:

$I=0$, para $n=0$, núcleos con masa y carga atómica pares (por ej. ^{12}C).

$I=\text{entero}$, para $n = \text{número par}$.

$I=\text{semientero}$, para $n = \text{número impar}$ (por ej. el hidrógeno ^1H , con $n=1$, $I=1/2$).

También, de acuerdo con la mecánica cuántica, la dirección del vector \vec{S} , debe estar cuantizada en el espacio, esto significa que deben especificarse los valores de la proyección de \vec{S} en la misma dirección vertical z del sistema de coordenadas cartesianas en el que el campo magnético externo \vec{B}_0 actúa sobre el protón (Figuras 2.2 y 2.3).

El número cuántico magnético orbital m , que es característico de cada nivel de energía en el núcleo, especifica los valores permitidos de la componente z del momento angular orbital mediante la siguiente expresión:

$$\bar{S}_z = m\hbar \quad (2.2)$$

De este modo m puede tomar $2I+1$ orientaciones posibles dependiendo del valor de I . Para el núcleo del hidrógeno con $I=1/2$, este protón presenta dos posibles orientaciones [$2*(1/2)+1 = 2$] (Figura 2.2) que corresponden a dos niveles de energía ($m=\pm 1/2$), por tanto:

$$\bar{S}_z = \pm \frac{1}{2}\hbar \quad (2.3)$$

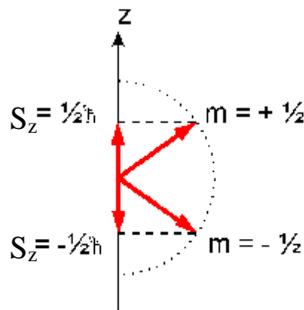


Figura 2.2. Orientaciones posibles de \bar{S} en z para el protón.

El momento magnético \bar{m} resultante es proporcional al momento cinético de rotación \bar{S} mediante la siguiente expresión:

$$\bar{m} = g \bar{S} \quad (2.4)$$

Donde g es la **constante de giro magnético** en [$s^{-1} \cdot T^{-1}$] o en [$MHz \cdot T^{-1}$], esta constante propia de cada núcleo relaciona el momento magnético m , la constante de Plank h y el número de espín I mediante la siguiente expresión:

$$g = \frac{m}{\hbar I} \quad (2.5)$$

Para las dos posibles orientaciones del protón, de las ecuaciones (2.3) y (2.4) obtenemos que su momento magnético \vec{m} , es:

$$\vec{m} = \pm \frac{1}{2} g \hbar \quad (2.6)$$

En RM deben considerarse dos clases de momentos magnéticos; los momentos magnéticos individuales de cada protón (\vec{m}) denominados **momentos microscópicos**, los cuales se estudian con las leyes de la física cuántica, y los **momentos magnéticos macroscópicos** (\vec{M}) asociados a volúmenes de materia (voxels), que se estudian con las leyes clásicas del electromagnetismo (Desgrez *et al.*, 1991; Kastler *et al.*, 1997).

Cada voxel posee un momento magnético \vec{M} que corresponde al sumatorio de todos los momentos individuales \vec{m} de sus protones, esto es:

$$\vec{M} = \sum \vec{m} \quad (2.7)$$

2.1.1.1. Comportamiento del momento magnético

La interacción de los momentos magnéticos \vec{m} y \vec{M} con un campo magnético externo \vec{B}_0 genera tres fenómenos importantes que deben ser considerados de forma separada a escala microscópica (modelo cuántico) y a escala macroscópica (modelo clásico); estos fenómenos son: **la orientación del momento, la energía de interacción y el movimiento de precesión** (Desgrez *et al.*, 1991).

Orientación del momento

En un campo \vec{B}_0 los momentos microscópicos \vec{m} de los distintos protones se orientan según dos posibles ángulos cuyos valores son suplementarios θ ó $(\pi-\theta)$ como se indica en la Figura 2.3-a. Sin embargo los momentos \vec{m} pueden localizarse en una posición cualquiera sobre el cono definido por el ángulo θ (Figura 2.3-b).

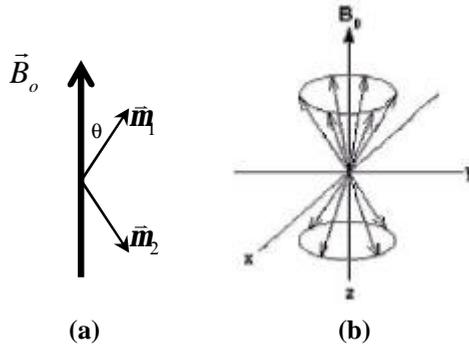


Figura 2.3. Orientación posible de \vec{m} en un campo \vec{B}_o .

En ausencia del campo exterior \vec{B}_o , los diferentes momentos microscópicos están orientados en forma aleatoria en cualquier dirección y su suma es nula ($\sum \vec{m} = 0$), pero en presencia de \vec{B}_o se orientan según uno de los ángulos antes mencionados apareciendo el vector de imantación macroscópica ($\sum \vec{m} = \vec{M}$), paralelo a \vec{B}_o (Figura 2.4) (Desgrez *et al.*, 1991; Kastler *et al.*, 1997).

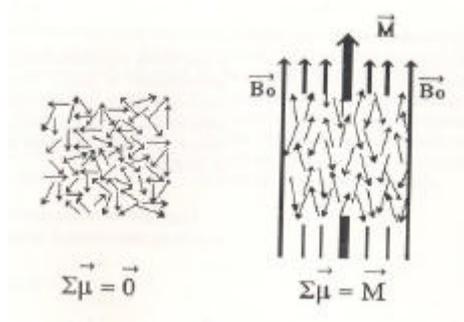


Figura 2.4. Orientación de los momentos \vec{m} y \vec{M} en un campo externo \vec{B}_o .
(Fuente: Desgrez *et al.*, 1991)

Energía de interacción

De acuerdo con lo explicado anteriormente, en el campo magnético \vec{B}_o , los momentos \vec{S} y \vec{m} , solo pueden tener dos orientaciones posibles, **paralela** (mismo sentido de \vec{B}_o) y **antiparalela** (sentido contrario de \vec{B}_o), que corresponden según el modelo cuántico a dos niveles de energía E_1 y E_2 dados por las siguientes ecuaciones:

$$E_1 = -\frac{1}{2}g\hbar B_o \quad (2.8)$$

$$E_2 = +\frac{1}{2}g\hbar B_o \quad (2.9)$$

Donde:

E_1 , E_2 : niveles de energía en estado antiparalelo y paralelo respectivamente [J]. La diferencia de energía ΔE será:

$$\Delta E = g\hbar B_o \quad (2.10)$$

Que es la energía requerida por un fotón de una específica frecuencia para excitar un núcleo y producir la transición entre el estado de baja energía (**paralelo a**) y el estado de alta energía (**antiparalelo b**). La energía de los dos estados puede ser representada según la ecuación (2.10) por el diagrama de nivel de energía (Figura 2.5), deduciéndose que la energía de excitación depende únicamente de la magnitud del campo magnético \vec{B}_o (Fullerton, 1982; Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997; Ruan y Chen, 1998).

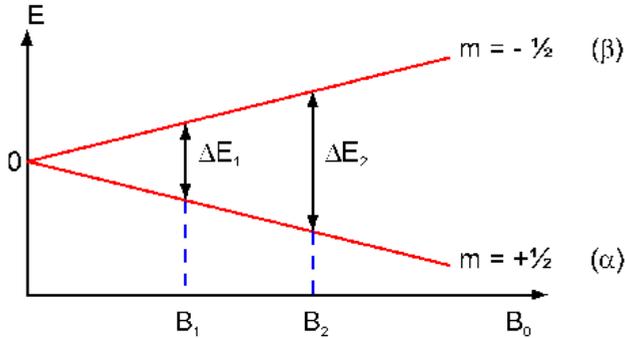


Figura 2.5. Diagrama de nivel de energía de los estados paralelo (a) y antiparalelo (b). (Fuente: Kastler *et al.*, 1997)

Cuando un grupo de N protones son situados en un campo magnético \vec{B}_o , cada espín se alinea en una de las dos posibles orientaciones y el reparto entre los dos niveles de energía se realiza según la **distribución estadística de Boltzmann** (Desgrez *et al.*, 1991; Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997; Ruan y Chen, 1998):

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{g\hbar B_o}{kT}} \quad (2.11)$$

Donde:

N_1 : número de protones en el nivel E_1 (antiparalelo β)

N_2 : número de protones en el nivel E_2 (paralelo α)

k : constante de Boltzmann [$1,3805 \times 10^{-23}$ J/°K]

T : temperatura absoluta [°K]

A temperatura ambiente N_2 es ligeramente superior a N_1 , a medida que la temperatura aumenta el número de protones en ambos niveles tiende a igualarse. La diferencia en el reparto de las dos poblaciones depende también de la intensidad del campo magnético. Por ejemplo, para una muestra dada de núcleos de ^1H en un campo magnético externo de 1,4 T, a temperatura ambiente ($T=20^\circ\text{C}$) presenta una relación de N_1/N_2 de 0,9999382, lo que significa que las dos poblaciones son casi iguales con un ligero exceso de protones en el nivel N_2 de baja energía (aproximadamente de 123 por cada 4.000.000) (Edwards, 2003). Esta escasa diferencia produce la aparición del vector de imantación macroscópica \vec{M} que es aprovechado para generar una señal en la resonancia magnética (Desgrez *et al.*, 1991). La magnitud del vector \vec{M} es proporcional a la diferencia en población entre los dos niveles de energía (Ruan y Chen, 1998).

Movimiento de precesión

De acuerdo con la teoría clásica del electromagnetismo, cualquier núcleo como el protón que sea localizado en un campo \vec{B}_o , intentará autoalinearse con éste dando como resultado un movimiento de “bamboleo”, similar al que experimenta un trompo girando en el suelo por efecto del campo gravitacional, denominado **movimiento de precesión**. En el caso del núcleo, este experimenta una precesión alrededor del campo magnético \vec{B}_o , con una frecuencia, definida por las siguientes ecuaciones:

$$\omega_o = g\mathcal{B}_o \quad (2.12)$$

$$\mathbf{u}_o = \frac{\omega_o}{2p} \quad (2.13)$$

Donde:

ω_o : frecuencia angular [rad·s⁻¹]

ν_o : frecuencia cíclica [Hz]

Esta frecuencia característica se conoce como la **frecuencia de Larmor** y depende de la intensidad del campo externo aplicado \vec{B}_o y de la **constante de giro magnético (g)**, la cual es una propiedad característica de cada núcleo atómico como se mencionó anteriormente. En la Tabla 2.1 se presentan los parámetros de RM para los núcleos de interés biológico.

Tabla 2.1. Parámetros de RM de núcleos de interés biológico.

Núcleo	Protones desapareados	Neutrones desapareados	Espín nuclear, I	g [MHz/T]
¹ H	1	0	1/2	42,58
² H	1	1	1	6,54
¹³ C	0	1	1/2	10,71
³¹ P	0	1	1/2	17,25
²³ Na	0	1	3/2	11,25
¹⁴ N	1	1	1	3,08
¹⁹ F	0	1	1/2	40,08

Fuente: Hornak, 1996

Reemplazando las ecuaciones (2.12) y (2.13) en (2.10), se obtiene:

$$\Delta E = \hbar \mathbf{u}_o \quad (2.14)$$

Que es la expresión en el modelo cuántico para la energía de excitación. Esta ecuación indica la energía que un fotón de onda electromagnética debe tener para excitar un núcleo desde un estado de baja energía a uno de alta energía y está determinada por la frecuencia de Larmor. En un experimento de RM, la frecuencia de un fotón esta en el rango de las radiofrecuencias (10³ a 10⁸ Hz) (Fullerton, 1982; Hornak, 1996).

Es importante conocer con qué rapidez los protones precesan en la unidad de tiempo. Esta frecuencia no es constante y depende del campo

magnético en el cual los protones están situados. A mayor intensidad del campo magnético, mayor velocidad y frecuencia de precesión. Así por ejemplo, para un protón si el campo magnético es de 1 T, ν_0 es de 42,58 MHz mientras que en un campo de 4,7 T, ν_0 será alrededor de 200 MHz.

2.1.1.2. Efecto de una onda electromagnética

Es posible provocar la transición del nivel E_2 al nivel E_1 y modificar la orientación del momento magnético \vec{M} si se aporta una cantidad de energía E mediante una onda ó pulso electromagnético de un campo magnético oscilante \vec{B}_1 aplicado en el plano XY y con una frecuencia ν , tal que:

$$E = \Delta E \quad (2.15)$$

La energía de la onda de radiofrecuencia debe ser, según la ecuación (2.14):

$$E = \hbar \mathbf{n} = \hbar \frac{\omega_r}{2\mathbf{p}} \quad (2.16)$$

Donde: ω_r es la frecuencia angular de la onda [rad/s].

Reemplazando (2.10), (2.12) y (2.16) en (2.15), se obtiene:

$$\omega_r = \omega_0 \quad (2.17)$$

La igualdad anterior indica la condición de resonancia de la mecánica clásica en la cual la frecuencia angular de rotación ω_r de un campo oscilante \vec{B}_1 debe ser igual a la frecuencia de Larmor ω_0 , para producir la transición entre E_2 y E_1 , y modificar la orientación de \vec{M} en una muestra que contiene N protones.

De este modo es posible producir la rotación de \vec{M} alrededor de \vec{B}_0 un ángulo θ en [rad] (Figura 2.6), que puede ser expresado como:

$$\mathbf{q} = g\mathcal{B}_1 t_p \quad (2.18)$$

Donde: τ_p : tiempo de duración del pulso \vec{B}_1 [ms].

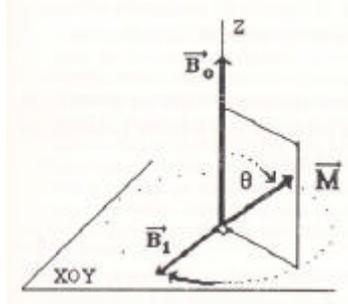


Figura 2.6. Rotación de \vec{M} alrededor de \vec{B}_0 debido a \vec{B}_1 .
(Fuente: Desgrez *et al.*, 1991)

La longitud de onda de radiofrecuencia (RF) aplicada durante muy corto periodo de tiempo permite la transición (transferencia) de los protones del nivel de baja energía (E_2) al de alta energía (E_1). Cuando el pulso de RF y los protones tienen la misma frecuencia ($\omega_r = \omega_0$) se presenta el fenómeno de resonancia, similar al observado en experimentos de acústica y de vibraciones mecánicas. En la condición de resonancia \vec{M} continuará girando alrededor de \vec{B}_0 (eje z) y también precesará alrededor de \vec{B}_1 (eje x). Como consecuencia de esto \vec{M} experimenta un movimiento complejo que desciende describiendo una espiral sobre un casquete esférico (ver Figura 2.7).

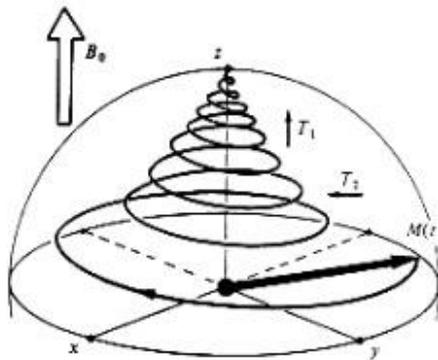


Figura 2.7. Movimiento de precesión de \vec{M} .
(Fuente: Kastler *et al.*, 1997)

Con la aplicación de \vec{B}_1 (onda de RF, impulso ó pulso de excitación), \vec{M} bascula un ángulo θ entre 90° a 180° . Un pulso de 90° , bascula \vec{M} en el

plano XY, y produce un momento magnético \vec{M}_{xy} ($M_z = 0$) y los espín permanecen desfasados ($\sum \vec{m}_{xy} = 0$) (se dice que el sistema se encuentra en estado de saturación). Un pulso de 180° invierte \vec{M} ($\vec{M} = -\vec{M}_z$) y los espín se colocan en fase unos con otros ($\sum \vec{m}_{xy} = \vec{M}_{xy}$) (sistema en estado de inversión). Los momentos \vec{M}_z y \vec{M}_{xy} son denominados vectores de **imantación longitudinal** y **transversal** respectivamente. El movimiento en fase con los protones induce una señal de corriente eléctrica que constituye la señal de Resonancia Magnética (Desgrez *et al.*, 1991; Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997).

2.1.1.3. Fenómenos de relajación

Después que el pulso de RF es retirado, todo el sistema previamente perturbado por este pulso, retorna a su estado de reposo original. Los protones que fueron elevados al nivel alto de energía retornan al nivel de baja energía. Es así como la relajación de los protones ocurre mediante transiciones inversas del nivel de alta energía E_2 al de baja energía E_1 , provocando que el vector de imantación longitudinal \vec{M}_z vuelva a crecer progresivamente, fenómeno conocido como **relajación en T_1** ; y debido a la pérdida de la fase de los espines, la imantación transversal \vec{M}_{xy} disminuye rápidamente, fenómeno conocido como **relajación en T_2** (Figura 2.7).

Para explicar estos fenómenos en los cuales los momentos macroscópicos vuelven espontáneamente a su posición de equilibrio después de una excitación se utilizan las **ecuaciones de Bloch**, grupo de ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento de dichos vectores de magnetización (Desgrez, 1991; Hornak, 1996):

$$d\vec{M}_z = \frac{1}{T_1}(\vec{M}_o - \vec{M}_z)dt \quad (2.19)$$

$$d\vec{M}_{xy} = -\frac{1}{T_2}(\vec{M}_{xy})dt \quad (2.20)$$

Donde \vec{M}_o es el valor de \vec{M} en el estado de equilibrio. Integrando apropiadamente estas ecuaciones se obtienen los componentes de la magnetización \vec{M}_z y \vec{M}_{xy} en función del tiempo.

Relajación Longitudinal T_1

Desde que se conecta el campo magnético en una muestra con los espines nucleares orientados al azar hasta que se establece el equilibrio térmico, la magnetización macroscópica crece exponencialmente a medida que los dipolos magnéticos se alinean en torno al campo externo \vec{B}_o (Figura 2.8). Este fenómeno se acompaña de una emisión de energía para restituir la energía absorbida durante la excitación mediante el intercambio térmico con el medio molecular circundante (Kastler *et al.*, 1997).

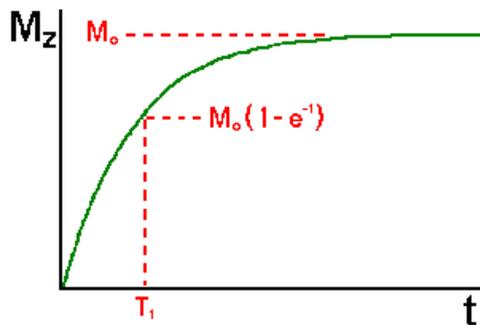


Figura 2.8. Relajación longitudinal T_1 .

La relajación en T_1 conocida también como **relajación espín-medio**, en inglés “spin lattice”, esta representada a partir de la ecuación (2.19) por la siguiente expresión:

$$\vec{M}_{z(t)} = \vec{M}_o \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad (2.21)$$

Donde:

- \vec{M}_o : es el vector de imantación macroscópica tras el pulso de 90°
[J/T]
- t: tiempo [s]
- T_1 : constante de tiempo [s]

La relajación espín-medio o tiempo T_1 que requiere la magnetización longitudinal \vec{M}_z de los protones de una muestra en retornar a su valor original de equilibrio, se conoce así, en alusión a la interacción de cada momento magnético de espín con su entorno (Castiñeira 1989; Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997). Según Ruan y Chen (1998) \vec{M}_z alcanza su equilibrio después de aproximadamente un tiempo de cinco veces el tiempo relajación T_1 .

T_1 es obtenido de la ecuación anterior cuando se alcanza un 63% de la imantación longitudinal original, porcentaje para el cual $t=T_1$. T_1 varía con el estado de la materia, la estructura y composición molecular, la viscosidad y las interacciones magnéticas con el entorno. T_1 es mayor en líquidos que en sólidos y para tejidos biológicos T_1 tiene valores entre 300 y 2000 ms (Kastler *et al.*, 1997).

La intensidad de \vec{B}_0 modifica la frecuencia de resonancia y por tanto a T_1 , debido a que la frecuencia de precesión depende del campo magnético aplicado. A mayor intensidad de \vec{B}_0 los protones precesan más rápido, haciendo que sea más difícil transmitir su energía al medio, por lo que al aumentar \vec{B}_0 aumenta T_1 . En general, T_1 es inversamente proporcional a la densidad de los movimientos moleculares de los protones en la frecuencia de Larmor. La distribución de la frecuencia de rotación depende de la temperatura y la viscosidad para muestras líquidas. De este modo para determinada frecuencia de Larmor el T_1 en una muestra es menor a menor temperatura (Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997; Ruan y Chen, 1998).

Relajación Transversal T_2

Este fenómeno está relacionado con las inhomogeneidades del campo magnético donde la muestra está localizada. Estas son debidas a la variación de la intensidad de campo en diferentes puntos de este espacio que produce diferentes frecuencias de precesión. También cada protón está influenciado por pequeños campos magnéticos no uniformes producidos por los núcleos vecinos, los cuales causan también diferentes velocidades de precesión.

Cuando cesa el pulso de RF los protones se desfazan, \vec{M}_{xy} disminuye y se anula con rapidez. Esta disminución y retorno al equilibrio de la imantación

transversal perpendicular a \vec{B}_0 tiene un comportamiento también de tipo exponencial pero decreciente (Figura 2.9), con una constante de tiempo T_2 denominada tiempo de relajación transversal o **relajación espín-espín**, que se puede representar a partir de la ecuación (2.20) mediante la siguiente expresión:

$$\vec{M}_{xy(t)} = \vec{M}_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (2.22)$$

Donde:

T_2 : constante de tiempo [ms]

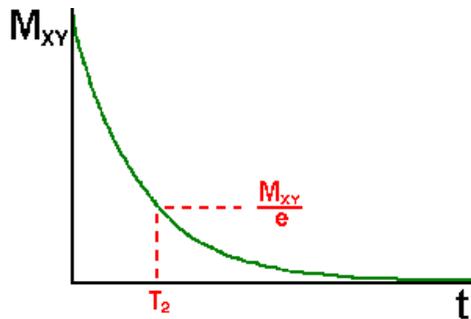


Figura 2.9. Relajación transversal T_2 .

T_2 es definida en la ecuación anterior cuando la magnetización transversal \vec{M}_{xy} disminuye el 37% de su valor original, valor para el cual $t=T_2$. (Kastler *et al.*, 1997).

T_2 es grande cuando el campo magnético es muy homogéneo dentro del material, pues los protones se mueven en fase gran tiempo, y T_2 es pequeño cuando las diferencias en los campos magnéticos locales son notables, causando diferencias importantes en las frecuencias de precesión que hacen que los protones cambien de fase más rápido. Esto es particularmente notorio en sólidos, donde las diferencias de viscosidad, cristalinidad y campo magnético local destruyen la precesión coherente.

Para Ruan y Chen (1998), a diferencia de la relajación espín-medio, la relajación espín-espín es un proceso adiabático y la redistribución de energía entre los espín no cambia el número de núcleos en el nivel de energía más alto.

T_2 también varía con la estructura molecular y es mayor en líquidos que en sólidos o en tejidos constituidos por grandes moléculas. En los tejidos biológicos T_2 varia entre 50 y 150 ms. Dependiendo del tipo de material T_2 es igual ó aproximadamente 10 veces menor que T_1 y ambos procesos de relajación ocurren simultáneamente (Castiñeira, 1989; Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997).

Relajación eficaz T_{2^*}

La combinación de los dos factores que contribuyen a la disminución de la magnetización transversal, interacciones moleculares y variaciones en \vec{B}_o , son expresados en una constante de tiempo denominada **tiempo eficaz de relajación transversal T_{2^*}** . El comportamiento de magnetización transversal tras el pulso de RF puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$\vec{M}_{xy(t)} = \vec{M}_o e^{-\frac{t}{T_{2^*}}} \quad (2.23)$$

En la que \vec{M}_{xy} decae en un factor que depende de T_{2^*} , el cual incluye T_2 , la inhomogeneidad del campo y un coeficiente de difusión D. T_{2^*} se puede relacionar con estas variables mediante la siguiente expresión:

$$\frac{1}{T_{2^*}} = \frac{1}{T_2} + \frac{gB_o}{2} + \frac{g^2 G^2 D^2 t^3}{3} \quad (2.24)$$

Donde:

G: es el gradiente del campo magnético [T/m]

D: coeficiente de difusión del tejido [m/s]

t: tiempo de aplicación del campo [s]

Los tiempos de relajación están relacionados con la anchura de las correspondientes bandas en el espectro de frecuencias debido al principio de incertidumbre de Heisenberg, por lo cual:

$$T_{2^*} \leq T_2 \leq T_1 \quad (2.25)$$

2.1.1.4. Medida de la señal de inducción libre FID

Durante la relajación \vec{M}_{xy} describe un movimiento en forma de espiral (Figura 2.7) que genera una señal de onda de RF que desaparece con el tiempo, denominada señal de inducción libre FID (en inglés “Free Induction Decay”). La técnica clásica para captar esta señal emplea una bobina, denominada antena ó sonda receptora, en cuyos bornes la rotación del momento magnético transversal hace aparecer una diferencia de potencial de igual frecuencia que la precesión, transformando la onda de RF en una señal eléctrica. Esta señal es máxima, cuando el eje de la bobina esta localizado en el plano XY y es perpendicular al eje de rotación de \vec{M}_{xy} . La señal de FID tiene la forma de una onda sinusoidal cuya amplitud decrece en el tiempo de manera exponencial y que puede ser representada matemáticamente con la siguiente expresión (Fullerton, 1982; Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997):

$$A_{(t)} = A_o e^{-\frac{t}{T_1}} \text{sen}(\omega_o t) \quad (2.26)$$

Donde:

- $A_{(t)}$: señal de FID [V]
- A_o : amplitud inicial [V]
- ω_o : frecuencia angular de resonancia [rad/s]
- t: tiempo [s]

La transformada de Fourier aplicada a la FID

La señal de inducción libre FID que es obtenida en el dominio del tiempo $A_{(t)}$ requiere ser convertida al dominio de la frecuencia $A_{(\omega)}$. La transformada de Fourier (FT) es una operación matemática que permite convertir funciones en el dominio del tiempo al dominio de la frecuencia y viceversa. Esta herramienta permite extraer las diferentes frecuencias individuales de una señal compuesta de múltiples frecuencias. La FT es definida por la integral:

$$f_{(\omega)} = \int_{-\infty}^{+\infty} f_{(t)} e^{-i\omega t} dt = \int_{-\infty}^{+\infty} f_{(t)} [\cos(\omega t) - i \text{sen}(\omega t)] dt \quad (2.27)$$

Donde $f(t)$ y $f(\omega)$ son respectivamente las funciones en el dominio del tiempo y en el dominio de la frecuencia. FT esta constituida por una componente real y otra imaginaria. En RM se utilizan entre otras las funciones Fourier pares (Figura 2.10), cuya forma en el dominio de la frecuencia y su correspondiente en el dominio del tiempo son conocidas (Hornak, 1996).

Cuando se aplica la FT a la señal de inducción libre FID se obtiene como resultado un pico de la señal en la frecuencia ω_0 (Figura 2.11). El ancho de la banda de frecuencia $\Delta\omega$, alrededor de la abscisa ω_0 en la mitad de la altura pico ($f(\omega_0)/2$), según la ecuación de Lorentzian, es:

$$\Delta\omega = \frac{2}{T_2} \quad (2.28)$$

Expresión que permite obtener el tiempo de relajación T_2 a partir de la FT utilizando una función par del tipo $f(t) = e^{-at}$ como la mostrada en la parte inferior izquierda de la Figura 2.10.

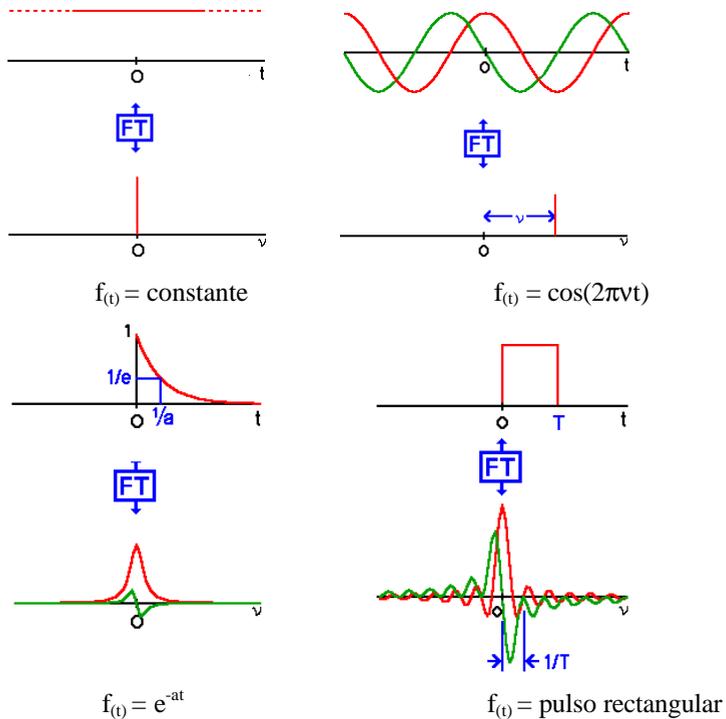


Figura 2.10. Funciones Fourier pares de uso común en RM (Fuente: Hornak, 1996).

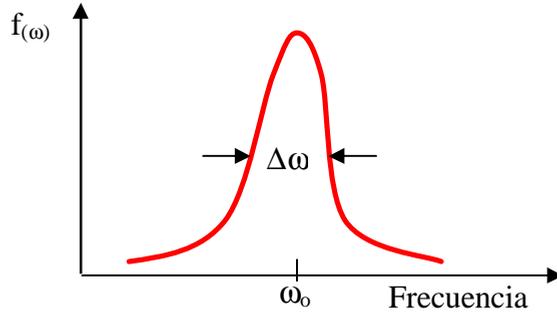


Figura 2.11. FT de la señal de FID.

En realidad, las señales de FID que se requieren procesar no son continuas, sino que son señales muestreadas a intervalos de tiempo constante presentando valores discretos la amplitud de la señal, por tanto se requiere aplicar una tasa de muestreo f_s para tomar la FT a una serie de funciones que varían su intensidad en el tiempo (Hornak, 1996).

La FT puede ser aplicada a una matriz bidimensional de datos y se conoce como la transformada de Fourier en dos dimensiones (2DTF). Esta transformación es muy importante, como se verá más adelante, para la codificación de las señales que permiten la generación de las imágenes de RM.

Hornak (1996) ilustra claramente con los siguientes esquemas la 2DTF. Para la matriz bidimensional de datos con dimensiones t' y t'' (Figura 2.12-a) al aplicar la 2DTF, un primer grupo de TF se aplican a t' , generando una matriz de f' por t'' datos (Figura 2.12-b). Un segundo grupo de TF se aplican en la dimensión t'' para producir la matriz de datos f'' por f' (Figura 2.12-c).

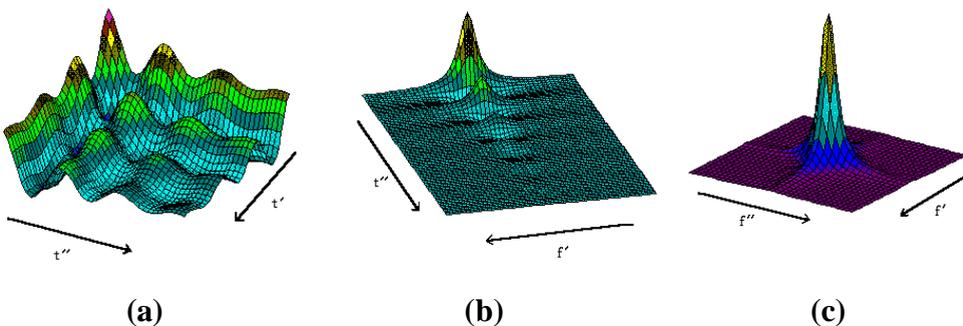


Figura 2.12. Representación esquemática de la 2DTF. (Fuente: Hornak, 1996).

Los datos registrados en RM son equivalentes a las dimensiones t' y t'' , los cuales son procesados mediante la 2DTF para generar imágenes de RM.

2.1.1.5. Secuencias base para la determinación de los tiempos de relajación

Las técnicas de resonancia magnética aprovechan las diferencias en los tiempos de relajación que presentan los diferentes tejidos biológicos para distinguirlos bien sea mediante espectros o mediante imágenes, utilizando procedimientos específicos en cada caso que más adelante serán tratados. En todos los casos las técnicas de adquisición están basadas en secuencias que combinan la excitación y emisión de pulsos de RF, que son utilizados para localizar espacialmente (mapeo) los núcleos en los tejidos.

Secuencia 90° FID

Un grupo de pulsos de RF aplicados a una muestra producen una específica forma de señal de RM y reciben el nombre de secuencia. En la secuencia 90° FID un pulso de RF se aplica y se mide la señal de FID en el tiempo (Figura 2.13). Cuando esta secuencia es repetida la amplitud de la señal (S), después de aplicarle la FT, depende de T_1 y del tiempo utilizado entre las repeticiones de los pulsos, denominado **tiempo de repetición (T_R)** de la secuencia.

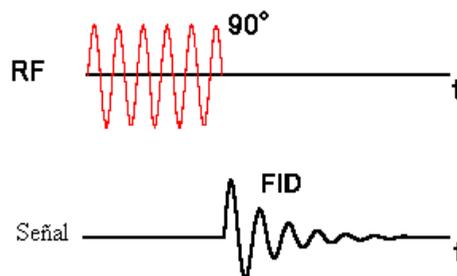


Figura 2.13. Secuencia 90 FID. (Fuente: Hornak, 1996).

Secuencia espín-eco (SE)

Esta secuencia comprende la excitación mediante la emisión de un pulso de RF de 90° para bascular el vector de imantación \vec{M}_z en el plano transversal XY, desfasando los protones y un pulso de RF de 180° para invertir \vec{M}_z en dirección opuesta de \vec{B}_0 (refase de los protones). El doble de tiempo transcurrido entre estos dos pulsos se conoce como **tiempo de eco (T_E)** [ms]. Al cabo del T_E los espines vuelven a estar casi alineados (en fase) y \vec{M}_{xy} vuelve a ser máximo generando una señal denominada eco de espín (Eco 1 en la Figura 2.14). Esta secuencia es conocida como la **secuencia eco de espín** o **espín-eco (SE)**.

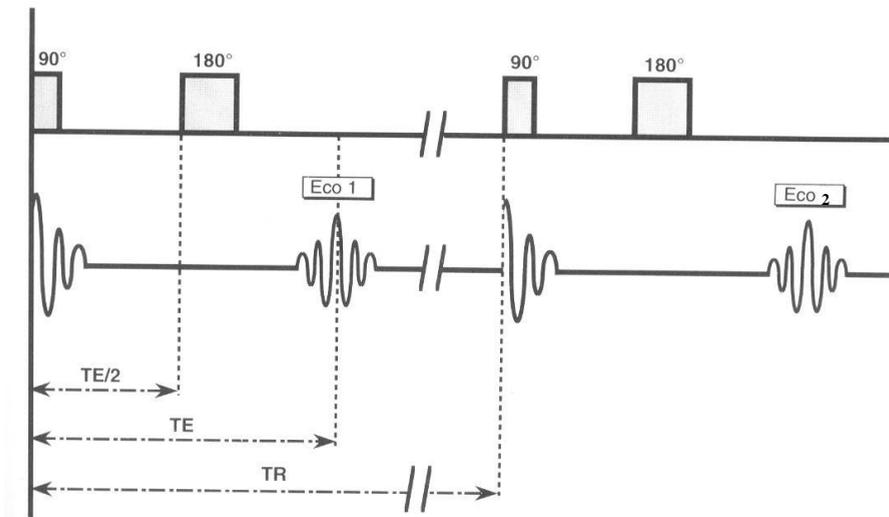


Figura 2.14. Secuencia de espín-eco (SE) (Fuente: Kastler *et al.*, 1997).

La secuencia SE puede aplicarse repetidamente para generar las señales que permiten reconstruir la imagen de un tejido. El tiempo que transcurre entre dos secuencias elementales (es decir entre dos pulsos de 90°) es el tiempo que se tarda en obtener la señal correspondiente a una línea de la imagen y es denominado también tiempo de repetición (T_R). Este tiempo T_R corresponde igualmente al tiempo de crecimiento de la imantación longitudinal. Con cada T_R se consigue una línea de matriz de la imagen.

Durante cada uno de los ciclos elementales mostrados en la Figura 2.14, la imantación transversal \vec{M}_{xy} disminuye en T_2 mientras que la imantación longitudinal \vec{M}_z crece en T_1 hasta un determinado nivel de señal en función de T_R y T_1 . Ambas imantaciones se hallan relacionadas entre si por pulsos de 90° . El tiempo T_R determina el nivel de crecimiento de \vec{M}_{xy} al final de cada ciclo y con ello la señal disponible.

Secuencia Inversión recuperación (IR)

En esta secuencia primero se aplica un pulso de RF de 180° para rotar el vector \vec{M}_z en dirección de $-z$, la magnetización experimenta una relajación espín-medio y retorna hacia su posición de equilibrio en la dirección $+z$. Antes de alcanzar el equilibrio, en un tiempo $t = T_I$, denominado **tiempo de inversión**, un pulso de 90° es aplicado para rotar la imantación longitudinal en el plano XY alrededor del eje z para producir el desfase y generar la señal de FID (Fullerton, 1982; Desgrez *et al.*, 1991; Hornak, 1996) (Figura 2.15).

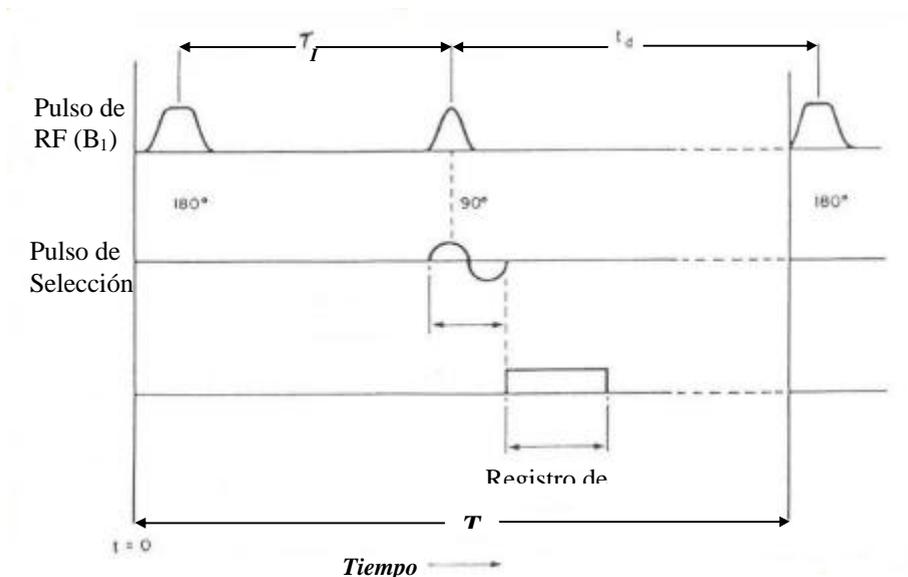


Figura 2.15. Secuencia Inversión Recuperación.
(Adaptado de Fullerton, 1982)

2.1.1.6. Determinación de los tiempos de relajación

Según Ruan y Chen (1998), la determinación de T_1 y T_2 debe ser realizada mediante la aplicación de varias secuencias de pulsos. Las señales se registran después de que uno o más pulsos son aplicados a los protones y la duración de cada paso durante la secuencia de pulsos es de gran importancia para la correcta adquisición, análisis y explicación de los datos obtenidos.

Determinación de T_1

Debido a que la magnetización en dirección del eje z es difícil de detectar, T_1 no se puede medir con un solo pulso de RF de 90° . La secuencia más utilizada es la de inversión recuperación IR previamente descrita, en la cual la relación entre T_1 y el tiempo τ entre el pulso de 180° y el pulso de 90° es expresada:

$$M_z(t) = M_o \left(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad (2.29)$$

La curva de recuperación de la inversión de \vec{M}_z obtenida de esta ecuación es mostrada en la Figura 2.16.

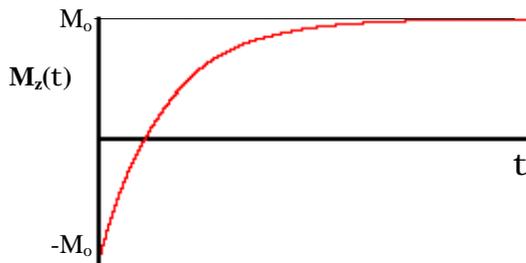


Figura 2.16. Curva inversión-recuperación.

La amplitud de corriente máxima inducida en la bobina detectora del equipo de resonancia es registrada tras cada pulso como valor de M_o . Se hace una representación lineal de la curva exponencial (amplitud de la señal vs tiempo) obteniéndose T_1 como el inverso de la pendiente de esta línea. Por tanto T_1 puede ser determinado corriendo varias secuencias de 180° - τ - 90° , variando τ , denominado también en la literatura el tiempo de inversión T_I (la señal es nula, $S=0$, para $T_I \approx 0,69T_1$).

Otra secuencia utilizada para determinar T_1 es la denominada saturación-recuperación o método $90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$, en la cual un pulso de 90° es utilizado en vez del pulso de 180° de la secuencia IR. Aquí un primer pulso de 90° bascula \vec{M}_z al plano XY seguido de otro pulso de 90° después de un tiempo de retardo τ . T_1 es obtenido de la ecuación (2.29) sustituyendo el factor 2 por 1, debido a que la imantación es rotada solo la mitad (plano XY). Según Ruan y Chen (1998) esta secuencia requiere menos tiempo de adquisición pero se obtiene T_1 con menor precisión comparada con la secuencia IR. Freeman y Hill, pioneros de este método, citados por Castiñeira (1989) también advierten el uso de esta secuencia solo a muestras con $T_1 \gg T_2$ (caso de fases sólidas), debido a la presencia de magnetización transversal remanente en la dirección del eje y que afecta la señal verdadera de eco espín.

Determinación de T_2

La relajación transversal puede ser determinada tras la aplicación de un único pulso de 90° . La caída de la señal FID puede ser registrada por una bobina detectora localizada en el plano XY. T_2 es obtenido directamente a partir de la ecuación (2.22) o la Figura 2.9, o puede obtenerse indirectamente aplicando la FT a la señal de FID y despejando T_2 en la ecuación (2.28) en función del ancho de la banda de frecuencia $\Delta\omega$. Este método utilizando la secuencia 90° FID solo es aplicable cuando los términos que involucran la difusión y la inhomogeneidad del campo en la ecuación (2.24) son despreciables (Ruan y Chen, 1998). Según Castiñeira (1989), este método resulta ideal cuando coexisten una fase sólida y otra líquida del mismo compuesto y núcleo.

Otro método empleado cuando interesa reducir el efecto de la inhomogeneidad del campo externo o cuando en la muestra coexisten diversos compuestos líquidos, es la secuencia **Espín Eco (SE)** ya mencionada. El principal inconveniente en la determinación de T_2 mediante esta secuencia es el limitado rango de aplicabilidad debido al efecto molecular de difusión, dado que la reorientación exacta de todos los momentos magnéticos depende de los núcleos sobrantes en el campo magnético durante el tiempo de eco T_E . Si la difusión causa que los núcleos se muevan de una parte de un campo inhomogéneo a otro, la amplitud de la señal de eco es reducida afectando T_2 (Ruan y Chen, 1998).

Una expresión para la amplitud de la señal de eco en esta secuencia es:

$$A_{(TE)} = A_o e^{\left[\frac{T_E}{T_2} - \frac{2g^2 G^2 D^2 t^3}{3} \right]} \quad (2.30)$$

Donde: A_o es amplitud del eco extrapolada a $T_E = 0$.

Carr y Purcell, citados por Castiñeira (1989) y por Ruan y Chen (1998), propusieron una variación a la secuencia SE, reduciendo el efecto de la difusión, mediante el uso de un pulso de 90° en el tiempo $t=0$ seguido por un tren de pulsos de 180° en dirección del eje x en los tiempos $T_E, 3T_E, 5T_E, \dots$, que reorientan los espines individuales produciendo ecos en los tiempos $2T_E, 4T_E, 6T_E, \dots$. Las ventajas del método se deben a que el tren de ecos produce una exponencial de eco de la cual se puede obtener T_2 sin errores de inhomogeneidad en B_1 , pudiéndose acortar el intervalo de pulsos (T_E) para evitar el efecto de la difusión (Castiñeira, 1989). Sin embargo, Ruan y Chen (1998), mencionan que la imprecisión en la anchura de los pulsos puede causar algunos errores acumulativos en la magnitud de la señal de SE.

La secuencia de pulsos de **Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)** fue propuesta para eliminar esos errores y es el método más común para determinar T_2 . Utiliza los mismos pulsos de secuencia de 180° , pero aplicados a lo largo del eje $+y$, con lo cual todos los ecos obtenidos son positivos. La curva envolvente de las múltiples amplitudes de eco reflejan la relajación transversal a partir de la cual T_2 puede ser medido. Para Castiñeira (1989), la técnica evita problemas de inexactitud en la duración del pulso y en la homogeneidad de su campo, mientras que para Ruan y Chen (1998) el inconveniente de este método es que toma largo tiempo y no es apto para detectar espines que se relajan tan rápido que su señal cesa antes de que la secuencia CPMG comience la adquisición.

Según el tipo de estudio que se realice, es muy importante hacer una adecuada selección de la secuencia de pulsos, pues esta determinará la señal que se puede obtener de un tejido.

2.1.2. Equipo básico para medir RM

Los componentes básicos necesarios para la medición de RM a una determinada muestra son (Figura 2.17): un **imán** para producir el campo magnético; un **transmisor** de RF que suministra una señal según los núcleos seleccionados en la muestra y según el campo magnético externo; un **receptor** que detecta la señal generada por el movimiento de precesión de la imantación de los espines en la muestra y envía la señal FID a un **procesador** en un sistema integrado también por un secuenciador (programador de pulsos), sistema de adquisición de datos, procesador de señal y un visualizador. Este sistema puede ser desde un relativamente simple sistema electrónico contador y conmutador de tiempo y un osciloscopio para visualizar la señal de FID, hasta un completo y sofisticado espectrómetro computerizado con programador de pulsos y secuencias, que incluye un sistema de adquisición de datos con convertidor de señal análogo-digital, un procesador de imágenes, una pantalla de visualización y una impresora (Fullerton, 1982, Ruan y Chen, 1998).

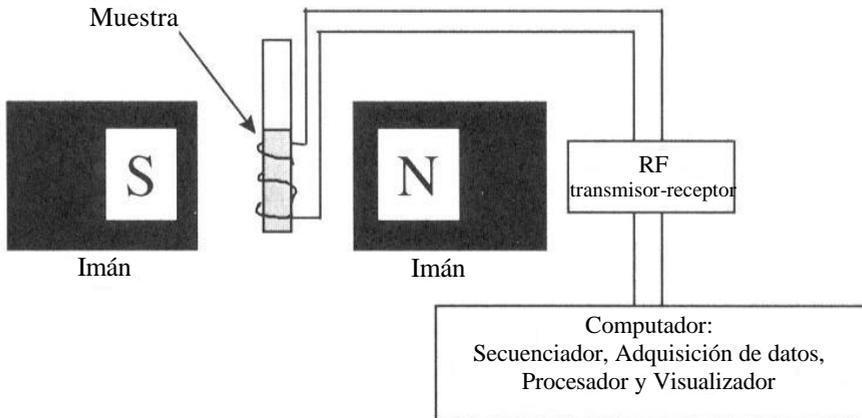


Figura 2.17. Esquema de un en equipo básico para medir RM.
(Adaptado de Ruan y Chen, 1998)

Dependiendo del área de aplicación técnica, de la precisión requerida para evaluar T_1 y T_2 , del requerimiento de identificación de compuestos por movilidad química a alta frecuencia, del tamaño y composición de la muestra y de otros aspectos técnicos; los equipos de RM varían en tamaño, potencia, intensidad de campo magnético (resolución) y complejidad de sus componentes físicos, electrónicos y de programación, así como en su costo.

Más adelante, en el apartado referente a equipos y tecnología en RM, se ampliará con más detalle las características de cada uno de los sistemas básicos en los equipos de RM.

2.1.3. Análisis de imágenes obtenidas por resonancia magnética RMI

Con los principios básicos de la RM desarrollados en los apartados anteriores se ha explicado como los protones presentes en una muestra pueden en conjunto emitir una señal de RF y como esta puede ser medida; sin embargo, la información contenida en esta señal requiere ser localizada espacialmente dentro de la muestra para facilitar su interpretación y análisis. Es esto precisamente lo que hace la tecnología de la reconstrucción de imágenes o **análisis de imágenes por resonancia magnética (RMI)** como complemento de la tecnología de RM.

Desde 1973 cuando Paul Lauterbur obtuvo la primera imagen por resonancia magnética hasta nuestros días, las técnicas de RMI han ido desarrollándose hasta el punto de obtener cada vez más imágenes macroscópicas con alta resolución y con menor tiempo, incluso imágenes microscópicas que compiten con tecnologías como la microscopia electrónica para el análisis de tejidos y células, siendo esta última un procedimiento destructivo. En RMI, además de la densidad protónica, propiedades de la RM como los tiempos de relajación T_1 y T_2 son utilizados como agentes de contraste para la reconstrucción de las imágenes. Al estar T_1 y T_2 relacionados con la movilidad protónica, cualquier variación en la estructura física, en las características químicas y en las condiciones físicas de la muestra, como la temperatura, influirán en la movilidad protónica causando contraste en una imagen obtenida por RM (Ruan y Chen, 1998).

2.1.3.1. Codificación espacial de la señal y reconstrucción de la imagen

El principio detrás de toda reconstrucción de imagen por RM es la ecuación de Larmor $\omega = \gamma B_0$, que expresa que la frecuencia de resonancia de un espín ω es proporcional al campo magnético \vec{B}_0 al que esta sometido.

Si se asume por ejemplo que determinada muestra de tejido contiene tres diferentes regiones con determinada densidad de espines y esta muestra es

sometida a un campo magnético \vec{B}_0 , el espectro de RM después de aplicar la FT presentará un solo pico y una sola frecuencia de resonancia (Figura 2.18-a).

Si un gradiente dimensional lineal de campo magnético G (variación del campo magnético respecto a determinada dirección), es superpuesto al campo \vec{B}_0 , las regiones de espines en diferentes posiciones en la dirección horizontal de la Figura 2.18-b, estarán sometidas a diferentes intensidades de campo $\vec{B}_0 + G$ y, por tanto, presentarán un espectro de RM con más de una señal cuya amplitud es función de la densidad de los espines, es decir, del número de espines en un plano perpendicular al gradiente G (Hornak, 1996; Ruan y Chen 1998).

Este procedimiento causa que la frecuencia de resonancia sea proporcional a la posición espacial de los espines, esto es:

$$\omega = \gamma(B_0 + xG_x) = \omega_0 + \gamma xG_x \quad (2.31)$$

En esto consiste la codificación en la frecuencia, ya que la posición en la dirección x de las regiones de espín puede ser determinada a partir de las frecuencias ω , ω_0 y del gradiente de campo G_x :

$$x = \frac{\omega - \omega_0}{\gamma G_x} \quad (2.32)$$

Donde:

x : posición del espín [mm]

ω , ω_0 : frecuencias de resonancia obtenidas a partir de la señales de FID [MHz]

G_x : gradiente de campo en la dirección x [$T \cdot mm^{-1}$]

γ : Constante de giro magnético [MHz $\cdot T^{-1}$]

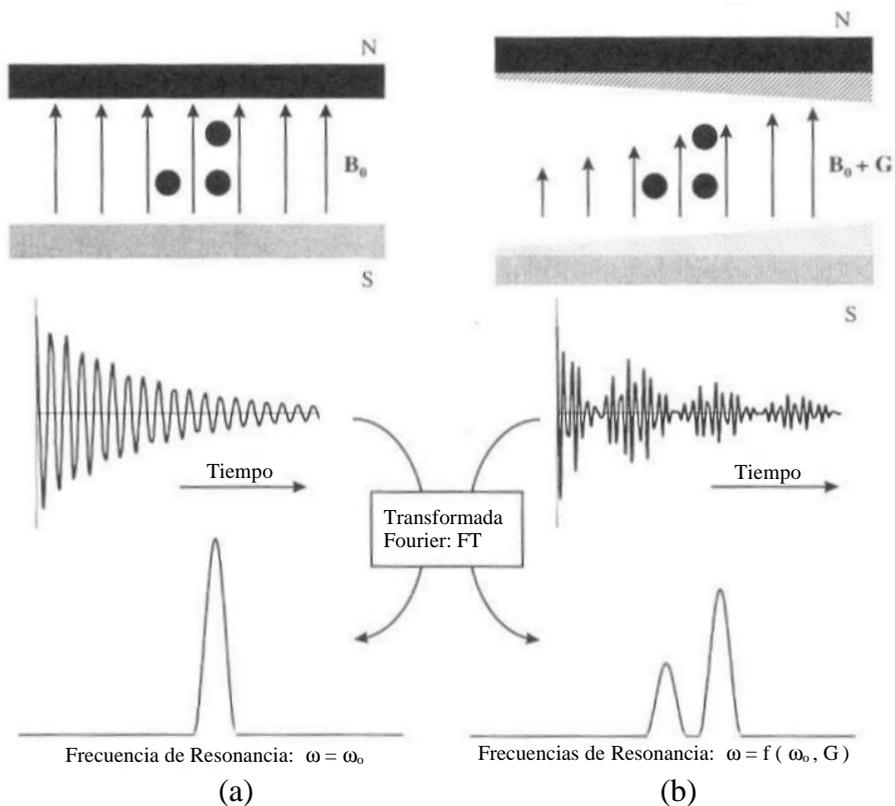


Figura 2.18. Aplicación de gradiente dimensional para codificar la frecuencia. (Adaptado de Ruan y Chen, 1998)

Reconstrucción de imágenes por retroproyección

La retroproyección fue uno de los primeros métodos utilizados en RMI. En esta técnica, a la muestra situada en el campo magnético se le aplica un gradiente dimensional en diferentes ángulos en un arco comprendido entre 180° y 359° y se registra el espectro para cada ángulo (Figura 2.19-a). Una vez un grupo de datos son registrados, estos son retroproyectados en el espacio utilizando un programa de computador para producir una imagen de la sección transversal de la muestra (Figura 2.19-b).

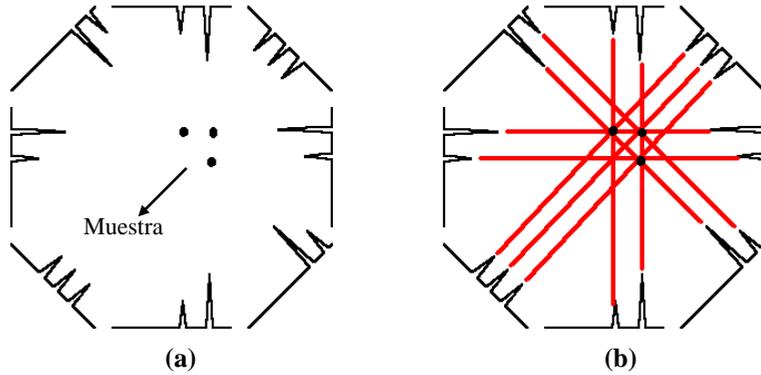


Figura 2.19. Principio de la retroproyección en RMI. (adaptado de Hornak, 1996)

La retroproyección solo permite ilustrar en forma didáctica el proceso de reconstrucción, pues la actual tecnología en RMI utiliza las técnicas de reconstrucción mediante aplicación de la 2DTF para la generación de imágenes.

Reconstrucción de imágenes mediante la FT

Los gradientes lineales de campo pueden ser aplicados también en las direcciones y y z , son denominados G_y y G_z , respectivamente y, de manera similar, la relación entre la frecuencia y la posición espacial con la aplicación de estos gradientes puede expresarse con las siguientes ecuaciones:

$$w = g(B_0 + yG_y) \quad (2.33)$$

$$w = g(B_0 + zG_z) \quad (2.34)$$

Todos los gradientes son creados por unas bobinas denominadas bobinas de gradiente y son superpuestos al campo magnético principal \vec{B}_0 , permitiendo el incremento del campo en $\vec{B}_0 + G_i$ según la dirección i en que sea aplicado el gradiente G .

En la reconstrucción de imágenes mediante la FT, se requiere información de amplitud y fase para codificar espacialmente la señal. La información de amplitud denominada también codificación de la frecuencia es obtenida mediante la aplicación del gradiente G_x denominado también

gradiente de frecuencia o gradiente de lectura (G_w ó G_f). La codificación de la fase es obtenida mediante la aplicación de un gradiente G_y denominado **gradiente de codificación de fase (G_f).** El G_ϕ utilizado para impartir un específico ángulo de fase ϕ al vector de magnetización transversal \vec{M}_{xy} , inicia en un valor de cero y se va incrementando en una serie de cortos y sucesivos pasos. El ángulo de fase ϕ esta dado por la siguiente expresión:

$$f = g_y \int_0^t G_y(t) dt \quad (2.35)$$

Donde t es el tiempo de aplicación del gradiente. Para una posición y dada, ϕ rotará un ángulo $\phi = -\gamma G_y t$ que es determinado durante la reconstrucción.

Los gradientes G_x y G_y [$T \cdot mm^{-1}$] son aplicados en forma sucesiva, G_y es aplicado perpendicular a G_x durante un tiempo t y hace girar los espines durante el mismo tiempo t pero a diferentes velocidades $\omega = -\gamma G_y y$ en función de la posición y a lo largo de este eje, confiriéndoles una fase ϕ representativa de posición en la dirección del eje y .

De este modo el registro efectuado en presencia de G_x permite obtener una señal compuesta por una suma de señales elementales cuya frecuencia ω codifica la posición de los espines en dirección x y cuyo ángulo de fase ϕ codifica la posición de los espines en dirección y .

Los datos adquiridos después de suprimir el gradiente G_x contienen información codificada de ω y de ϕ ; el número de datos n son los puntos de muestreo del sistema, al incrementar G_y y repetir el procedimiento m veces, se tendrá una matriz de datos de m filas por n columnas. Mediante la 2DFT, en forma similar al procedimiento explicado en el apartado 2.1.1.4, se puede obtener a partir de esta matriz una imagen de dimensiones $m \times n$.

Para la obtención de una imagen de RM se debe primero seleccionar un plano de corte en el interior de un volumen de la muestra con determinado espesor, denominado simplemente **corte** o “slice”. La selección del corte se obtiene por aplicación de un gradiente lineal de campo, llamado **gradiente de selección de corte G_z** (denominado también G_s) [$T \cdot mm$], durante el periodo

de tiempo que el pulso de RF tarda. Un pulso de 90° aplicado conjuntamente con G_z rotarán, en este caso al plano XY, los espines localizados en el plano de corte. Los espines localizados arriba y debajo de este plano no son afectados por el pulso de RF (Figura 2.20).

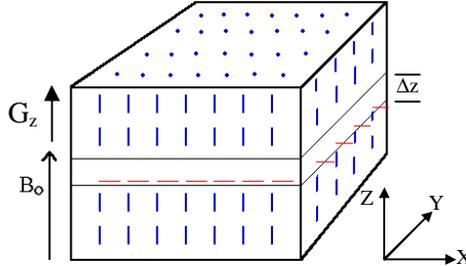


Figura 2.20. Gradiente de selección de corte G_z . (Adaptado de Hornak, 1996)

En ausencia del gradiente todos los espines situados en el volumen mostrado en la Figura 2.20, precesarán a la frecuencia de Larmor ($\omega = \gamma B_0$), pero al sobreponer el gradiente lineal G_z se confiere únicamente a los protones presentes en el plano de corte perpendicular a la dirección de G_z , la frecuencia de resonancia correspondiente a la frecuencia $w = w_0 + dw$ contenida en el pulso de 90° , donde dw es la anchura de la banda de frecuencia del pulso. Este pulso asociado a un gradiente para localizar su acción en un corte determinado es conocido también como pulso selectivo.

El espesor del plano de corte Dz [mm] es determinado a partir de la ecuación (2.34) como:

$$\Delta z = \frac{dw}{gG_z} \quad (2.36)$$

Se deduce que Δz es directamente proporcional a la amplitud de la banda de frecuencia dw del pulso selectivo e inversamente proporcional a la intensidad del gradiente G_z . La orientación del corte puede ser en cualquier dirección, inclusive en un plano oblicuo, y puede lograrse mediante la combinación de dos ó tres gradientes de selección de diferente intensidad, por esto se acostumbra emplear la notación G_s (en lugar de G_z).

2.1.3.2. Pulsos en las secuencias de RMI

El procedimiento básico simplificado para la reconstrucción de una imagen de RM en dos dimensiones se resume en los siguientes 5 pasos representados por una secuencia FT (diagrama de eventos medidos en el tiempo, Figura 2.21) (Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997; Ruan y Chen, 1998):

- 1- Pulso de RF de 90° para excitar los espines.
- 2- Pulso de gradiente de selección G_s del plano de corte en la muestra.
- 3- Pulso de gradiente de codificación de la fase G_ϕ .
- 4- Pulso de gradiente de codificación de la frecuencia G_f y registro de la señal de RF emitida (n puntos de datos).
- 5- Incremento del valor del gradiente de codificación de fase G_ϕ y repetición de los pasos 1 a 4, m veces.

En la secuencia típica 90° FID mostrada en Figura 2.21, la ordenada y la abscisa indican la magnitud y la duración respectivamente de los pulsos de gradientes de campo magnético. Los pulsos 1 y 2 se programan simultáneamente. Una vez el pulso de RF finaliza, el G_s también es suprimido e inmediatamente se activa G_ϕ que a su vez al finalizar, permite dar inicio a G_f y el registro simultáneo de la señal FID. Esta secuencia de pulsos se repite normalmente entre 128 y 256 veces. El tiempo empleado en la repetición de la secuencia como se explicó anteriormente es llamado T_R y cada vez que la secuencia se repite, la magnitud de G_ϕ es incrementada en forma lineal. Por cada localización que se quiera determinar, en la dirección de aplicación de G_ϕ , será necesario realizar un incremento de este gradiente y hacer el registro de una señal FID. De este modo se cumple que:

$$\text{Muestreo de } f = \# \text{ de incrementos de } G_f = m = \# \text{ pixeles en dirección } G_f \quad (2.37)$$

$$\text{Muestreo de } f = n = \# \text{ pixeles en dirección } G_f \quad (2.38)$$

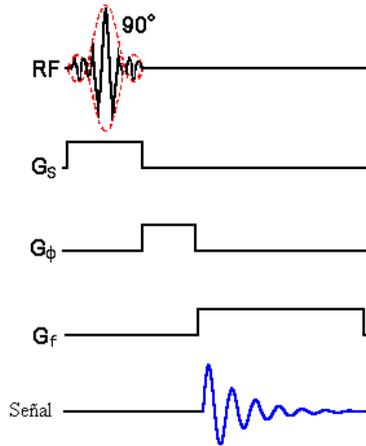


Figura 2.21. Secuencia simplificada de reconstrucción de una imagen FT bidimensional. (Adaptado de Hornak, 1996)

Las señales FID son adquiridas en el dominio del tiempo $f(t)$ (Figura 2.22-a) y son procesadas mediante la FT para tener la localización de los espines. Primero se aplica la FT en la dirección de G_ω (horizontal en la Figura 2.22-a) para extraer la información de la frecuencias dominantes $f(\omega)$ (Figura 2.22-b) y luego en la dirección de G_ϕ (vertical en la figura) para extraer la información de la localización en esta dirección (Figura 2.22-c). Los datos de la FT son mostrados como una imagen a través de la conversión de las intensidades de los picos de frecuencia y fase a intensidades de brillo de **píxel** (“picture element”) (Figura 2.22-d).

Así la imagen RMI obtenida es una matriz en la cual G_ϕ permite codificar la líneas m y G_ω permite codificar las columnas n (Figura 2.20-e) (Hornak, 1996; Kastler *et al.*, 1997).

Por tanto en cada píxel $L_i C_j$ de la matriz de la imagen se codifica la señal (ω_i, ϕ_j) emitida por un grupo de protones contenidos en un volumen elemental de la muestra.

2.1.3.3. Campo de visión y matriz de una imagen

El campo de reconstrucción o campo de visión **FOV** (“field of view”) en una imagen RMI representa las dimensiones reales, en unidades de longitud [cm o mm], alto por ancho de la superficie que cubre el plano de corte. El

tamaño del FOV depende de la tasa de muestreo f_s de \vec{M}_{xy} , de la constante de giro magnético γ y del gradiente de codificación de la frecuencia G_f y puede ser expresado como (Hornak, 1996):

$$FOV = \frac{f_s}{g G_f} \quad (2.39)$$

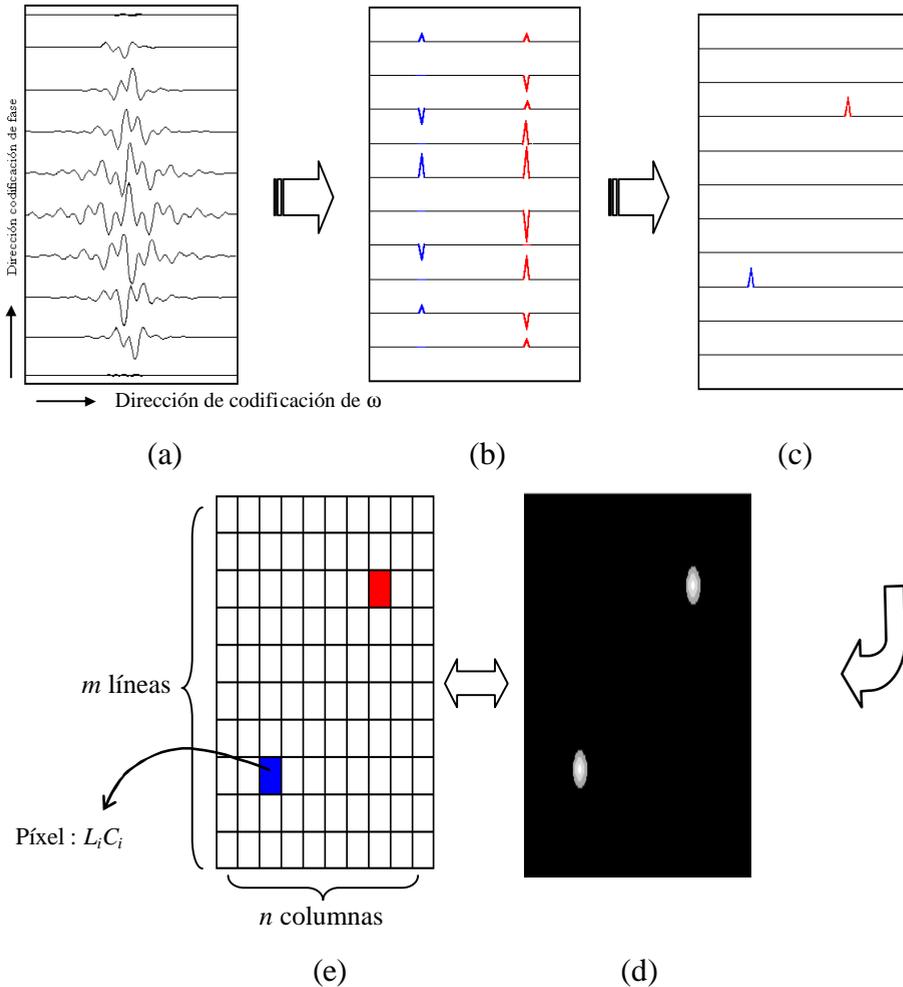


Figura 2.22. Esquema del proceso de reconstrucción de una imagen por RMI. (Adaptado de Hornak, 1996)

Para evitar perturbaciones de la imagen que puedan generar falsas imágenes, el FOV debe ser mayor que el tamaño de la muestra. El campo de visión FOV también está relacionado con el gradiente de codificación de fase G_ϕ mediante la siguiente expresión:

$$\int G_{f_{\max}} dt = \frac{N}{2g \text{FOV}} \quad (2.40)$$

Donde N es el número de incrementos o pasos utilizados para codificar el ángulo de fase ϕ y $G_{\phi_{\max}}$ es el gradiente máximo de codificación de fase.

El tamaño de la matriz $m \times n$ define el número de líneas L y columnas C presentes en la imagen. La matriz esta conformada por volúmenes elementales de materia denominados **voxels** y cada voxel es definido por el producto de la superficie del píxel por el espesor del corte.

El tamaño de cada voxel individual es determinado por tres factores, el campo de visión FOV, el tamaño de la matriz m y n , y por el espesor del plano de corte Δz (d_z). Las dimensiones d_x y d_y (en mm o cm) del píxel representativo de un voxel están dadas por las siguientes expresiones:

$$d_x = \frac{\text{FOV}}{n} \quad (2.41)$$

$$d_y = \frac{\text{FOV}}{m} \quad (2.42)$$

Por tanto el volumen (V) en $[\text{mm}^3 \text{ o } \text{cm}^3]$ de un voxel será:

$$V = d_x \cdot d_y \cdot d_z \quad (2.43)$$

Así en cada voxel la intensidad de la señal de RM (promedia de los protones que lo componen) queda representada por la intensidad de brillo de un determinado píxel en la imagen. En una imagen RMI las matrices pueden ser simétricas ($n=m$) o asimétricas ($n \neq m$) y por tanto los campo de visión FOV y los píxeles pueden ser cuadrados o rectangulares. Estos arreglos tienen diferentes efectos en la calidad y en los tiempos de reconstrucción de las imágenes.

2.1.3.4. Tiempo de reconstrucción de una imagen

El tiempo de reconstrucción o tiempo de adquisición de una imagen es el tiempo de duración global de una secuencia requerido para obtener una imagen RMI y esta dado por la siguiente expresión:

$$T_{ad} = T_R \cdot m \cdot N_{ex} \quad (2.44)$$

Donde:

- T_{ad} : tiempo de adquisición [s]
- T_R : tiempo de repetición [s]
- m : número de líneas o filas
- N_{ex} : número de excitaciones

El número de columnas n (unidad de muestreo en frecuencia) no influye en la duración de una secuencia, justificando para la reconstrucción de determinadas imágenes el uso de matrices asimétricas y/o FOV rectangulares de mayor tamaño, con el ancho (dirección de la codificación de la frecuencia) mayor que la altura (dirección de la codificación de la fase) (Kastler *et al.*, 1997).

Debido a los largos T_{ad} empleados en las secuencias convencionales de reconstrucción de imágenes se ha desarrollado una técnica, denominada multicortes, que permite realizar en el mismo período de tiempo (un ciclo completo) varios planos de corte. Se aprovecha de este modo el tiempo muerto que se da entre T_E y T_R , en la secuencia SE (Figura 2.14), antes de la generación de un nuevo pulso de 90° que produce la siguiente línea de la imagen. Este tiempo se utiliza para obtener línea a línea (progresión horizontal) varios planos de corte. Al final de cada ciclo (T_R) el paso a líneas sucesivas en cada plano de corte permite la progresión vertical para la reconstrucción de la imagen (Figura 2.23) (Kastler *et al.*, 1997).

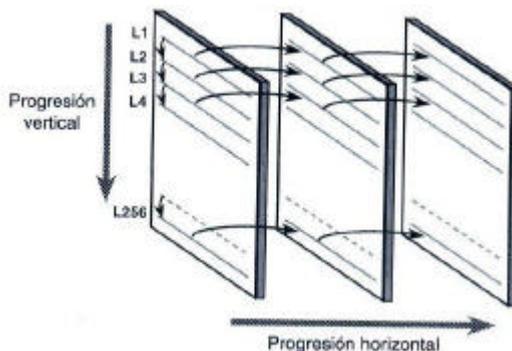


Figura 2.23. Principio de la adquisición por multicortes.
(Adaptado de Kastler *et al.*, 1997)

Completando la secuencia se obtienen varios planos de corte paralelos, según la dirección del gradiente G_s escogido en la muestra y la duración media de reconstrucción de un plano de corte se disminuye considerablemente.

2.1.4. Principales técnicas de reconstrucción de imágenes

2.1.4.1. Secuencia de reconstrucción Espín-Eco (SE).

En esta secuencia, representada por la Figura 2.24, para cada pulso de RF se aplica un gradiente de selección G_s . El gradiente de codificación de fase G_ϕ varía en m incrementos desde $G_{\phi m}$ a $-G_{\phi m}$ y es aplicado entre los pulsos de 90° y 180° para reducir T_E . El gradiente de codificación de la frecuencia G_f se aplica después del pulso de 180° durante el tiempo que la señal S de eco es registrada y un gradiente G_f adicional, aplicado entre los pulsos de 90° y 180° , permite desfasar los espines para que alcancen el refase justo en el centro del eco de la señal S , correspondiente al T_E . La secuencia completa se repite cada tiempo T_R hasta que todos los pasos de la codificación de ϕ han sido registrados, es decir hasta que se han completado las m líneas de la imagen.

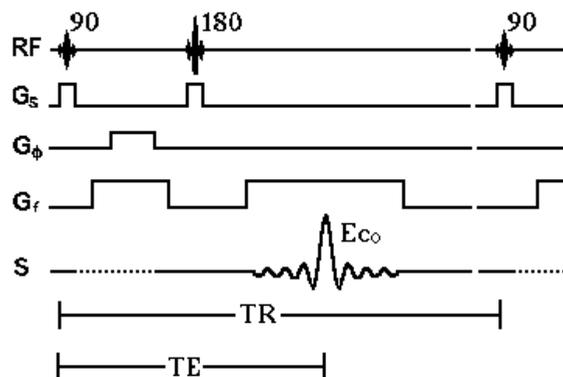


Figura 2.24. Secuencia de reconstrucción Espín-Eco. (Adaptado de Hornak, 1996)

2.1.4.2. Secuencia de reconstrucción Inversión-Recuperación (IR)

En la Figura 2.25 se esquematiza la secuencia de Inversión-Recuperación, en la cual la primera línea muestra los pulsos de RF. Un pulso selectivo de 180° es aplicado al tiempo con el gradiente de selección G_s y después que transcurre un periodo de tiempo T_1 una secuencia SE es aplicada con pulsos de RF selectivos aplicados simultáneamente con gradientes de selección de corte. La señal FID después del pulso de 90° no es utilizada (se muestra con línea punteada). La secuencia es repetida completamente cada T_R segundos.

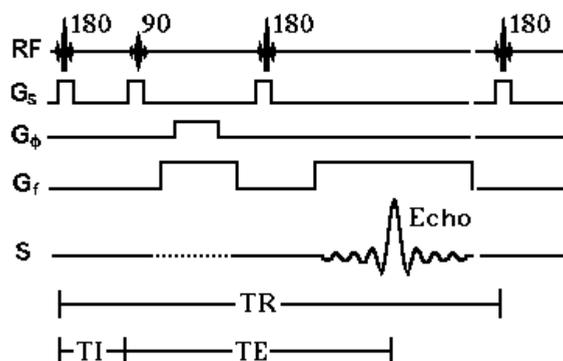


Figura 2.25. Secuencia de reconstrucción Inversión-Recuperación. (Adaptado de Hornak, 1996)

2.1.4.3. Secuencia de reconstrucción Gradiente-Eco (GE)

En esta secuencia (Figura 2.26), un pulso de RF produce una rotación del vector de imantación un ángulo de basculación (θ) entre 10° y 90° , simultáneamente se aplica un gradiente de selección G_s , luego un gradiente de codificación de la fase G_ϕ (de máximo a mínimo) es aplicado como en las secuencias anteriores y al mismo tiempo un gradiente negativo de codificación de la frecuencia G_f se aplica para colocar en fase a los espines en el centro del periodo de adquisición. El tiempo de repetición T_R aquí es mucho más corto que en las secuencias anteriores, ya que la componente \vec{M}_z regresa a su posición de equilibrio mucho más rápido, pero la señal disponible es menor al ser proporcional a $\text{sen}\theta$.

El empleo de un eco de gradiente asociado a ángulos de basculación reducidos, permite reducir T_R muy por debajo de T_1 sin perder señal, el ángulo óptimo de basculación θ se obtiene con la ecuación de Ernest, citada por Kastler *et al.* (1997), como:

$$q = \cos^{-1} \left[e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right] \quad (2.45)$$

Siempre y cuando se cumpla que $T_R \ll T_2^*$. Kastler *et al.* (1997) recomienda para T_R largos (>200 ms) utilizar $\theta \approx 90^\circ$ y para T_R cortos (<100 ms) recomienda usar θ pequeño ($\approx 30^\circ$).

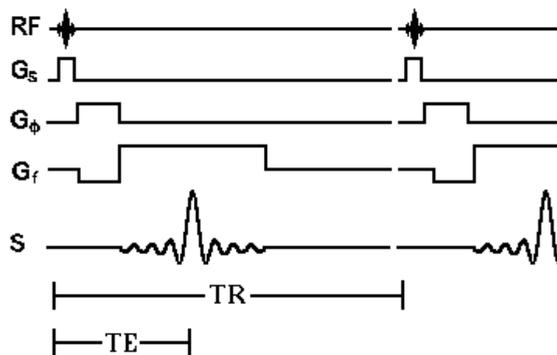


Figura 2.26. Secuencia de reconstrucción Gradiente-Eco. (Hornak, 1996)

Comercialmente existen varias secuencias rápidas basadas en el eco gradiente, tales como las secuencias “FLASH”(“*Fast Low Angle Shot*”), “Fast”, y “Contrast Enhanced” que permiten obtener contrastes en T_1 y ρ ; T_1 , T_2^* y ρ ; y en T_2 , respectivamente.

2.1.4.4. Secuencia RARE

La secuencia RARE “*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*”, es otra técnica rápida para obtener imágenes RMI. Esta explora los diferentes ecos de una secuencia multieco beneficiándose cada eco de una codificación de fase específica, pudiéndose obtener una imagen en un solo paso a partir de un tren de 64 a 128 ecos. Permite obtener imágenes con contraste en T_2 . Algunas de estas secuencias son conocidas comercialmente con los nombres de “Fast Spin Echo” y “Turbo Spin Echo” (Kastler *et al.*, 1997).

2.1.4.5. Técnicas de imágenes instantáneas

Secuencia “Turbo Flash”. Es una versión ultrarrápida de la secuencia “Flash”, en la que la duración de la conmutación de los gradientes ha sido mejorada, permitiendo obtener un T_R muy corto (3 a 5 ms), aunque con contraste pobre en densidad protónica debido al menor ángulo de basculación empleado.

Eco Planar. Método para lograr imágenes ultrarrápidas. Utiliza la codificación de las líneas de la matriz a partir de una sola excitación por conmutación de gradientes muy potentes que realizan una serie de ecos de gradientes sucesivos, permitiendo obtener un contraste muy ponderado en T_2 debido a un “ T_R infinito”. Aunque se pueden conseguir tiempos de adquisición del orden de decenas de milisegundos, esta técnica presenta algunas limitaciones instrumentales (Kastler *et al.*, 1997).

2.1.5. Factores de calidad de la imagen

La calidad de una imagen de resonancia magnética depende de parámetros que son propios del equipo de resonancia utilizado, de parámetros que dependen del operador en la programación de la secuencia y depende de los tejidos mismos que se van a analizar.

Debido a que resulta difícil valorar objetivamente la calidad, se han creado diferentes mediciones físicas a partir de la información obtenida de la imagen RMI, tales como la **relación señal-ruido**, el **contraste** y la **resolución espacial**. Aparte de esto existen una serie de artefactos o perturbaciones de la imagen que también influyen negativamente en la calidad de esta y por tanto se deben corregir si se presentan (Kastler *et al.*, 1997).

2.1.5.1. Relación señal-ruido

Es el factor que más condiciona la calidad de la imagen de RM, influyendo en el contraste y en la resolución espacial. La señal de RM es una señal de corriente relativamente débil, emitida por los núcleos de la muestra como consecuencia del movimiento de precesión del vector de imantación \vec{M}_{xy} , que se obtiene en la antena receptora del equipo mientras que, el ruido es el conjunto de señales indeseables que degradan la formación de la imagen. Este último puede ser aleatorio o coherente y puede provenir del sistema electrónico de tratamiento de la señal, de los movimientos moleculares y de los artefactos (Kastler *et al.*, 1997).

La **intensidad de la señal (S)** en cualquier volumen elemental de una imagen (voxel o píxel) se determina mediante una ecuación de señal que es específica para cada secuencia de adquisición. Para las secuencias principales estudiadas estas ecuaciones son las siguientes (Song *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Hornak, 1996; Clark *et al.*, 1997; Kastler *et al.*, 1997):

- Secuencia 90° FID:

$$S = k\mathbf{r} \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right) \quad (2.46)$$

- Secuencia Espín-Eco SE:

$$S = k \mathbf{r} \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right) \left(e^{-\frac{T_E}{T_2}} \right) \quad (2.47)$$

- Secuencia Inversión-Recuperación IR (no repetida):

$$S = k\mathbf{r} \left(1 - 2e^{-\frac{T_I}{T_1}} \right) \quad (2.48)$$

- Secuencia Inversión-Recuperación IR repetida (180°-90°):

$$S = k \rho \left(1 - 2e^{-\frac{T_I}{T_1}} + e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right) \quad (2.49)$$

- Secuencia Inversión Recuperación IR repetida (180°-90°-180°):

$$S = k \rho \left(1 - 2e^{-\frac{T_I}{T_1}} + e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right) \left(e^{-\frac{T_E}{T_2}} \right) \quad (2.50)$$

- Secuencia Gradiente-Eco GE:

$$S = k \rho \frac{\left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right) \left(\sin \alpha e^{-\frac{T_E}{T_{2*}}} \right)}{\left(1 - \cos \alpha e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right)} \quad (2.51)$$

En donde:

S: magnitud de la señal de RM en el espectro del dominio de la frecuencia [unidades relativas]

k: constante de proporcionalidad

ρ : densidad protónica [número de protones en un volumen dado de muestra]

T_1 : tiempo de relajación longitudinal [ms]

T_2 : tiempo de relajación transversal [ms]

T_{2*} : tiempo eficaz de relajación transversal [ms]

T_I : tiempo de inversión [ms]

Los valores de ρ , T_1 , T_2 y T_{2*} son específicos para cada tipo de tejido y k depende de la sensibilidad en el circuito de detección del equipo.

Según Hornak (1996) y Kastler *et al.* (1997) el factor S/R expresa la relación entre la intensidad de la señal estudiada y el ruido R de fondo, y puede ser valorado en una imagen como:

$$S / R = \frac{S_m}{DE} \quad (2.52)$$

Donde:

S/R: relación señal-ruido (adimensional)

S_m : señal media en una zona homogénea de la imagen

DE: desviación estándar de S_m

La DE es definida como la fluctuación o ruido que experimenta el valor de la señal S de un voxel a otro en una imagen (Figura 2.27). Cuanto más elevada sea esta relación, mejor será la calidad de la imagen. Algunos equipos definen S/R en porcentaje.

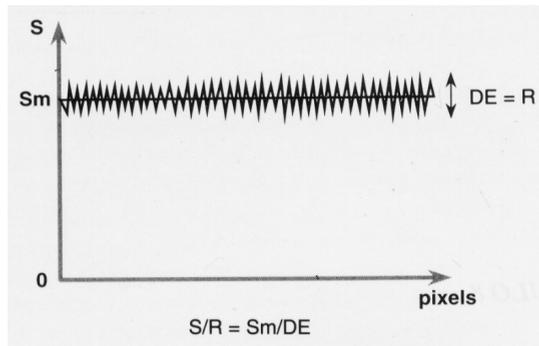


Figura 2.27. Valoración de la señal-ruido en una imagen MRI.
(Fuente: Kastler *et al.*, 1997)

La relación S/R puede ser mejorada empleando el promedio de señales de varias imágenes, ya que el ruido, de carácter aleatorio, tiende anularse con el incremento de imágenes promediadas. De este modo, la S/R es proporcional a la raíz cuadrada del número de imágenes promediadas o número de excitaciones (N_{ex}).

2.1.5.2. El Contraste

El contraste en una imagen MRI se define como la diferencia de intensidad de la señal entre dos estructuras o tejidos adyacentes, matemáticamente se expresa como:

$$C = S_a - S_b \quad (2.53)$$

Donde:

C: contraste [unidades relativas].

S_a, S_b : señales emitidas por los tejidos a y b , respectivamente. S_a y S_b son determinadas por las ecuaciones de señal antes indicadas según la secuencia de adquisición empleada.

El contraste en una imagen RMI dependerá por tanto de parámetros intrínsecos de los tejidos o estructuras estudiados (ρ , T_1 , T_2 , T_2^*) y de parámetros de programación en la secuencia (T_R , T_E , T_I , θ).

Debido a que el contraste en las imágenes de RM se presenta principalmente a partir de dos fuentes principales; la cantidad de agua (densidad protónica ρ) presente en la muestra y los tiempos de relajación T_1 y T_2 de los núcleos de agua, en RMI se utilizan los términos ponderado, contrastado, o “weighted” para explicar que una imagen tiene un acentuado contraste en cierto(s) parámetro(s) intrínseco(s), obtenido por la selección de determinados valores en los parámetros de programación de la secuencia (Hornak, 1996).

2.1.5.3. La resolución espacial

La resolución espacial es otra medida de la calidad de la imagen reconstruida que permite determinar la dimensión del mínimo volumen (V) observable de muestra (ecuación 2.43). La resolución depende del volumen del voxel y por tanto depende del FOV, del tamaño $m \times n$ de la matriz y del espesor del corte ($\Delta z = d_z$).

Se puede deducir de las ecuaciones (2.36), (2.41), (2.42) y (2.43) que la resolución de una imagen se puede mejorar reduciendo el tamaño del voxel, mediante un menor FOV, una matriz grande y un mayor gradiente de selección G_z para disminuir el espesor del corte d_z . Cada uno de estos parámetros puede ser seleccionado por el operador, dentro de cierto rango, en un equipo de RM antes de realizar el experimento de RMI.

Sin embargo, el aumento de la resolución espacial puede ser ineficaz si la imagen contiene ruido a consecuencia de un voxel demasiado pequeño. Es por tanto necesario, con el fin que el sistema de procesamiento de la imagen alcance la resolución requerida, que la separación de cada píxel en el dominio

de la frecuencia domine la línea y las bandas espectrales del material que contribuye a ese píxel, situación que según Mansfield y Morris, citados por Song *et al.* (1992) impone al gradiente de campo G_x con relación a T_{2^*} la siguiente condición:

$$g G_x d_x \geq \frac{1}{T_{2^*}} \quad (2.54)$$

Donde d_x es el tamaño de píxel requerido. En general no es deseable incrementar la magnitud de G_x más de lo necesario para alcanzar la resolución requerida, ya que esto extiende la información de la señal sobre una anchura de banda más amplia en la imagen final disminuyendo la relación señal-ruido (Song *et al.*, 1992).

2.1.5.4. Artefactos

Los artefactos son diferentes perturbaciones que puede presentar una imagen RMI y que dan origen deformaciones de la imagen anatómica, a falsas interpretaciones o a la simulación errónea de una patología. La comprensión del origen de un artefacto en una imagen permite evitar errores de interpretación y mejorar la calidad de ésta. Los principales artefactos son de dos clases, los relacionados con la muestra y los relacionados con el equipo de RM. A continuación se resumen los artefactos más comunes citados por Hornak (1996) y por Kastler *et al.* (1997):

Artefactos metálicos. Son distorsiones locales del campo magnético B_0 (inhomogeneidades) debido a la presencia de material ferromagnético que generan una zona sin señal con refuerzo en la periferia, deformando la imagen.

Artefactos de movimiento. Generan imágenes fantasmas y borrosas debido al movimiento de las estructuras de la muestra durante la adquisición de las imágenes. En las primeras se presenta una alternación de bandas de señal intensa y débil en dirección de la codificación de la fase y en las segundas se presenta dispersión de la señal.

Artefactos de truncación. Conocido también como fenómeno de Gibbs, se origina en las interfases que presentan una zona de transición

abrupta de la señal, presentándose estas en forma de bandas periódicas de intensidad débil y elevada, paralelas a la zona de variación brusca de la señal.

Artefacto de volumen parcial. Pérdida de resolución o disminución de la relación señal-ruido causada por factores relacionados con el tamaño del voxel de la imagen.

Repliegues. Artefacto que aparece cuando el objeto que se explora es mayor que el campo de visión. Trae como consecuencia el repliegue de las estructuras externas al lado contra lateral de la imagen. En la dirección de la codificación de la frecuencia el repliegue aparece cuando la frecuencia de la señal es mayor que la frecuencia de muestreo.

Desplazamiento químico. Se debe a la diferencia en la frecuencia de Larmor que presentan los protones del agua y de la grasa, y produce un desplazamiento en la interfase de estos dos compuestos, generando en la imagen una zona de ausencia de señal y otra zona con refuerzo de la señal.

Artefactos de susceptibilidad magnética. Se origina por el gradiente de campo magnético intrínseco que existe en la interfase de dos compuestos de susceptibilidades magnéticas muy diferentes como por ejemplo, el agua y el aire.

Excitación cruzada. Fenómeno de interferencia que se produce entre dos cortes adyacentes que altera la calidad de las imágenes, debido a las imperfecciones en la excitación de estos, ya que los pulsos de RF no son completamente rectos sino trapezoidales. A consecuencia de esto se da una reducción de la señal y una modificación del contraste. Por esto es recomendado dejar como mínimo 1 mm entre cortes.

Artefactos por defectos del sistema de RM. Son debidos a problemas en el equipo de resonancia, tales como: problemas de señal no homogénea en intensidad de un lado a otro de la imagen, problemas de compresión de la imagen por gradiente defectuoso, artefacto de cuadratura por fallos en el circuito de detección de RF, línea de frecuencia central debida a ruido generado en la bobina de RF o por interferencia de RF exterior.

2.1.5.5. Relaciones entre los factores de calidad

Según Kastler *et al.* (1997) la complejidad de la técnica RMI deriva de la relación multiparamétrica que presentan los factores S/R, C y la resolución espacial para la obtención de imágenes de alta calidad. El objetivo final en RMI es conseguir, para un contraste determinado e independiente de los problemas relacionados con los artefactos, el mejor compromiso entre la relación S/R, la resolución espacial y el tiempo de adquisición más razonable. La modificación de cualquiera de estos parámetros afectará la calidad de la imagen en uno ó en varios los otros parámetros. En las Tablas 2.2 y 2.3 se resumen, respectivamente, los efectos que tienen los parámetros programables T_R , T_E , θ de las secuencias y los efectos de los parámetros que no modifican el contraste; sobre los factores de calidad, relación señal ruido S/R y resolución espacial y sobre el tiempo de adquisición T_{ad} de una imagen RMI.

Tabla 2.2. Influencia de los parámetros programables en la calidad de la imagen RMI.

Parámetro	Sentido de variación	S/R	T_{ad}	Contraste en:			
				T_1	T_2	T_{2^*}	r
T_R	↑	↑	↑	↓	Sin. inf.		
	↓	↓	↑	↑			
T_E	↑	↓	Sin. inf.	Sin. inf.	↑	Sin. inf.	
	↓	↑			↓		
q	↑	↓	Sin. inf.	↑	Sin. inf.	↓	↓
	↓	↑		Sin. inf.		↑	↑

Tabla 2.3. Influencia de los parámetros programables que no afectan el contraste en la calidad de la imagen RMI.

Parámetro	Sentido de variación	S/R	T_{ad}	Resolución espacial	Efectos
d_z	↑	↑	Sin. inf.	↓	↑ artefacto volumen parcial
Distancia entre cortes	↓	Sin. inf.	Sin. inf.	Sin. inf.	↓ artefacto volumen parcial
m (m=n)	↑	↑	↑	Sin. inf.	↓ repliegue
m ($m^1 n$)	↑	↓	↑	↑	↓ repliegue
FOV	↑	↑	Sin. inf.	↓	↓ repliegue
Nex	↑	↑	↑	Sin. inf.	↓ artefacto movimiento
Dw	↑	↓	Sin. inf.	Sin. inf.	↓ desplazamiento químico

Sin. inf. : Sin influencia, $\Delta\omega$: ancho de banda de frecuencia (Fuente: Kastler *et al.*,1997)

2.2. Equipos y tecnología para RMI

La reconstrucción de imágenes por resonancia magnética RMI puede ser considerada como una extensión de la espectrometría por RM, la principal diferencia es que la RMI entrega información espacial de los espines de una muestra. En los últimos 10 años ha crecido la utilización de esta tecnología hacia campos como las ciencias biológicas y la ciencia de los alimentos (Ruan y Chen, 1998).

Como se mencionó anteriormente en el apartado 2.1.2., un equipo de RM consiste de varios sistemas; un imán principal, las bobinas de gradiente, las antenas de RF, y un sistema de procesamiento y visualización. Las características principales de estos se describen con más detalle a continuación.

2.2.1. Magneto o imán principal

Es el componente más importante y costoso de un equipo de RM (Morrow, 1999). Se encarga de generar el campo \vec{B}_0 , el cual debe ser lo más homogéneo posible y con suficiente intensidad para obtener buena calidad en las imágenes RMI.

La homogeneidad del campo se garantiza con unas bobinas de corrección, denominadas de “shim”. Mediante el ajuste de la corriente que se hace circular por estas bobinas (proceso conocido como “shimming”), se logra compensar las distorsiones del campo magnético debidas a imperfecciones en la fabricación o problemas locales (como columnas de acero cercanas o disposiciones asimétricas de metales).

También se emplea blindaje electromagnético en el magneto principal y en las bobinas de gradiente, mediante escudos de cobre o de acero inoxidable (denominados jaula de Faraday), para garantizar un campo central homogéneo y reducir algún campo magnético externo que pueda agregar ruido a la señal de RM (Kastler *et al.*, 1997).

Según la intensidad del campo los imanes se clasifican en imanes de campos; bajos (entre 0,02 y 0,25 T), medios (0,25 y 1 T) y altos (> 1 T). Con los imanes de campos altos se logran señales más elevadas y de alta resolución

que permiten obtener inclusive espectros de los compuestos presentes en una muestra. Sus principales inconvenientes son la disminución del contraste en T_1 y los artefactos de desplazamiento químico y de susceptibilidad magnética (Kastler *et al.*, 1997).

Según el tipo de imán los magnetos se clasifican en resistivos, permanentes y superconductores. Los resistivos o electroimanes, constituidos por un embobinado de hilo de cobre, generan campos magnéticos de pequeña intensidad (0,3 T). Los permanentes están constituidos por un bloque imantado, no consumen corriente eléctrica y no precisan refrigeración. Sin embargo requieren de algún sistema de control termo estático electrónico, para mantener la temperatura del magneto dentro de un rango apropiado de funcionamiento, aún cuando el equipo este desconectado. Para esto normalmente se utilizan varias sondas que miden la temperatura en diferentes áreas del magneto. Los imanes permanentes presentan un peso elevado para un campo relativamente débil. El imán superconductor es un electro-magneto fabricado con un alambre superconductor de una específica aleación metálica (por ejemplo, niobio-titanio) que presenta una resistencia eléctrica nula cuando es enfriado en helio líquido a una temperatura cercana al cero absoluto. La principal ventaja de los superconductores es que permiten obtener campos elevados con un mínimo consumo de corriente eléctrica. Sin embargo su costo de instalación y mantenimiento es el más elevado de todos. En general, se asume que todos los imanes con campos superiores a 0,3 T son superconductores.

La mayoría de los equipos RMI utilizan imanes superconductores de alta intensidad de campo, haciendo a la RMI la más importante aplicación comercial de la superconductividad. En todo el mundo, cerca de 2000 unidades/año son producidas comercialmente y se estima que hay cerca de 12000 unidades funcionando, de las cuales un 40% están instaladas en Estados Unidos.

Los imanes superconductores han evolucionado en los últimos años, reduciendo de manera importante su peso, dimensiones y precio a niveles mucho más accesibles para sus usuarios. Importantes avances en la tecnología criogénica como el desarrollo del criostato que contiene el helio líquido, con el diseño de un vaso “Dewar” (como los termos) doble, y con un receptáculo de nitrógeno líquido rodeando el contenedor de helio; han permitido minimizar las pérdidas de helio por evaporación. Todos estos avances han podido reducir

los costos de adquisición, mantenimiento y servicio de estos equipos en un 40% en los últimos años (Morrow, 1999).

2.2.2. Bobinas de gradiente

La función de este sistema es la de crear y controlar los gradientes en el campo magnético \vec{B}_0 que permiten la localización espacial de la señal de RM. Para esto un equipo utiliza tres pares de bobinas que generan los gradientes G_x , G_y y G_z . La intensidad del gradiente se mide en $\text{mT}\cdot\text{m}^{-1}$, con intensidades máximas entre 10 y 15 $\text{mT}\cdot\text{m}^{-1}$. En la Figura 2.28 se esquematiza un par de estas bobinas que permiten producir el gradiente G_z paralelo a \vec{B}_0 . La corriente circula en sentido inverso en las dos bobinas, produciendo así campos magnéticos (B) en sentidos opuestos, que al sumarse y restarse a \vec{B}_0 generan la variación gradual de G_z en la dirección z (Fullerton, 1982; Hornak 1996; Kastler *et al.*, 1997).

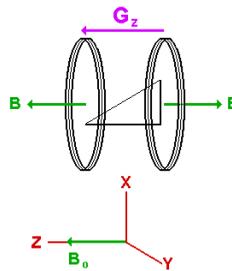


Figura 2.28. Configuración de las bobinas de gradiente G_z .
(Fuente: Hornak 1996)

Similarmente, los gradientes G_x y G_y en el campo \vec{B}_0 son creados por sendos pares de bobinas con configuraciones similares a las indicadas en la Figura 2.29.

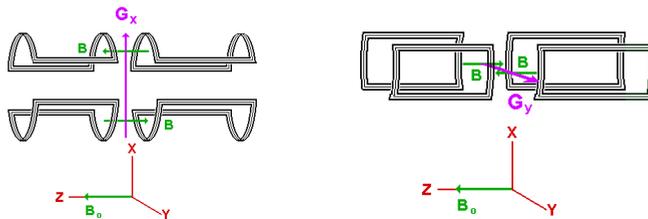


Figura 2.29. Configuración de las bobinas de gradiente G_x y G_y .
(Fuente: Hornak 1996)

2.2.3. Bobinas de RF

Las bobinas de RF, también llamadas antenas de RF, permiten la emisión de pulsos de RF (\vec{B}_1) y la recepción de la señal (FID) (Kastler *et al.*, 1997). Estas hacen parte del sistema de radio frecuencia del equipo junto con un sintetizador de frecuencia (detector de cuadratura, un amplificador de potencia y una envolvente digital de RF). Según Hornak (1996) las bobinas de RF pueden ser divididas según su función en tres grupos: bobinas de transmisión, bobinas de recepción y bobinas de transmisión y recepción. A la frecuencia de Larmor una bobina de RF deberá resonar o almacenar energía en forma eficiente. Las variaciones en composición y tamaño de los tejidos de la muestra colocada en la bobina de RF afectan la cantidad de energía de RF y de señal detectada. Por esta razón los equipos de RM utilizan diferentes bobinas de RF o estas pueden ser ajustadas para disminuir energía de RF necesaria para producir un pulso 90° (Hornak, 1996). Además, dado que la señal de RM es extremadamente débil, la antena de recepción debe ser de excelente calidad para obtener la mejor relación S/R posible.

Las antenas de volumen, que suelen ser transmisoras-receptoras, permiten obtener una señal homogénea en la totalidad del volumen explorado. Las más conocidas, de este tipo, son las denominadas jaula de pájaro y la solenoide de una sola vuelta (Figura 2.30-a).

Las antenas de superficie (Figura 2.30-b), la mayoría receptoras únicamente, se deben localizar lo más cerca posible a la región a estudiar, obteniendo así una muy buena relación S/R en los tejidos adyacentes a la antena. Estas antenas pueden presentar diferentes formas; tales como espiras planas circulares, rectangulares, flexibles, y otras (Hornak 1996).

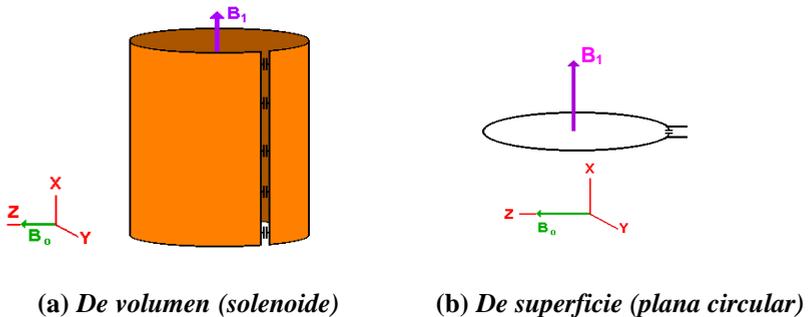


Figura 2.30. Tipos de antenas de RF. (Fuente: Hornak 1996)

Algunos equipos utilizan antenas internas, denominadas también de cuerpo, las cuales suelen estar incorporadas en el imán principal y son diseñadas para registrar señales de la muestra en regiones externas a la antena. Estas antenas pueden ser receptoras ó transmisoras-receptoras (Hornak 1996, Kastler *et al.*, 1997).

El detector de cuadratura es una bobina incorporada en el sistema de RF capaz de detectar dos componentes ortogonales de una señal de RF. Típicamente contiene dos mezcladores doblemente balanceados, dos amplificadores de señal, dos filtros, y un inversor de la fase de 90°. Según Kastler *et al.* (1997) estas antenas aportan una ganancia del 40% en la recepción. Debido a que las señales producidas por los protones son usualmente del orden de los nV ó μV (en amplitud) y del orden de MHz (en frecuencia), para procesar estas señales se necesita amplificación, la cual se realiza usualmente en varias etapas.

2.2.4. Sistema de procesamiento y visualización

Este es un sistema complejo que realiza muchas funciones como la programación y ejecución de las secuencias de reconstrucción de las imágenes, la adquisición y procesamiento de los datos (señales FID), reconstrucción y visualización de las imágenes. Para realizar estas funciones se utiliza un ordenador con varias unidades de procesamiento y tarjetas específicas; este ejecuta el “software” de interfase con el usuario y permite controlar todas las funciones y subsistemas del equipo de RM. También permite configurar el equipo, seleccionar o modificar parámetros de las secuencias, visualizar y almacenar las imágenes RMI de las muestras estudiadas en distintos medios (cintas magnéticas, discos magnético-ópticos, y discos compactos), visualizar problemas de “hardware” y de “software”, y realizar el procesamiento y análisis de las imágenes y/o espectros mediante 2DFT y 3DFT. Este sistema suele ofrecer diferentes salidas para la visualización de las imágenes y espectros (monitor, impresora, video).

2.3. Aplicaciones de la RM en el sector agroalimentario

Brian Hills (1998) plantea en su libro “*Magnetic Resonance Imaging in Food Science*” todas las oportunidades en investigación que ofrecen las tecnologías RM y RMI con materiales biológicos y alimentos. El autor recoge

más de 150 trabajos realizados en este campo agrupando los estudios en tres escalas: macroscópica, microscópica y macromolecular.

La tecnología RM de baja resolución (escala macroscópica) es la más utilizada en el sector de los alimentos. En ésta área se han desarrollado instrumentos de RM para aplicaciones específicas, destacándose los que cuantifican el contenido de sólidos en grasas y aceites; los trabajos en determinación de la razón sólido-líquido en margarinas y grasas comestibles, la evaluación del contenido de aceites en semillas oleaginosas, del contenido en grasas de manteca de cacao y chocolates, del contenido de grasa y humedad de la leche en polvo y derivados lácteos, del contenido de aceites y grasas en carnes frescas o enlatadas y pescados, del contenido de humedad en azúcares, pulpa de remolacha, puré de tomate, humedad de arroz, fideos y pastas (Castiñeira 1989; Ablett, 1992; Schrader *et al.*, 1992; Stroshine, 1999). Estudios del cambio en la distribución del agua durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos han sido realizados investigando los tiempos de relajación T_1 y T_2 (Ablett, 1992), entre estos; el trabajo de Budiman *et al.* (2001) modelando las curvas de relajación transversal para correlacionar T_2 con el contenido de agua, de sal y de grasa en el queso; el mapeo de temperaturas en los tejidos realizado a partir la intensidad de señal en imágenes reconstruidas a diferentes temperaturas (Ablett, 1992, Clark *et al.* (1997); el control de la pérdida de humedad en el café tostado y estudios sobre movilidad de agua en los alimentos congelados (Castiñeira, 1989). También la microestructura de los alimentos ha sido investigada utilizando los pulsos de gradientes, permitiendo determinar los coeficientes de difusión de líquidos puros y del agua de células en semillas comestibles (Ablett, 1992; Ishida *et al.*, 1995).

La RM de alta resolución en estado de solución permite identificar la estructura química de la muestra diluida a partir del análisis de los picos de resonancia observados en un espectro de RM (Ablett, 1992). Se reportan varios trabajos sobre el estudio del espectro de alta resolución de alimentos líquidos como leche y zumos de fruta (Castiñeira, 1989). Kuchenbrod *et al.* (1995) pudieron obtener mediante RMI de alta resolución, imágenes microscópicas cuantificables de plantas enteras de maíz que permiten realizar estudios morfológicos en vivo de los tejidos. También, estudios histológicos para distinguir tejidos con diferentes propiedades de relajación han permitido observar, mediante microimágenes RMI con una resolución menor de 100 μm , tejidos parenquimáticos de diferente origen ontológico (Clark *et al.*, 1997;

Glidewell *et al.*, 1999; Van As, 2003). Estudios con núcleos diferentes al ^1H son ahora posibles, como por ejemplo el uso de ^{31}P -RM para el estudio en vivo de metabolismo en ciertos materiales biológicos (Ablett, 1992), el uso de ^{23}Na -RMI para investigar el crecimiento de plantas bajo estrés salino y de ^{19}F -RM para estudiar movilidad en el xilema del tomate de productos herbicidas degradados (Ishida *et al.*, 2000). La microscopia de RM de alta resolución también ha sido utilizada para analizar cambios en la migración y movilidad del agua y solutos, transición vitrea, estudiar las características de las membranas de las células y monitorizar metabolitos, medida del flujo y difusión del agua en tejidos vegetales, viabilidad de semillas y su potencial de germinación, morfología de frutos y otros órganos vegetativos (Castiñeira, 1989; Callaghan *et al.*, 1994; Kuchenbrod *et al.*, 1995; Ishida *et al.*, 1995, 1997 y 2000; Glidewell *et al.*, 1997 Hills, 1998; Ruan y Chen, 1998; Vozzo *et al.*, 1999; Scheenen *et al.*, 2000; Köckenberger, 2001; Scheenen *et al.*, 2002; Van As, 2003). Específicamente, estudios de imágenes RMI de flujo para la caracterización de propiedades reológicas de alimentos líquidos, acuosos y suspensiones se han realizado con el fin de optimizar muchos de los procesos de manufactura de los alimentos (Hills, 1998). La RM de alta resolución en estado sólido puede ser usada también para obtener información valiosa de la estructura física de los materiales sólidos y de sus cambios dinámicos (Ablett, 1992; Hills, 1998; Ruan y Chen, 1998-b; Scheenen *et al.*, 2002 y 2002; Van As, 2003). Por ejemplo, Song *et al.* (1992), estudiaron mediante RMI de alta resolución la transferencia de humedad en granos de maíz individuales durante el proceso de secado, y Williamson *et al.* (1993) revelaron la arquitectura vascular del fruto maduro de grosella, diferenciando claramente la pared del ovario de los tejidos parenquimáticos que rodean la semilla.

Debido a la importancia que ha tenido la tecnología de la RM y su creciente empleo en el sector específico de los alimentos, cada dos años desde 1992 se realiza la *Conferencia Internacional sobre Aplicaciones de la Resonancia Magnética en la Ciencia de los Alimentos*, reuniendo más de 100 conferenciantes de todo el mundo para dar a conocer los resultados de las investigaciones con RM en áreas como; estructura y dinámica de los alimentos, aplicaciones de los métodos de RM en estado sólido, control de calidad, análisis multivariante de la información de RM, y desarrollo de sensores e instrumentación en RM para el sector de los alimentos (INA P-G, 2002; The Royal Veterinary and Agricultural University, 2004).

2.4. Estudios de RM en frutas y vegetales

Desde 1977 cuando fue adquirida y publicada la primera imagen RMI de una fruta (limón) por Hinshaw *et al.* (1977), se han realizado numerosas investigaciones utilizando esta tecnología para estudiar, de forma no destructiva, la calidad interna de frutas y productos hortícolas. Muchos de los trabajos publicados han sido antes revisados y recogidos por Chen y Sun (1991), Schrader *et al.* (1992), McCarthy (1994), Abbott (1997), Clark *et al.* (1997), Faust *et al.* (1997), Hills (1998), Ishida *et al.* (2000), Hills y Clark (2003).

Estos estudios de calidad en frutas y vegetales con RM han sido llevados a cabo en las siguientes áreas: crecimiento de los frutos, evaluación de la maduración, detección de defectos internos, estudios de desordenes fisiológicos y respuesta a tratamientos poscosecha. A continuación se citan muchos de estos trabajos.

2.4.1. Crecimiento de los frutos

En la literatura se reportan varios trabajos utilizando equipos de RMI de media y alta resolución para estudiar, mediante imágenes RMI, el crecimiento y el desarrollo de diferentes clases de frutos y la relación que presenta la información obtenida de las imágenes con los cambios exhibidos en propiedades físicas y químicas de las fruta.

Saltveit (1991) adquirió imágenes RMI de **tomates** con diferentes estado de desarrollo, revelando de forma clara muchos detalles estructurales del interior de la fruta. En las imágenes obtenidas, la intensidad de la señal varió dependiendo del tipo de tejido interior y del estado de desarrollo del fruto.

Ishida *et al.* (1997), examinaron con RMI de alta resolución los cambios del estado del agua y de los compuestos solubles acumulados durante el crecimiento de frutos de **cereza**.

Clark *et al.*, (1999) adquirió imágenes RMI en T₁, T₂ y DP de **mandarina** Satsuma para visualizar los cambios anatómicos de la piel y del sistema vascular del mesocarpio y para ver la morfología de los sacos de jugo dentro de los segmentos de la pulpa.

En frutos de **caqui**, Clark y MacFall (2003) determinaron los tiempos de relajación T_1 y T_2 durante diferentes semanas, a partir de la formación del fruto, en los tejidos vasculares del mesocarpio.

Andaur *et al.*, (2004), utilizaron RMI para estudiar el crecimiento de **uvas** de diferentes variedades permitiendo la visualización de características internas y la obtención del volumen de los racimos de fruta.

2.4.2. Evaluación de maduración

En este campo de investigación es en el que más trabajos se han realizado utilizando la espectroscopia de RM y las imágenes RMI.

Chen *et al.* (1989) utilizando RMI con secuencias SE mostró las diferencias en el contraste de los diferentes tejidos que presentan las imágenes de RM de **tomates** verdes y maduros, **aguacates** inmaduros y maduros, y pulpa sobremadura con relación a pulpa madura de **piña**.

Salveit (1991), determinó con RMI diferencias claras en el contenido de agua libre de la región locular de diferentes categorías de **tomates** maduros de color verde. Posteriormente, Kim *et al.* (1994) encontraron con RMI diferencias en T_2 entre **tomates** maduros (blandos) y verdes (firmes).

Callaghan *et al.* (1994) encontraron que los tiempos de relajación y los mapas de difusión obtenidos a partir de imágenes RMI de frutos de **kiwi**, variaron de forma significativa con la maduración. Los cambios en estos parámetros fueron atribuidos a cambios en la dinámica del agua resultante de elevadas concentraciones de azúcares.

Posteriormente con RMI y espectroscopia de RM, Ishida *et al.* (1994) observaron los cambios en el estado del agua (movilidad) presente en frutos de **tomate** “Cherry” con diferentes estados de maduración, y Jagannathan *et al.* (1995) estudiaron diferentes procesos de maduración en la histoquímica del **coco**.

Muñoz y Merodio (1995) encontraron alta correlación entre los parámetros T_1 y T_2 con la firmeza en frutos de **chirimoya** en diferentes estados de maduración, concluyendo que la RMI es una herramienta adecuada

para el monitoreo de la maduración de esta fruta tropical. Yantarasri *et al.* (1996) encontraron en frutas exóticas que mediante la tecnología RMI es posible diferenciar frutos de **durián** (*Durio zibethinus L*) inmaduros, maduros y sobremaduros, y detectar daños, desordenes internos y pulpa podrida en frutos de **mangostán** (*Garcinia mangostana*).

Micro imágenes RMI y mapas obtenidos a partir de imágenes contrastadas en T_1 de frutos de **cereza** en diferentes estados de maduración fueron obtenidos por Ishida *et al.* (1997), indicando diferencias en la señal emitida por la semilla y por el pericarpio para los diferentes estados de maduración del fruto.

Ishida *et al.* (2000), en otra publicación, explica el uso de la micro RMI para el seguimiento de los cambios durante la maduración de productos como **tomate, maíz dulce, y pepino**.

Letal *et al.* (2003), en un trabajo más reciente, analizaron por texturas imágenes RMI ponderadas en T_2 de tres variedades de **manzanas**, obtenidas durante la maduración y el almacenamiento, y determinaron correlaciones significativas entre los diferentes parámetros texturales de las imágenes con la firmeza, el contenido de azúcares y la acidez de los frutos, que pueden ser utilizadas para la caracterización de la maduración de esta fruta.

Sensores basados en $^1\text{H-RM}$ para evaluar el contenido de azúcares y de sólidos solubles como indicadores del grado de maduración han sido probados en **tomates** (Stroshine *et al.*, 1991; Pearson y Job, 1994 citados por Abbott, 1997); **uvas** (Stroshine *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1991 y 1993; Bellon *et al.*, 1992; Goodman *et al.*, 1993, Andaur *et al.*, 2004); **arandanos** y **bananos** (Stroshine *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1991; Ni y Eads, 1993); **melón** (Cho *et al.*, 1991); **peras** y **cerezas** (Stroshine *et al.*, 1991, Bellon *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1998); **nectarinas, manzanas y melocotones** (Li *et al.*, 1992; Stroshine *et al.*, 1994; Wai *et al.*, 1995; Letal *et al.*, 2003); **ciruelas** y **maíz dulce** (Wai *et al.*, 1993; Zion *et al.*, 1995); **durián** y **mangos** (Kim *et al.*, 1998), **naranjas** (Stroshine *et al.*, 1994) y **kiwi** y **cebollas** (Jordan y Eustace, 1993; Pearson y Job, 1994 citados por Abbott, 1997).

También ha sido evaluado con ^1H -RM el contenido de aceite en **aguacate** como indicador de madurez para este producto (Chen *et al.*, 1993 y 1996; Kim *et al.*, 1998 y 1999).

2.4.3. Detección de defectos internos

Las aplicaciones de la RM en el área de detección de defectos internos en frutas y verduras comprenden los estudios realizados para identificar con anticipación a que se hagan evidentes externamente los daños ocasionados por insectos y hongos, las magulladuras producidas por golpes, y la identificación no destructiva de semillas y hueso en variedades en las que estas se requiere. A continuación se citan los trabajos desarrollados en este campo.

2.4.3.1. Daños por insectos y hongos

Chen *et al.* (1989) obtuvieron imágenes RMI de **pera** asiática mostrando las cavidades y galerías producidas por larvas al interior del fruto, y Mazucco *et al.* (1993) citados por Clark *et al.* (1997) obtuvieron imágenes RMI de **mango** infestado por larva de mosca de la fruta al momento de la cosecha y varios días después.

En estudios con hongos, alteraciones en tejidos internos producidas por *Botrytis cinerea* en **frambuesa roja**, **grosella negra** y **uva**; *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Phytophthora cactorum* en **fresa**; *P. Infestans*, *Poma foveata*, *Fusarium sulphureum* y *F. coeruleum* en **patata** y *Penicillium digitatum* en **mandarina** Fontuna y **naranja** Valencia; mostraron diferentes atributos en las imágenes RMI con relación a los tejidos sanos (Goodman *et al.* 1992; Goodman *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1997; Glidewel *et al.*, 1997; Galed *et al.*, 2004).

También, Jagannathan *et al.* (1995) utilizando imágenes RMI observaron en frutos de **coco** en estado rancio, la extensión del daño interno y la degradación debida a un crecimiento fúngico.

2.4.3.2. Magulladuras

Una magulladura en un fruto generalmente es producida por un golpe durante su manipulación y trae como consecuencia la ruptura masiva de células y la redistribución del agua libre de los tejidos. Chen *et al.* (1989)

visualizaron, mediante imágenes RMI, magulladuras internas en diferentes productos (**manzana, melocotón, pera y cebolla**). Maas *et al.* (1992 y 1993), citados por Abbott (1997), detectaron también con RMI magulladuras en **fresa**. Zion *et al.* (1995) desarrollaron un algoritmo para la detección de magulladuras en imágenes RMI de **manzanas** variedades “Jonathan” y “Golden Delicious”. McCarthy *et al.* (1995), en **manzanas** magulladas, siguieron los cambios presentados en la pulpa durante varios días. Los contrastes entre las zonas con magulladura y el tejido sano se incrementaron con el tiempo. Posteriormente, Mattiuz *et al.* (2002) utilizando un equipo RMI de resolución media detectaron en **guayabas** daños mecánicos provocados por impacto, compresión y corte de la piel. Recientemente, Thybo *et al.* (2004) utilizando imágenes RMI contrastadas en T₁, T₂ y DP detectaron en **patatas**, defectos no visibles internos como magulladuras provocadas por golpes y manchas internas “spraing” causadas por un virus.

2.4.3.3. Semillas y hueso

Chen *et al.* (1989) detectaron con imágenes RMI semillas en **ciruela y pepino**, el hueso y la semilla en **melocotón**, y el hueso en **aceituna**. Zion *et al.* (1994) citados por Zion *et al.* (1997) detectaron el hueso en **cerezas** procesadas. También Zion *et al.* (1997) detectaron el hueso en **aceitunas** bajo movimiento utilizando RM. Kim *et al.* (1999), utilizando un sensor en línea basado en imágenes RMI, detectaron y clasificaron **cerezas** con hueso. Blasco *et al.* (2002) y, Moltó y Blasco (2003) detectaron mediante el procesamiento de imágenes RMI semillas en **mandarinas** “Fortune”. Hernández *et al.* (2005) utilizando la técnica de adquisición “FLASH” obtuvieron, en condiciones dinámicas, imágenes RMI de **naranjas** y **limones**. Estos autores desarrollaron un algoritmo que permite corregir los artefactos causados por el movimiento de la naranja para permitir la discriminación de las frutas que presentan semilla.

2.4.4. Estudios de desordenes fisiológicos

Se han realizado varios estudios de RM para monitorizar desordenes internos producidos en los productos por condiciones adversas como temperaturas extremadamente bajas en campo, y por determinados tratamientos poscosecha tales como almacenamiento en atmósferas modificadas, atmósferas controladas y tratamientos térmicos.

2.4.4.1. Daños por heladas en campo

El daño por helada en los cítricos no se evidencia externamente, el principal síntoma de este daño es la pulpa seca, pudiendo perderse todo el zumo. En este tema son muy escasos los trabajos realizados con RM y reportados. Chen *et al.* (1989) detectaron con RMI en **naranjas** “Washington Navel” vesículas secas (sin zumo). Hernández *et al.* (2003) adquirieron y procesaron imágenes dinámicas de RMI para la identificación de **naranjas** con daños internos por heladas. En este primer ensayo exploratorio, los resultados fueron promisorios, aunque no fue posible la detección del daño cuando este era ligero. Recientemente, Gambhir *et al.* (2005) utilizando la piel y los gajos de **naranja** Navel determinaron diferencias en el tiempo de relajación T_2 de la fruta congelada y de la fruta sin congelar. Estas diferencias podrían usarse, según los autores, para la detección de frutos con daño por heladas.

2.4.4.2. Corazón acuoso (“watercore”)

El corazón acuoso es un serio desorden fisiológico de las manzanas que ocurre al final de la cosecha en frutos sobremaduros. Este desorden interno que se manifiesta como un área acuosa y traslúcida entorno al corazón de la manzana, no altera la apariencia externa de la fruta hasta que ocurre un quiebre severo del tejido. Si no se detecta y las manzanas son almacenadas puede ocurrir un pardeamiento interno y una depresión del tejido produciendo un producto invendible (Toledo y Jorquera, 2003).

Wang *et al.* (1989), usando imágenes RMI visualizaron, localizaron y determinaron el área de tejidos afectados por corazón acuoso en **manzanas** “Red Delicious”. Posteriormente Clark *et al.* (1997), observaron con RMI en **manzanas** “Fuji” almacenadas una disminución en el tiempo de relajación de los tejidos afectados por “watercore”.

Recientemente, Marigheto y Hills (2005) encontraron utilizando un equipo de baja intensidad de campo magnético (0,1 T), que el cambio en la densidad protónica de las regiones afectadas con corazón acuoso en **manzanas** permite obtener un alto contraste en la imagen RMI, facilitando la detección en línea de este defecto.

2.4.4.3. Degradación acuosa (“core breakdown”)

La degradación acuosa es una fisiopatía de la pera debida a un rápido deterioro enzimático de la pulpa (excesivo ablandamiento) que ocurre durante el almacenamiento en atmósfera controlada con niveles altos de CO₂ y disminución del O₂. Este desorden interno se manifiesta por el desarrollo de cavidades, el pardeamiento y la ruptura de los tejidos de la corteza cercanos al corazón de la pera (Wang y Wang, 1989; Lammertyn *et al.*, 2001).

Wang y Wang (1989), detectaron mediante imágenes RMI la presencia de este desorden en **pera** “Bartlett” para dos condiciones diferentes de almacenamiento con atmósfera controlada.

Posteriormente, Lammertyn *et al.* (2003-b) evaluaron el desarrollo de la degradación acuosa en **pera** variedad “Conference” con tres técnicas tomográficas; Rayos X, imágenes de tomografía computarizada TC, y RMI, concluyendo que esta última técnica es la más adecuada para el estudiar este desorden durante el almacenamiento postcosecha de la pera.

También, Lammertyn *et al.* (2003-a), estudiaron con RMI y RX el desarrollo de la degradación acuosa durante varios meses de almacenamiento bajo condiciones que indujeron el daño en peras “Conference”. Las imágenes de ambas técnicas permitieron observar dos patrones de pardeamiento interno en la fruta, que no crecieron en el tiempo pero si aumentaron su contraste con relación a los tejidos sanos. Ambas técnicas detectaron los tejidos pardos descoloridos y las cavidades en la pulpa pero la técnica RMI produjo mejor contraste entre los tejidos que los RX.

2.4.4.4. Pardeamiento interno (“internal browning”)

El pardeamiento interno es una alteración fisiológica que produce cavidades, en forma de lentes de color pardo, en los tejidos de la corteza y el corazón de las frutas de pepita almacenadas en atmósferas controladas con alta concentración de CO₂.

Stroshine (1999) estudió los tiempos de relajación T₂ en **manzanas** “Red Delicious” sanas y con pardeamiento interno, encontrando que las pequeñas diferencias dificultan su rápida detección y separación en línea. Sin embargo, Keener *et al.* (1999) y recientemente, Chayaprasert y Stroshine

(2005), para esta misma variedad de manzanas, encontraron diferencias estadísticas que podrían ser usadas para separar las manzanas sanas de aquellas afectadas por este tipo de defecto, con un sistema de clasificación basado en RM operando en línea a velocidades inferiores a 100 mm/s.

Clark y Burmeister (1999), siguieron durante 4 semanas mediante imágenes RMI el desarrollo del pardeamiento interno inducido en **manzanas** “Braeburn”. Los autores afirman que este defecto fue visualizado en las imágenes a los 14 días de haberse iniciado el almacenamiento bajo atmósfera controlada con alta concentración de CO₂.

Gonzalez *et al.* (2001), también detectaron y siguieron el pardeamiento interno en **manzanas** “Fuji” almacenadas bajo dos condiciones diferentes de atmósfera controlada. Los autores demostraron que las imágenes RMI detectan y cuantifican el desorden tanto a baja como a alta concentración de CO₂.

2.4.4.5. Harinosidad (“mealiness, “woolliness”) y mal radiante (“internal breakdown”)

Estos defectos fisiológicos son atributos negativos de la textura sensorial, comunes en frutos de pepita como las manzanas y en frutas de hueso como las nectarinas y los melocotones. La harinosidad se caracteriza por la combinación de disgregación en la estructura de los tejidos de la pulpa (textura blanda y fibras fuertemente lignificadas) y ausencia de jugosidad. El mal radiante se manifiesta en melocotones como un pardeamiento de la pulpa alrededor del hueso. Estas alteraciones son generalmente debidas a una prolongación del período de conservación, y están asociadas con la desintegración de la lamina media del tal forma que las células se separan en vez de rompersen cuando son sometidas a esfuerzos de corte (Reeve, 1970 citado por Marigheto y Hills (2005). Además los frutos afectados no manifiestan síntomas externamente (Guzmán *et al.*, 1992; Sonogo *et al.*, 1995; Barreiro *et al.*, 1999 y 2000).

Sonogo *et al.* (1995), visualizaron harinosidad en **nectarinas** con imágenes RMI como zonas oscuras correspondientes a tejidos con baja densidad protónica (cavidades de aire). Barreiro *et al.* (1999 y 2000) determinaron diferencias en los valores e histogramas de T₂ en **manzanas** “Top Red” con harinosidad respecto a manzanas sanas, almacenadas durante 6 meses. Los autores también confirmaron que los frutos con mal radiante

presentan histogramas de distribución de T_2 similares los histogramas de los frutos afectados con harinosidad. También Barreiro *et al.* (2000) con RMI determinaron **melocotones** harinosos aunque no todos los cambios encontrados en los histogramas de los frutos harinosos son similares a los observados en manzanas.

En un estudio reciente, Marigheto y Hills (2005) encontraron con espectrómetros de RM de baja intensidad de campo magnético (0,1 T) operando a 23 y 100 MHz, que aunque los espectros en T_1 y T_2 pueden distinguir **manzanas** “Red Delicious” harinosas de sanas, las diferencias obtenidas fueron muy pequeñas, resultando este defecto en manzanas difícil de detectar con estas técnicas.

2.4.4.6. Daño por frío (chilling injury)

El daño por frío es un desorden fisiológico en las membranas celulares cuando los tejidos del fruto cosechado son expuestos a temperaturas bajas (<12°C), pero no de congelamiento, para prolongar su vida postcosecha (Clark y Forbes, 1994). Según Skog (1998) el diagnóstico es difícil y los síntomas del daño aparecen a mayores temperaturas pudiendo tomar varios días para su desarrollo y pueden no ser visibles externamente.

Wang y Wang (1992), encontraron diferencias en la intensidad de las señales de las imágenes RMI de **calabazas** “Zucchini” sometidas a bajas temperaturas que produjeron daños por frío respecto a calabazas que no sufrieron este daño. Tanto las imágenes contrastadas en T_1 como en T_2 permitieron detectar los cambios internos en las frutas afectadas.

Clark y Forbes (1994), siguieron el desarrollo de daño por frío de frutos de **caqui** durante un período de 7 semanas usando imágenes RMI. En la última semana, cuando los frutos se dejaron a temperatura ambiente, fueron observados claramente los daños internos.

Posteriormente Clark y MacFall (1996) evaluaron el daño por frío en **caqui** almacenado en atmósfera modificada durante 5 semanas. Los autores concluyen que, aunque los estados iniciales del daño por frío no fueron posibles de observar ni por inspección visual ni por RMI, los tiempos de relajación estuvieron muy influenciados por las condiciones de almacenamiento.

2.4.4.7. Daño por congelamiento (“freezing”)

El daño por congelamiento ocurre cuando cristales de hielo se forman en el interior de los tejidos de un producto almacenado sometido durante cierto tiempo a temperaturas por debajo del punto de congelamiento. El síntoma más común de este daño en frutas es agua de apariencia remojada o áreas traslucidas en la piel y los tejidos afectados pueden perder rigidez (Wang, 1997) y en el caso específico de los cítricos, los gajos se pegan y se secan (Roger, 1991; Parsons, 1996; Gambhir *et al.*, 2005).

McCarthy *et al.* (1989), citados por Schrader *et al.* (1992), obtuvieron imágenes RMI de melocotones durante su proceso de congelamiento.

Duce (1992), citado por Clark *et al.* (1997), investigó la diferencia que presentan las imágenes RMI de **calabacines** frescos y congelados. Gamble (1994), utilizó imágenes RMI contrastadas en T_1 y en T_2 para hacer mapas de los cambios en la distribución de agua y azúcares en tejidos de frutos de **arándano**, sometidos a congelamiento y descongelamiento.

Kerr *et al.* (1997) observaron mediante imágenes RMI la formación de hielo y la dinámica del congelamiento de frutos de **kiwi**, pudiendo distinguir tejidos dañados por el congelamiento y tejidos sin daño debido a las diferencias presentadas entre estos en T_2 y en el coeficiente de difusión.

Hernández *et al.* (2004) detectaron y discriminaron naranjas sanas de naranjas con daños severos provocados por heladas en campo, usando un equipo RMI de alta resolución (4,7 T) operando en línea a velocidades entre 50 y 100 mm/s y mediante un algoritmo automático de segmentación empleado para procesar las imágenes RMI obtenidas por el equipo.

En un trabajo reciente, Gambhir *et al.* (2005), estudiaron el efecto que tiene la exposición de la pulpa y la epidermis de **naranjas** variedad Navel a diferentes temperaturas de congelamiento, en el tiempo T_2 de estas estructuras. Los autores encontraron que la diferencia en el T_2 de la pulpa de los frutos congelados respecto a la pulpa de los frutos sin congelar, podría usarse para detectar y separar, con un equipo de bajo campo magnético, las naranjas deterioradas por heladas.

2.4.4.8. Daño por tratamiento térmico

Susuki *et al.* (1994) emplearon imágenes RMI, contrastadas en T_1 y en T_2 , para identificar el daño interno en **papaya** generado por el uso de vapor caliente para la desinfección de huevos y larvas de mosca presentes en la fruta.

2.4.5. Otros estudios en procesamiento poscosecha

Hulbert *et al.* (1995), con imágenes RMI contrastadas en T_1 obtuvieron mapas de temperatura de **zanahorias** cocidas entre 19 y 83 °C. Esta aplicación podría ser útil, según los autores, para la determinación de propiedades térmicas de alimentos y para la evaluación de modelos para el procesamiento térmico. Posteriores trabajos en esta línea ha sido realizados en **patatas** y otros vegetales (Litchfield y Schmidt, 1998).

Burdon y Clark (2001), cuantificaron con imágenes RMI los cambios en el agua interior de tres tejidos de **kiwi**; el corazón, el pericarpio interior, y el pericarpio exterior, durante un periodo de almacenamiento de 14 días. La velocidad de pérdida de agua y los cambios en el agua dependieron del estado inicial del agua en la fruta.

Thybo *et al.* (2003), determinaron alta correlación entre parámetros de las curvas de relajación en T_1 de **patatas** de diferentes variedades con el contenido de materia seca de las mismas.

Schrader *et al.* (1992), Hills (1998), Ruan y Chen (1998) e Ishida *et al.* (2000) recogen varias aplicaciones de RM y RMI en procesos de secado, rehidratación y cocción de semillas y granos como **trigo, maíz, soya**, y frutos como **café, uva y mango**; en los que estudiaron la difusión y flujo de humedad y la distribución de agua, aceite, azúcares y otros compuestos como sodio, a través de las diferentes estructuras y tejidos de estos materiales biológicos.

2.5. Sensores de RM desarrollados para productos agrícolas

La mayoría de investigaciones realizadas con RM en productos agrícolas se han llevado a cabo con equipos desarrollados para estudios clínicos en medicina. Desde máquinas con imanes permanentes de baja intensidad (0,1 T) y poca resolución (5,4 MHz) hasta espectrómetros con

magnetos superconductores de alta intensidad (7 T) y alta resolución (200 MHz) han sido utilizados en estas investigaciones. No obstante, algunos grupos de investigación que trabajan en este campo han desarrollado y patentado prototipos sensores basados en ^1H -RM para analizar regiones de la fruta o frutos completos, inclusive para trabajar en línea.

El grupo de investigación de la Universidad de Purdue, liderado por el Profesor Richard Strohine, ha trabajado desde 1990 en el desarrollo de un espectrómetro de RM de baja resolución (5,4 MHz) para medir el contenido de azúcares y determinar madurez en frutas (**uva, banano, cereza, ciruela, manzana, pera y nectarina**). El sensor está compuesto por imán permanente con un campo de 0,12 T y un peso de 50 kg, un circuito transmisor y receptor de RF, una bobina específica de RF y un PC con una tarjeta digitalizadora que controla los pulsos y recoge las señales. Detalles de varios prototipos y sistemas del sensor han sido publicados (Cho *et al.*, 1990; Wai *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1991 a, b, c; Strohine *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Krutz *et al.*, 1992; Wai *et al.*, 1995; Keener *et al.*, 1996 y 1999; Jung *et al.*, 1998; Chayaprasert y Strohine, 2005).

En la Universidad de Davis-California, el grupo de investigación liderado por los Profesores Paul Chen y Michael McCarthy han trabajado en la evaluación no destructiva de calidad de productos agrícolas utilizando sensores en línea basados en ^1H -RM. Ellos han investigado, desde 1993, en un sensor en línea constituido por un espectrómetro ^1H -RM, un sistema de adquisición de datos y un sistema transportador de fruta en interfase con el equipo de RM. Características de su diseño y funcionamiento han sido reportadas en varios trabajos (Chen *et al.*, 1996; Zion *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998 y 1999). Este prototipo que ha sido evaluado con **aguacates, peras, durián, mangos, aceitunas y cerezas** puede determinar el contenido de azúcares o de aceites a una velocidad de la fruta de 250 mm/s. Según los autores aunque se requiere trabajar más en el sistema de transporte y en los algoritmos de clasificación, ellos consideran que la clasificación en línea basada en ^1H -RM es factible.

En Nueva Zelanda, Eustace y Jordan (1995), probaron un equipo de RM para medir contenido de azúcares, que registra las señales de FID perpendiculares al campo de la tierra. Este sensor fue basado en el trabajo de Callaghan y Le Gros (1982) citados por los autores, y utiliza un circuito especial de detección y polarización del campo que es generado por un

solenoides. Aunque éste mostró buenos resultados fue muy sensible a la temperatura y a la interferencia de corrientes eléctricas. Este grupo de investigación no reportó más trabajos con el sensor.

En España, el grupo de investigación del Laboratorio de Propiedades Físicas y Tecnologías Avanzadas en Agroalimentación LPF-TAG de la Universidad Politécnica de Madrid liderado por la Profesora Margarita Ruiz Altisent y con la colaboración de otros grupos de investigación y la empresa privada, desde el año 2000 viene trabajando en la aplicación de la RM al estudio de parámetros de calidad físico-mecánicos y químicos en fruta fresca en líneas prototipo de confección y clasificación de frutas y hortalizas. Ellos diseñaron y construyeron un prototipo transportador para la fruta a través de un espectrómetro de 4,7 T operando a 200 MHz, con el fin de simular la inspección en línea del producto. Un motor paso a paso, controlado electrónicamente, es utilizado para mover la cinta con la fruta a velocidad variable y un mecanismo eléctrico y óptico es utilizado para sincronizar la adquisición de la señal de RM con el movimiento de la fruta en el interior de la bobina de RF del equipo. Detalles de los estudios de calidad interna de frutas (melocotones, manzanas, peras y cítricos) y de detección en línea, utilizando RM y RMI se encuentran publicados (Barreiro *et al.* 1999, 2000 y 2003; Pérez de Alejo *et al.* 2003; Hernández *et al.*, 2003, 2004 y 2005 a-b).

La empresa PCT “Process Control Technology” (Fort Collins, Colorado, USA) comercializa un moderno espectrómetro de RM con “hardware” y “software” configurados para realizar gran variedad de análisis cuantitativos sobre muestras sólidas y líquidas en procesos de producción, control de calidad e investigación con diferentes materiales, entre ellos, materiales biológicos, como alimentos. Éste permite determinar contenidos de agua, sólidos, aceites, carbohidratos y otras importantes aplicaciones. Lo que más llama la atención del sensor es su reducido peso de solo 50 kg, permitiendo analizar muestras sólidas de hasta de 55 mm de diámetro (PCT, 2003).

Se espera en un futuro no muy lejano aplicaciones comerciales de sensores de RM en línea basados en magnetos de bajo campo o con sistemas simplificados de análisis de imágenes, que permitan la determinación rápida de la calidad interna de los productos agrícolas (Abbott, 1997; Clark *et al.*, 1997; Hills y Clark, 2003).

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se planteó y desarrolló con el propósito de examinar detenidamente las posibilidades y el alcance de aplicación que tiene la tecnología de la reconstrucción de imágenes por resonancia magnética RMI, usando un equipo de bajo campo magnético que ofrece un menor coste de inversión y mantenimiento entre los equipos de RM, para la detección automática y anticipada de distintos tipos de defectos internos que son difíciles de detectar, con antelación, y los cuales deterioran la calidad de melocotones y de cítricos, frutas de importante interés económico no solo para los productores de la Comunidad Valenciana, sino también para la fruticultura española y de la comunidad europea en general.

Este trabajo corresponde específicamente a una investigación aplicada, de carácter exploratorio, y los resultados aquí obtenidos pretenden contribuir, en un futuro no muy lejano, al desarrollo de un sistema comercial de inspección integral de la calidad interna, no solamente de estos productos agrícolas, sino de muchos otros, de manera no destructiva e inocua, tanto para el producto mismo como para los seres humanos que los manipulan y consumen, atendiendo de este modo las continuas y cada vez más crecientes exigencias de calidad para la comercialización nacional e internacional de frutas y hortalizas que imponen los países consumidores de fruta fresca en el mercado mundial.

3.1. Objetivo general.

Estudiar y explorar diferentes técnicas de reconstrucción de imágenes de resonancia magnética (RMI), utilizando un equipo de bajo campo magnético y el uso del procesamiento digital de imagen, para detectar diferentes daños y defectos internos en frutos de hueso y cítricos, con el propósito de establecer las bases para el desarrollo de un sistema automático de inspección y control de calidad.

3.2. Objetivos específicos.

Para alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los principios básicos de las tecnologías de RM y RMI y revisar las principales aplicaciones e investigaciones realizadas con estas

técnicas en el sector agroalimentario, especialmente los trabajos desarrollados para la evaluación de la calidad interna de las frutas.

- Trabajar con diferentes técnicas de adquisición de imágenes de RM con un equipo de bajo campo magnético, para estudiar cómo éstas afectan la calidad de las imágenes internas de frutos de hueso y de cítricos, con el fin de seleccionar de manera optimizada las secuencias y los parámetros que faciliten la detección automática de los diferentes defectos internos.

- Evaluar las técnicas de adquisición de imágenes por RM, como método no destructivo, para realizar el seguimiento de los cambios y la detección de los diferentes daños internos que se ocasionan en frutos de melocotón y en cítricos, tanto en el campo, antes de la recolección, como en el almacenamiento poscosecha.

- Desarrollar y evaluar algoritmos de procesamiento digital de imagen que permitan, a partir de las imágenes RMI de frutos de melocotón y de cítricos, con y sin daño, adquiridas con las técnicas anteriores; realizar la detección acertada de un mínimo de 80% de fruta afectada y de un máximo 20% de falsa detección de daños en fruta sana.

- Determinar el tiempo de anticipación con que los algoritmos desarrollados en esta tesis pueden detectar, de manera automática, el daño por frío en melocotones y los daños producidos por hongos en cítricos.

- Realizar, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, la propuesta de un sistema automático de inspección de la calidad interna de melocotones y cítricos, basado en la reconstrucción y procesamiento de imágenes obtenidas por resonancia magnética para un equipo de baja intensidad de campo.

CAPÍTULO 4
MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se indican las especificaciones técnicas de los equipos y los métodos utilizados en la investigación. Primero se describe el material vegetal, el procedimiento de preparación de las muestras y los daños internos que se estudiaron en éstas en las diferentes experiencias realizadas. Posteriormente, se explican los procedimientos utilizados en los experimentos para la selección de secuencias, la adquisición y clasificación de imágenes RMI, el procesamiento digital y los algoritmos desarrollados. Finalmente, se describen las herramientas de programación utilizadas y la metodología de evaluación de los algoritmos para la detección de los daños internos ocasionados a las frutas.

4.1. Equipo de RMI

En todos los experimentos se utilizó un equipo de RMI marca Artoscan Esaote Biomédica® (Figura 4.1), propiedad del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Este equipo está localizado en el Laboratorio de Resonancia Magnética del Centro de Agroingeniería del IVIA, en el término municipal de Moncada (Valencia).



Figura 4.1. Equipo RMI Artoscan Esaote Biomédica®.

A continuación se indican los sistemas y las especificaciones técnicas propios de este equipo.

Sistema magnético. Presenta un magneto permanente de ferrita, con un campo magnético transversal de baja intensidad (0,18 T) y una frecuencia de resonancia de 7,5 MHz. La homogeneidad de campo es menor a 50 ppm (Figura 4.2).



Figura 4.2. Sistema magnético del equipo RMI.

Sistema de gradiente. Utiliza tres pares de bobinas con una intensidad de gradiente de campo de 10 mT/m y un tiempo de barrido de 0,5ms de -10 a +10 mT/m (Figura 4.3).



Figura 4.3. Bobina de gradiente.

Sistema de radiofrecuencia. Esta constituido por tres bobinas intercambiables de RF tipo solenoide con una potencia máxima de 250 W en los pulsos pico (Figura 4.4): la No.1 de forma elíptica con diámetros del solenoide de 131x145 mm, la No. 2 también elíptica con diámetros del solenoide de 145x190 mm y la No. 3 de forma circular con diámetro del solenoide de 120 mm. La bobina escogida en la gran mayoría de exploraciones fue la No. 3, ya que por su menor diámetro admite mayor proximidad a los frutos de melocotón y a los frutos de cítricos utilizados en los experimentos de esta tesis, permitiendo una mejor recepción de la señal FID.



Figura 4.4. Bobinas receptoras y transmisoras de RF.

Sistema de adquisición de imágenes. Permite la reconstrucción de imágenes de 12 bit (4096 niveles de gris), mediante la utilización de la 2DFT y 3DFT con aplicación de las secuencias SE, ME, GE, e IR. El espesor de corte varía de 0,8 a 10 mm, el tamaño de matriz de reconstrucción va desde 128x128 a 256x256 (2D) y de 128x128x8 a 256x256x128 (3D). La resolución espacial mínima es de 0,4 mm. El FOV entre 100 mm y 200 mm. El número de cortes por eco de 1 a 128. El rango de programación de los parámetros T_R , T_E , T_I , y α (según el tipo de secuencia) varía desde; 40 a 5000 ms, 12 a 120 ms, 50 a 800 ms, y desde 10° a 120° , respectivamente.

4.2. Sistema de captación de imágenes RMI

Esta conformado por una tarjeta digitalizadora Matrox Meteor II® instalada en un ordenador personal con procesador Pentium 4 y el programa Matrox Intellicam® como interfase entre la tarjeta y la salida de video no estándar del monitor del equipo RMI. El equipo RMI y la tarjeta de adquisición se conectaron a través de un cable coaxial de 75Ω con conector BNC en el monitor del equipo y con un puerto serie de 44 pines en la tarjeta. Con este sistema las imágenes RMI de 12 BIT, reconstruidas por el equipo, fueron siempre reducidas a 8 BIT durante el proceso de captación.

4.3. Otros equipos utilizados en la investigación

- Cámara digital Nikon coolpix 3700 de 3,2 Mp de resolución, zoom óptico, zoom digital y sensor CCD de alta densidad.
- Colorímetro portátil MiniScan XE, fuente de iluminación difusa, iluminante D65, ángulo del observador 10° .
- Refractómetro digital portátil DR-101, °Brix 0-35%, resolución 0,1%, volumen de muestra 0,2 ml.
- Penetrómetro FT327, con punta de 8 mm, rango 0-130 N, resolución 0,01 N.
- Balanza digital con capacidad para 5.100 g, resolución 0,1 g.
- Balanza digital portátil, capacidad 3.000 g, resolución 1g.
- Calibrador digital con rango de 0-150 mm, resolución 0,01 mm.
- Higrotermómetro digital, rango de temperatura de -10° a 60°C , resolución $0,1^\circ\text{C}$, rango de HR de 0-100%, resolución 0,1%.
- Estereoscopio Leica Mz95, zoom 9,5:1, resolución de 600 pares de líneas/mm.
- Cámaras de almacenamiento controladas automáticamente a 1°C , 5°C , y 20°C de temperatura y a 85 y 99% de humedad relativa.

4.4. Material vegetal y descripción de daños internos

4.4.1. Melocotones y nectarinas

Para la realización de los experimentos con frutos de hueso se exploraron con el equipo de RMI un total de 352 frutos, de los cuales 40 correspondieron a melocotones de la variedad Baby Gold de pulpa amarilla, 304 a melocotones Calanda de la variedad “Amarillo tardío” clon “Jesca” (Anexo A3) y 8 correspondieron a nectarinas de pulpa amarilla. A continuación se describen los daños estudiados.

4.4.1.1. Daño por hongo saprofito desconocido

Durante los experimentos se encontró un tipo de daño interno que no aparece descrito en la bibliografía consultada. Los síntomas que se observaron en los frutos estudiados fueron; presencia en el mesocarpio de manchas marrones muy oscuras, que se extienden desde el hueso en una o varias direcciones, y con una textura más blanda y acuosa que la pulpa sana. El hueso en muchos casos se encontró ligeramente abierto o resultó muy fácil de abrir ejerciendo presión (Figura 4.5). En el interior del hueso al abrirlo se observaron esporas, probablemente del hongo *Alternaria sp.*

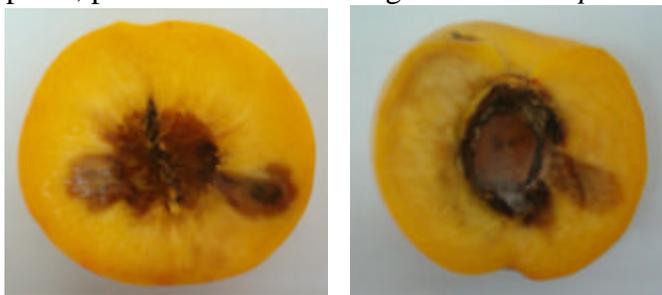


Figura 4.5. Daño producido en campo por hongo saprofito desconocido.

4.4.1.2. Daño por frío

Es un desorden fisiológico en las membranas celulares cuando los tejidos del fruto cosechado son expuestos a temperaturas bajas ($<12^{\circ}\text{C}$), pero no de congelamiento, que se produce en los tratamientos para prolongar su vida poscosecha (Morris, 1982; Clark y Forbes, 1994). En los melocotones, este daño se presenta durante la maduración después de un almacenamiento prolongado (más de dos semanas) a una temperatura en el rango entre 0 y 8°C

(Mollendorff *et al.*, 1989 y 1992; Ferrer *et al.*, 2001; Lurie y Crisosto, 2005). Los síntomas del deterioro pueden incluir mesocarpio lanoso o harinoso, con textura blanda y con carencia de jugosidad, pardeamiento interno de la pulpa alrededor del hueso, pulpa traslucida y enrojecida por acumulación de pigmentos, y una pérdida de sabor y aroma (Guzmán *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1998; Crisosto *et al.*, 1999 y 2003; Manganaris *et al.*, 2006). Según Guzmán *et al.* (1992) y Skog (1998), el diagnóstico del daño a simple vista es difícil, pues los síntomas no son visibles externamente pudiendo tomar varios días para que se hagan evidentes (Figura 4.6).



Figura 4.6. Daño por frío durante el almacenamiento.

4.4.1.3. Daño por la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* Wied

Este daño ampliamente descrito por Robinson y Hooper (1989), Roger (1991 y 1999), White y Elson-Harris (1992), Knapp (1999), y García y Ferragut (2002), entre muchos otros, se produce en el campo al depositar la mosca sus huevos sobre los frutos próximos a alcanzar la maduración. Las larvas se desarrollan en el mesocarpio de los frutos ocasionando internamente su podredumbre. Es difícil el reconocimiento visual de los frutos con picaduras recientes. Los frutos presentan, externamente, uno o varios puntos donde ocurrió la oviposición y solo al cabo de unos 5 a 10 días, cuando las larvas están próximas a perforar el fruto y salir de éste para convertirse en pupas, se aprecian en la epidermis puntos de color castaño. La puntura o punción, la cavidad del huevo y las consecuentes actividades de la larva abren el paso a hongos y bacterias, facilitando una infestación secundaria de diversas enfermedades. Internamente, el fruto picado por la mosca presenta durante los primeros 4 días de haber sido infestado, una o varias cavidades muy pequeñas debajo de la epidermis dejadas por la hembra durante la postura, este tipo de daño, que es difícil de detectar por los sistemas convencionales de clasificación, fue el que se decidió estudiar en esta tesis (Figura 4.7).

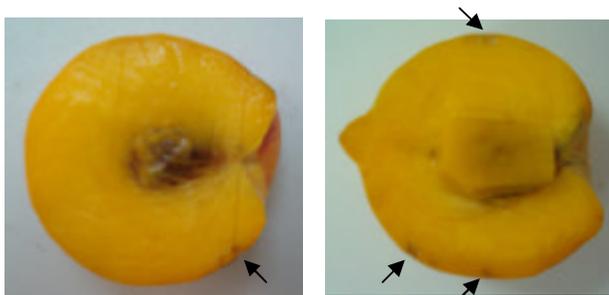


Figura 4.7. Daño interno producido por la mosca de la fruta.

4.4.2. Cítricos

Para la realización de los experimentos con cítricos se exploraron con el equipo de RMI un total de 145 frutos, que correspondieron a diferentes variedades cultivadas en la zona citrícola de Moncada (Valencia). A continuación se describe los daños estudiados en estos frutos.

4.4.2.1. Daño por *Alternaria alternata* Keissl pv *citri*

Este hongo produce en los cítricos la llamada podredumbre negra o podredumbre del corazón. Esta podredumbre, que se manifiesta en la fruta almacenada por largo tiempo, es producida en campo por el hongo cuando sus esporas transportadas por el viento llegan a las flores o a los frutos jóvenes y penetran a través del cáliz o del estilo, permaneciendo latentes hasta la recolección. Muchos frutos no muestran evidencia externa de la infección, debiendo ser cortados para revelar la pudrición (Figura 4.8). Es un defecto muy problemático para la industria procesadora, ya que no es fácil de descubrir con los sistemas actuales de tria y una cantidad mínima de podredumbre da un sabor amargo al zumo y los pequeños fragmentos negros de tejido estropean el aspecto este. Detalles sobre su sintomatología, son explicados por Tuset (1988), Brown (1994) y Brown and Eckert (2000).

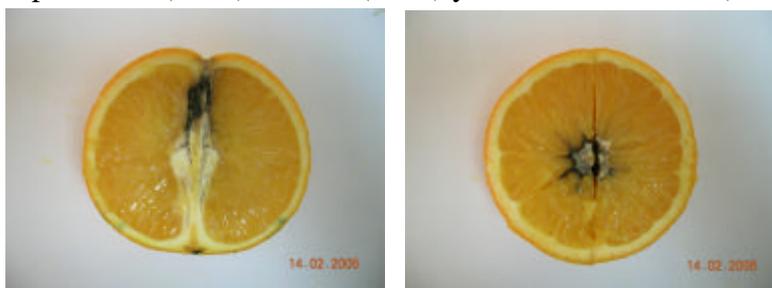


Figura 4.8. Podredumbre interna producida por *Alternaria citri*.

4.4.2.2. Daño por *Botrytis cinerea* Pers

Produce en todas las especies y variedades de agrios la denominada podredumbre gris, que se caracteriza en un estado avanzado por darle una textura blanda al fruto, exudación líquida y una coloración marrón a la piel. Durante su desarrollo, *B. cinerea* invade las partes más consistentes del fruto, como la piel, la columela y los tabiques o membranas que separan los gajos (Figura 4.9). En estas primeras fases de desarrollo es muy difícil de detectar su presencia en el fruto, requiriendo para ello usar métodos destructivos. Para información más detallada de la morfología y epidemiología de este hongo en la fruta, el lector puede remitirse a Tuset (1988) y a Brown y Eckert (2000).



Figura 4.9. Podredumbre interna producida por *Botrytis cinerea*.

4.4.2.3. Daño por *Diplodia natalensis* Pole-Evans

Esta podredumbre es producida por el estado conidial del hongo *Diplodia natalensis*, cuya actividad aparece en las zonas del pedúnculo y del estilo, y se desarrolla hacia el centro del fruto penetrando la corteza y la pulpa. (Figura 4.10). Las temperaturas mayores a 30°C y alta humedad relativa (95%), durante el proceso de desverdización en cámara, son muy favorables para el desarrollo de este hongo, haciendo que sea difícil su detección anticipada y de manera no destructiva (Offers, 1987; Brown, 1994; Brown and Eckert, 2000; Zhang y Ritenour, 2002).

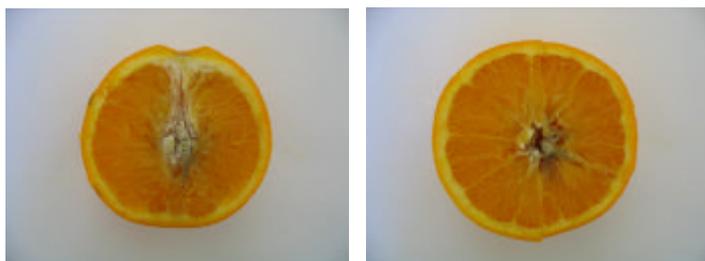


Figura 4.10. Podredumbre interna producida por *Diplodia natalensis*.

4.4.2.4. Daño por helada

Según Roger (1991) los cítricos se hielan en el campo cuando quedan sometidos unas cuantas horas a una temperatura alrededor de $-2,5^{\circ}\text{C} \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, dependiendo de la variedad (las mandarinas y limones en el rango superior, los pomelos en el rango medio y los naranjas en el rango inferior), el grado de madurez (los frutos más dulces se hielan a temperaturas más bajas) y dependiendo de las condiciones climáticas previas a la helada (por ejemplo, la duración del tiempo frío) (Timmer *et al.*, 1996).

Generalmente, no hay evidencia externa del daño en la fruta, a no ser que la helada fuera tan extrema que los síntomas se notaran en el follaje del árbol. El principal síntoma del daño es la pulpa seca y éste solo se puede apreciar internamente al abrir el fruto. Los cítricos helados, una vez descongelados, exhiben también síntomas como gajos pegados con la membrana húmeda debido al zumo extravasado y la presencia en la pulpa de cristales de hesperidina en forma puntos blancos. Si la helada es ligera se puede secar solo un gajo. Cuando han transcurrido varios días después de la helada, aparecen otros síntomas como la desviación en zig-zag de las membranas de los gajos (tabiques) y se pueden ver oquedades en el interior de la pulpa por ausencia de zumo (Figura 4.11). (Roger, 1991; Timmer *et al.*, 2002).



Figura 4.11. Daño producido por helada en campo.

4.5. Selección de secuencias de RMI para la obtención de imágenes internas de alta calidad

Este estudio se planteó con el propósito de evaluar diferentes técnicas de reconstrucción de imágenes que se pueden utilizar con el equipo RMI, y estudiar cómo éstas afectan la calidad de las imágenes del interior de melocotones y de cítricos. Se establecieron, en cada tipo de fruto, seis criterios de calidad que deben cumplir las imágenes obtenidas, con el fin de seleccionar las secuencias y parámetros que faciliten posteriormente la detección automática y anticipada, de manera no destructiva, de los distintos tipos de daños internos no visibles que los afectan.

4.5.1. Melocotones

Empleando 8 frutos de melocotón y 8 de nectarina, fueron probadas las secuencias espín eco (SE, TSE, HSE), inversión recuperación (IR, STIR), multieco (ME, TME) y ecogradiente (GE, GE STIR) con adquisición de las imágenes en 2D y 3D. Estas son las secuencias más importantes que permite ejecutar el equipo RMI. Se programaron diferentes valores en los parámetros tiempo eco T_E , tiempo de repetición T_R , tiempo de inversión T_I , ángulo de basculación θ , campo de visión FOV, tamaño de matriz $m \times n$, número de excitaciones N_{ex} , espesor d_z y número de cortes según las secuencias empleadas, para estudiar su efecto en la calidad de la imagen. En total fueron evaluadas 40 secuencias sin repeticiones. En la Tabla 4.1 se indican los parámetros programados y el tipo de contraste que se consigue en todas las 40 secuencias de RMI. Se resaltan en negrita las secuencias que serán más adelante referenciadas en el capítulo de resultados.

Tabla 4.1. Tipos de secuencias, contraste que se obtiene y parámetros programados para la reconstrucción de imágenes de RM.

Secuencia #	Tipo	Imagen	Contraste	T_E ms	T_R ms	Espesor mm	# cortes	N_{ex}	Matriz $m \times n$	FOV mm x mm
1	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	1	256x256	100x100
2	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	4	256x256	100x100
3	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	1	192x192	100x100
4	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	4	192x192	100x100
5	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	4	256x256	200x200
6	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	1	192x192	200x200
7	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	4	192x128	200x200
8	SE	2D	T_1	18	110	5,0	3	4	192x192	200x200
9	SE	2D	T_1	18	140	5,0	4	4	192x192	200x200
10	SE	2D	T_1	18	170	5,0	5	4	192x192	200x200

11	SE	2D	T ₁	24	500	10	3	1	192x192	160x160
12	SE	2D	T ₂	80	450	5,0	3	1	192x192	200x200
13	SE	2D	T ₂	80	5000	5,0	1	1	192x192	200x200
14	SE	2D	T₂	120	540	5,0	3	1	192x192	200x200
15	SE	2D	T₂	90	1260	5,0	8	1	192x160	160x160
16	TSE	2D	T₂	120	570	5,0	3	1	192x192	200x200
17	TSE	2D	T ₂	120	570	5,0	3	3	192x192	200x200
18	HSE	2D	T ₁	12	110	4,5	3	4	192x192	200x200
19	SE	3D	T ₁	8	30	6,2	9	1	192x160x32	160x160x100
20	SE	3D	T ₁	8	30	6,2	9	1	192x192x32	200x200x100
21	SE	3D	T ₂	16	35	1,3	26	1	192x128x24	120x120x40
22	SE	3D	T ₂	16	35	6,6	7	1	192x192x32	200x200x70
23	IR	2D	T ₁	18 T _I =200	780	5,0	5	1	192x192	200x200
24	IR	2D	T ₁	18 T _I =400	780	5,0	5	1	192x192	200x200
25	IR	2D	T ₁	18 T _I =400	780	5,0	5	1	192x192	200x200
26	STIR	2D	T ₁	28 T _I =80	780	5,0	5	1	192x192	200x200
27	ME	2D	D.P.	Eco 1 T _E = 38	450	5,0	3	1	192x192	200x200
28	ME	2D	T ₂	Eco 2 T _E = 90	450	5,0	3	1	192x192	200x200
29	ME	2D	D.P.	Eco 1 T _E = 38	450	5,0	3	3	192x192	200x200
30	ME	2D	T ₂	Eco 2 T _E =90	450	5,0	3	3	192x192	200x200
31	TME	2D	D.P.	Eco 1 T _E = 38	450	5,0	3	1	192x192	200x200
32	TME	2D	T ₂	Eco 2 T _E = 90	450	5,0	3	1	192x192	200x200
33	TME	2D	D.P.	Eco 1 T _E = 38	450	5,0	3	4	192x192	200x200
34	TME	2D	T ₂	Eco 2 T _E = 90	450	5,0	3	4	192x192	200x200
35	GE	2D	T ₁	8	200	5,0	5	1	192x192	130x130
36	GE	2D	T ₁	8	200	5,0	5	1	192x192	200x200
37	GE	2D	T ₁	8	200	5,0	5	2	192x192	200x200
38	GE	2D	T ₁	8	225	5,0	5	1	192x192	200x200
39	GE-STIR	2D	T ₁	12 T _I =75	650	5,0	5	1	192x192	200x200
40	GE-STIR	2D	T ₁	12 T _I =75	475	5,0	5	1	192x192	200x200

T_E: tiempo eco, T_R: tiempo de repetición, N_{ex}: número de excitaciones, FOV: campo de visión

SE: secuencia espín-eco.

TSE: secuencia similar a "fast spin eco" utiliza la media transformada de Fourier y dos ecos para obtener dos imágenes, una contrastada en densidad protónica DP y otra en T₂.

HSE: secuencia SE con muy corto T_E para obtener imagen altamente contrastada en T₁.

IR: secuencia inversión recuperación.

STIR: secuencia inversión recuperación con corto tiempo de inversión T_I para obtener imágenes con señal nula de las estructuras con grasa.

ME: secuencia multieco con dos ecos para obtener imágenes contrastadas en DP y en T₂.

TME: secuencia similar a "fast spin eco" para imágenes contrastadas en DP y en T₂.

GE: Secuencia de eco gradiente.

GE-STIR: eco gradiente con inversión recuperación para obtener imágenes con señal nula de las estructuras con grasa.

En cada secuencia se escogió un solo plano de corte central que incluyera el hueso, y en varias de las secuencias se utilizó el mismo fruto en la misma posición. Los frutos fueron ubicados en el centro de la bobina de RF.

4.5.2. Cítricos

En esta clase de frutos se evaluaron algunas de las secuencias probadas anteriormente en melocotones, para analizar como funcionaban con cítricos, y se evaluaron además modificaciones de algunos parámetros de éstas secuencias. También se probaron otras secuencias y parámetros diferentes, no evaluadas en melocotones (turbo eco espín, inversión recuperación y gradiente eco). Para éste estudio se emplearon 12 frutos de distintas variedades, tales como Valencia Late, Navelina y Calamondín. Cada secuencia se aplicó para obtener imágenes en varios planos coronales, paralelos al plano ecuatorial del fruto y perpendiculares al eje imaginario que contiene al pedúnculo y al cáliz.

En la Tabla 4.2 se indican las 31 secuencias y los parámetros estudiados. Las primeras 22 secuencias permitieron obtener contraste en T_1 y las restantes 9 en T_2 . Las secuencias (1, 5, 23, 26 y 28) resaltadas en negrita corresponden a las secuencias que fueron probadas y seleccionadas para el caso de los frutos de hueso.

Tabla 4.2. Secuencias y parámetros evaluados en los frutos de cítricos.

Secuencia #	Tipo	Contraste	T_E ms	T_R ms	Espesor mm	N_{ex}	Matriz m x n	FOV mm x mm	S/R RMI
1	Eco espín	T_1	18	110	5	4	192x192	200x200	67
2	Eco espín	T_1	18	110	10	4	192x192	200x200	123
3	Eco espín	T_1	18	110	10	1	192x192	200x200	57
4	Eco espín	T_1	18	110	10	4	192x192	160x160	85
5	Eco espín	T_1	18	170	5	4	192x192	200x200	100
6	Eco espín	T_1	18	170	10	4	256x256	100x100	33
7	Eco espín	T_1	18	170	10	4	192x192	160x160	128
8	Eco espín	T_1	18	170	10	4	192x192	200x200	200
9	Eco espín	T_1	24	500	5	3	192x192	200x200	203
10	Eco espín	T_1	24	500	5	3	192x192	160x160	130
11	Eco espín	T_1	24	500	10	3	192x192	100x100	102
12	Eco espín	T_1	24	500	5	1	192x192	160x160	65
13	Eco espín	T_1	24	500	10	1	192x192	160x160	150
14	Eco espín	T_1	18	1000	5	1	192x192	200x200	121
15	Inversión Recuperación*	T_1	18	780	5	1	192x192	200x200	133
16	Inversión Recuperación*	T_1	18	780	10	1	192x192	200x200	267
17	Gradiente eco+	T_1	8	200	5	1	192x192	200x200	71

18	Gradiente eco+	T ₁	8	200	5	2	192x192	200x200	101
19	Gradiente eco+	T ₁	8	200	5	2	192x192	130x130	43
20	Gradiente eco+	T ₁	8	275	5	2	192x128	200x200	131
21	Gradiente eco☆	T ₁	8	180	5	2	192x192	200x200	85
22	Gradiente eco☆	T ₁	8	400	5	2	192x192	200x200	104
23	Eco espín	T₂	120	540	5	1	192x192	200x200	90
24	Eco espín	T ₂	120	540	10	1	192x192	160x160	115
25	Eco espín	T ₂	90	540	5	1	192x192	200x200	167
26	Turbo eco espín	T₂	120	570	5	1	192x192	200x200	70
27	Turbo eco espín	T ₂	120	570	10	1	192x192	160x160	90
28	Eco espín	T₂	90	1260	5	1	192x160	160x160	147
29	Eco espín	T ₂	80	1000	10	1	192x192	200x200	500
30	Eco espín	T ₂	120	1500	5	1	192x192	200x200	117
31	Eco espín	T ₂	90	1500	5	1	192x192	160x160	136

* Tiempo de inversión = 400ms, + Ángulo de basculación = 35°, ☆ Ángulo de basculación = 90°

4.5.3. Procesamiento digital de las imágenes y análisis de criterios de calidad

Tanto en los frutos de hueso como en los cítricos se siguió, para analizar las imágenes RMI, el procedimiento general esquematizado en el diagrama de flujo de la Figura 4.12. Este procedimiento fue planteado por el autor y se basó en métodos de análisis de imágenes RMI ampliamente usados (Hornak 1996; Kastter *et al.*, 1997; Burdon y Clark 2001; Clark y MacFall, 2003; Lammertyn *et al.*, 2003 a-b). Primero se seleccionó una región de interés ROI rectangular correspondiente al fruto. En ésta se seleccionaron y muestrearon ROI's correspondientes al fondo y a las diferentes estructuras internas. Luego se determinó la intensidad media de la señal, en nivel de gris, de los píxeles de estas regiones y se calculó la desviación típica (DE) de los píxeles de la región del fondo. Para determinar la señal media de los píxeles y su desviación típica se emplearon dos algoritmos escritos en lenguaje C-script (ver numeral 4.8 relacionado con las herramientas de programación). Las sentencias de estos algoritmos se muestran en los Anexos A5 y A6, respectivamente). Con la información estadística obtenida se determinaron en todas las secuencias, utilizando la ecuación (2.53), citada en la revisión bibliográfica, el contraste entre la región de la pulpa del fruto y el fondo, y el contraste i_j entre estructuras contiguas, y con la ecuación (2.52), la relación S/R_{fondo} para el fondo de la imagen. Además, en cada imagen se registró la relación S/R de la imagen RMI entregada por el equipo, y si se presentaba o no algún tipo de artefacto. Finalmente, se calculó a partir de la ecuación (2.43) el volumen del voxel como indicador de la resolución de la imagen RMI original.

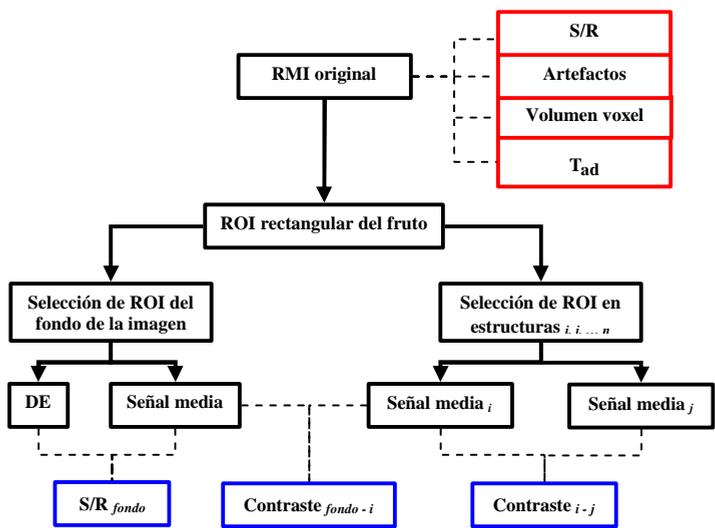


Figura 4.12. Procesamiento digital de las imágenes RMI.

En el caso de los melocotones se muestrearon todos los píxeles de las regiones de pulpa y hueso, mientras que en los cítricos se muestrearon el flavedo, el albedo, el tabique, la pulpa y la columela, con tres repeticiones y con un tamaño por muestra que varió entre 20 y 100 píxeles, dependiendo de la estructura. Las muestras fueron escogidas, de forma manual, en sitios diferentes de la imagen para obtener mayor representabilidad de las señales emitidas por cada una. En la Figura 4.13 se muestran las regiones de interés seleccionadas y procesadas en los dos tipos de frutos estudiados.

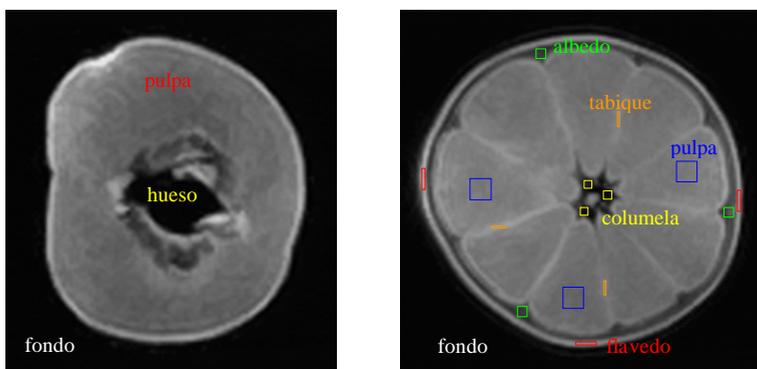


Figura 4.13. Regiones de interés ROI procesadas.

El procedimiento anterior permitió obtener información antes del procesamiento (salidas rojas en el diagrama de flujo) y después del procesamiento (salidas azules), que fue usada para establecer los criterios de calidad indicados en la Tabla 4.3. Estos criterios fueron definidos por el autor para seleccionar las mejores secuencias, contrastadas en T_1 y en T_2 , de todas las evaluadas en los dos tipos de fruto.

Tabla 4.3. Criterios de calidad definidos para la selección de secuencias.

#	Criterio	Melocotones	Cítricos
1	Relación S/R	> 60 %	> 60 %
2	Artefacto	Ausencia	Ausencia
3	Tiempo de adquisición	< 300 s	< 300 s
4	Volumen de voxel	< 6 mm ³	< 7 mm ³
5	Contraste, nivel gris	$C_{\text{pulpa-fondo}} > 70$ (en T_1 y T_2) $C_{\text{pulpa-hueso}} > 30$ (en T_1 y T_2)	$C_{\text{pulpa-tabique}} > 20$ (en T_1) $C_{\text{pulpa-tabique}} > 15$ (en T_2)
6	Relación S/R <i>fondo</i>	> 50 %	> 100 %

Los criterios fueron aplicados según el tipo de fruto, en el orden arriba presentado, a todas y cada una de las imágenes organizadas por grupos de secuencias con la misma ponderación de contraste. Si la imagen obtenida con la secuencia i cumplía el criterio 1 pasaba a ser evaluada con el criterio 2, en caso contrario se eliminaba dicha secuencia, y así sucesivamente hasta llegar al criterio 6.

Para el caso de melocotones, las imágenes se agruparon en 3, el primer grupo fue de 24 imágenes correspondientes a las secuencias ponderadas en T_1 , el segundo fue de 12 imágenes contrastadas en T_2 , y el último fue de 4 imágenes contrastadas en DP. Para los cítricos, resultaron dos grupos, el primero de 22 imágenes contrastadas en T_1 y el otro de 9 contrastadas en T_2 . Cabe aquí anotar que se decidió utilizar, para los cítricos, entre todos los contrastes calculados, el contraste pulpa-tabique, como criterio de selección debido a que este presentó para todos los frutos estudiados, en promedio, el menor valor de todos los contrastes, como se verá más adelante en el capítulo de resultados. Además, la dimensión de un tabique es muy inferior a dimensión de las demás estructuras, por lo cual resulta muy importante que la secuencia seleccionada sea capaz de contrastar bien esta estructura respecto a la pulpa.

Las imágenes que cumplieron con todos los 6 criterios establecidos, fueron seleccionadas, tanto en los melocotones como en los cítricos, como las imágenes de las secuencias que permiten obtener la mejor calidad del interior de estos tipos de frutos. En los melocotones se escogió sólo la secuencia que presentó la mayor relación S/R, antes del procesamiento digital, para ser evaluada en ensayos preliminares de fruta con deterioros internos. En los cítricos se escogieron dos secuencias, una en T₁ y otra T₂ para su evaluación posterior en la detección de daños internos.

4.6. Preparación de muestras y adquisición de las imágenes

4.6.1. Melocotones

4.6.1.1. Ensayo preliminar

Se hizo un seguimiento a la evolución en el tiempo de la señal media y del contraste (nivel de gris) que presentan entre diferentes regiones de imágenes obtenidas por RMI, a partir de 17 frutos de melocotón, variedad Baby Gold de pulpa amarilla, afectados por la inoculación del hongo *Penicillium digitatum*, por larvas de *Ceratitis capitata* y por muy baja temperatura de almacenamiento.

- **Inoculación de *Penicillium digitatum* Saccardo.** En esta primera experiencia de detección de daño, se decidió usar *P. digitatum* por la rapidez de consecución y obtención de sus esporas. Aunque es un hongo que produce importantes podredumbres en los melocotones, sus síntomas son externos y se utilizó aquí, solo con el propósito de propiciar una podredumbre interior de los tejidos de la pulpa para buscar detectarla con RMI. Se utilizaron siete frutos completamente sanos adquiridos en un supermercado local, que fueron etiquetados del 1 al 7 para aplicar en cada uno de ellos un método de inoculación artificial de una solución del hongo, con una concentración de esporas previamente preparada, como se indica en la Tabla 4.4.

Los frutos 3 y 7 se utilizaron como control y fueron inoculados en forma idéntica con agua destilada para contrastar los métodos de inoculación 1 y 2, respectivamente.

Tabla 4.4. Métodos de inoculación y concentración de esporas empleados.

Fruto No.	Método de inoculación	Concentración (# esporas / ml)
1	1*	10 ³
2	1	10 ⁵
3	1	0 (agua destilada)
4	2**	10 ³
5	2	10 ⁴
6	2	10 ⁵
7	2	0 (agua destilada)

* El fruto fue partido en dos y se retiró la porción menor, en la porción mayor sobre el mesocarpio se depositaron 4 gotas de la solución con esporas, y se unieron nuevamente las dos porciones sujetándolas con goma y cinta Parafilm®.

** El fruto fue inyectado en cuatro puntos ecuatoriales diametralmente opuestos utilizando una jeringuilla con $\pm 0,01$ ml de solución con esporas a 20 mm de profundidad desde la piel. Al retirar la aguja del fruto, se limpio el rebose de solución sobre la piel con algodón impregnado de etanol, el orificio se cubrió con cinta sujeta al fruto con una goma.

Después de inocular los frutos se dio inicio al experimento. Los frutos permanecieron, durante todo el ensayo, separados unos de otros dentro de bolsas de polietileno negro y almacenados en el Laboratorio de Resonancia Magnética, a una temperatura media de 24°C y una humedad relativa media fuera de las bolsas del 53%.

- **Daño por larvas de *Ceratitís capitata* Wied.** Se utilizaron cuatro frutos picados por *C. capitata* en el momento de la cosecha y en los que la picadura pasaba muy desapercibida. Los frutos, que fueron previamente almacenados durante 4 días en cámara a 12°C y HR del 73%, al inicio del ensayo presentaban una apariencia externa sana y apenas se apreciaba en ellos unos cuantos puntos oscuros en la piel, por los cuales el insecto produjo la infección en campo. Estos frutos fueron lavados y desinfectados externamente con una solución de hipoclorito de sodio y etanol antes de iniciar el ensayo, con el fin de dejar limpia la piel de la fruta y evitar el posterior desarrollo de hongos alrededor de las picaduras. Las exploraciones con el equipo de RM se realizaron durante siete días en tres ocasiones; la primera, al inicio del ensayo (día 0); la segunda, al 4 ó 5 día; y la tercera, al 6 ó 7 día. Los frutos también permanecieron durante el ensayo almacenados en el Laboratorio de Resonancia bajo las mismas condiciones de las muestras anteriores.

- **Almacenamiento a muy baja temperatura.** Se utilizaron seis frutos que fueron almacenados previamente por dos días en cámara a 10°C hasta el comienzo del ensayo, momento en que fueron divididos en dos grupos de tres y cada grupo se codificó con las letras C ó N. El grupo N fue almacenado en

una frigorífico comercial a una temperatura media de 1°C y el grupo C fue almacenado en el congelador de la misma, a una temperatura media de -10°C con el propósito de asegurar el congelamiento de los frutos. La humedad relativa media registrada en el interior del frigorífico fue del 60%. Se realizaron tres exploraciones de RMI; al inicio, a los dos días y a los cinco días de almacenamiento. En cada exploración los frutos se trasladaron al equipo envueltos en papel plata y utilizando una nevera portátil para reducir el aumento de su temperatura.

Adquisición y procesamiento de las imágenes

En todas las muestras del ensayo se utilizó para la reconstrucción de las imágenes, la secuencia eco espín contrastada en T_1 (secuencia #10 en la Tabla 4.1), escogida como mejor secuencia en el estudio de selección antes explicado. Los parámetros usados fueron: $T_E=18$ ms, $T_R = 170$ ms, $N_{ex} = 4$, una matriz de 192x192, un FOV de 200x200 mm² y cinco cortes de 10 mm de espesor. Las exploraciones con esta secuencia se hicieron en diferentes tiempos según las muestras preparadas para los diferentes daños como se indica en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Tiempo de exploración de las muestras en ensayo preliminar.

Tiempo	Muestras preparadas con		
	<i>P. digitatum</i>	<i>C. capitata</i>	Baja Temperatura
Inicio	X	X	X
20 horas	X		
48 “	X		X
92 “	X		
4 días		X	
5 “		X	X
6 “		X	
7 “		X	

El procesamiento digital usado en las imágenes RMI resultantes de las exploraciones se esquematiza en el diagrama de flujo de la Figura 4.14.

Primero se realizó la calibración de los píxeles de la imagen en la dirección x y y con las dimensiones reales de la fruta. Para esto se consideraron las dimensiones del campo de visión FOV, ancho (dirección x) y alto (dirección y), con las cuales se reconstruyó la imagen, y se contabilizó el número de píxeles presentes a lo largo de una línea, en estas dos dimensiones,

en la imagen RMI digitalizada a 8 bit. En las imágenes obtenidas en este ensayo preliminar se tiene que 1 píxel=0,4 mm, para ambas direcciones.

De la imagen RMI original se seleccionó una ROI rectangular correspondiente al fruto y se separó el fondo, aprovechando que éste era más oscuro que la pulpa del fruto. A continuación, a la imagen sin fondo se le aplicó un filtro de media para restarle ruido a los píxeles de la pulpa. Luego, utilizando una función de selección, basada en la luminosidad de los píxeles con determinada tolerancia, se separaron las regiones de la pulpa, el hueso, la semilla y el daño.

En el caso de las muestras inoculadas con el hongo, la región afectada presentaba píxeles más brillantes localizados alrededor de la zona inoculada. En los frutos afectados por larvas de mosca, el daño se presentó como zonas con píxeles más oscuros localizados dentro del mesocarpio. En los frutos congelados el daño se manifestó en un oscurecimiento de los píxeles correspondientes a la semilla, al hueso y parte del mesocarpio. En cada una de las anteriores regiones, para los diferentes tiempos de exploración, se construyeron los histogramas de distribución de niveles de gris, se determinó el área, en mm^2 , de las regiones de pulpa y daño, la señal media de los píxeles, en nivel de grises, y se calculó el contraste entre regiones, también en nivel de grises. En las muestras tratadas a muy bajas temperaturas, las señales medias fueron comparadas mediante el test de mínima diferencia significativa a un nivel del 5%. Adicionalmente, antes de las exploraciones, los frutos se pesaron para registrar la pérdida de agua durante el ensayo. Al final fue realizado, en cada fruto, para la comprobación visual del daño, un corte en un plano similar al plano de las imágenes RMI adquiridas.

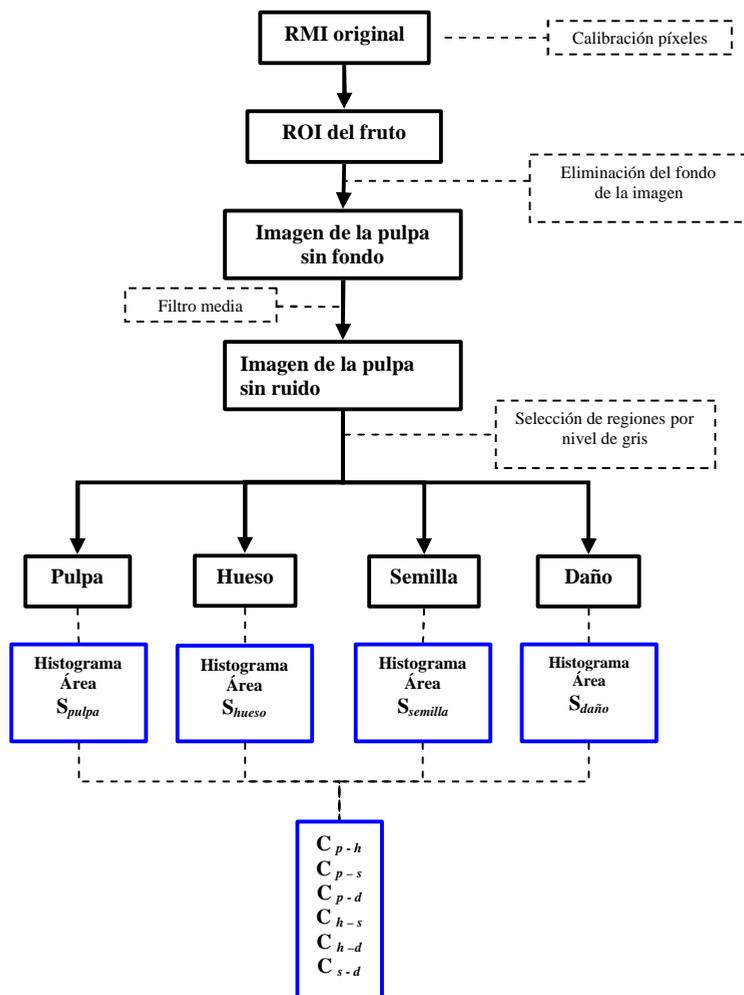


Figura 4.14. Procesamiento de imágenes del ensayo preliminar.

4.6.1.2. Frutos con hongo saprofito

Para este estudio se empleó una partida de 200 melocotones Calanda de la variedad “Amarillo tardío” (clon “Jesca”), de piel amarilla y hueso adherido, cosechados con una semana de antelación al estado de maduración de recolección, en una plantación comercial de tres años de edad, localizada en Puig Moreno-Teruel (ver Anexo A3). Los frutos fueron recolectados a mano en 20 árboles diferentes de la parcela, teniendo cuidado que estos no presentaran síntomas externos de ningún tipo de daño.

Posteriormente fueron transportados con una temperatura entre 10 y 15°C hasta el laboratorio donde fueron lavados y desinfectados por inmersión en una solución de fungicida. La humedad superficial fue secada utilizando aire forzado a temperatura ambiente durante 5 horas.

En un muestreo inicial, se observó que la partida contenía frutos con daño interno (Figura 4.5) producido posiblemente por *Alternaria sp.*, hongo saprofito que pudo penetrar en los frutos, vía peduncular, al abrirse el hueso por algún factor fisiológico producido, según Lizar *et al.* (1993), por prácticas culturales inadecuadas, como el ferti-riego y el aclareo, cuando son realizadas durante el período de endurecimiento del hueso.

De los 200 frutos, 182 fueron seleccionados a mano, de manera que tuviesen un tamaño uniforme, los cuales fueron almacenados durante 4 semanas en un cuarto frío a una temperatura que varió durante el experimento entre 1 y 5°C y con una humedad relativa que osciló entre el 75 y el 95%.

Las exploraciones de RMI se hicieron en los frutos, durante las primeras dos semanas de almacenamiento, cada tres días. A partir del día 17, y hasta el día 32, cuando finalizó el ensayo, las exploraciones fueron realizadas diariamente. En promedio se ensayaron 9 frutos en cada día de exploración. Se aplicaron dos secuencias espín eco SE, contrastadas en T₁ y en T₂, con los parámetros programados que se indican en la Tabla 4.6. La secuencia en T₁ fue aplicada en dos planos, ecuatorial y longitudinal, y la secuencia en T₂ fue aplicada solo en el plano ecuatorial. En 148 frutos se hizo sólo una exploración, tras la cual se procedió a abrir el fruto para comprobar en su interior la presencia o no del daño ocasionado por el hongo saprofito. En los 34 frutos restantes se repitieron exploraciones y tan solo fueron abiertos después de realizarles la última exploración. Para los frutos que no presentaron el daño, las imágenes RMI fueron empleadas como testigos en el experimento.

4.6.1.3. Daño por frío durante el almacenamiento

En este experimento se estimuló el desarrollo de los síntomas de daño por frío en melocotones almacenados durante un mes, y se realizaron medidas destructivas, simultáneamente con las exploraciones de los frutos, para tener índices de referencia al momento de analizar los resultados obtenidos con la tecnología de RMI.

Para lograr esto se emplearon 150 melocotones Calanda de la variedad “Amarillo tardío” (clon “Jesca”), de piel amarilla y hueso adherido, cosechados también como en el experimento anterior, con una semana de antelación al estado de maduración de recolección en una finca de Puig Moreno-Teruel. Los frutos, cosechados a mano en 15 árboles diferentes no presentaron síntomas externos de ningún tipo de daño (La caracterización de la fruta se muestra en el Anexo A3). Los frutos fueron transportados al laboratorio donde se les realizó el mismo tratamiento previo del experimento anterior.

Los 150 frutos, fueron divididos en dos grupos de 75. El primero fue almacenado en una cámara a una temperatura de 5°C y humedad relativa del 99% (tratamiento para inducir el daño por frío), y el otro fue almacenado a una temperatura media de 1°C y humedad relativa del 99% (tratamiento control). Ambos grupos permanecieron bajo estas condiciones durante 22 días (fase de almacenamiento previo).

Los frutos de cada tratamiento fueron explorados usando RMI en dos planos, ecuatorial y longitudinal, con dos secuencias espín eco contrastadas en T_1 y en T_2 con los parámetros que se indican en la Tabla 4.6. En cada tratamiento se marcaron 5 frutos para realizar el seguimiento del daño interno mediante exploraciones de RMI durante todo el experimento. En esta fase se realizaron las exploraciones cada 3 días y se realizó el registro del peso, el color de la epidermis exterior (colorímetro, coordenadas CIE $L^*a^*b^*$), la firmeza (penetrómetro, punta de 8 mm) y el contenido de azúcares del zumo (refractómetro portátil), en los frutos de ambos tratamientos.

A partir del día 23 los frutos de ambos tratamientos fueron trasladados a una cámara común, de maduración, con una temperatura media de 20°C y una humedad relativa del 80%, en donde permanecieron 10 días más. Durante este periodo se evaluó diariamente, la calidad interna de siete frutos por tratamiento, mediante exploración con las secuencias RMI antes mencionadas. Después de la exploración, en cada fruto se registró nuevamente el peso, el color de la epidermis, la firmeza y la concentración de sólidos solubles (CSS), y finalmente se procedió a realizarles una disección, en el mismo plano de la exploración RMI, para registrar el color de la pulpa y realizar una inspección visual de síntomas de daño por frío (índices de textura y pardeamiento), utilizando la escala y sintomatología propuesta por Crisosto *et al.*, 2003 (Anexo A4). Durante esta fase del experimento también se exploraron

diariamente los cinco frutos de seguimiento por tratamiento, para registrar su evolución durante la maduración. En éstos, a medida que se detectaban síntomas de marchitamiento en la piel, se procedía a realizarles las mediciones destructivas.

Los valores medios para cada una de las propiedades registradas en los frutos, en cada período de almacenamiento, fueron comparados entre tratamientos y para cada tratamiento se compararon por día de exploración; mediante prueba LSD al 95%, para establecer el momento de la aparición los síntomas, el porcentaje de frutos afectados y el grado de daño por frío en cada tratamiento. Los resultados obtenidos se compararon con la detección automática, basada en las imágenes RMI, que realizaron los diferentes algoritmos desarrollados y que más adelante se explican.

4.6.1.4. Frutos con picadura de *Ceratitis capitata*

En este experimento se produjeron artificialmente, en condiciones de laboratorio, picaduras de mosca del Mediterráneo sobre 15 frutos de melocotón de la variedad Baby Gold, con un calibre medio de 60 mm y una categoría comercial clase I. Para esto los frutos fueron trasladados al laboratorio de cría de mosca del IVIA y se dejaron allí, durante 24 horas, en una cámara con hembras y machos de *C. capitata*, recién emergidos de pupas. Las condiciones medias de la cámara en cuanto a temperatura y humedad relativa, fueron de 23,5°C y 75%, respectivamente.

Posteriormente, los frutos se retiraron de la cámara para ser analizados en un estereoscopio y marcar las regiones de picadura hechas por la mosca sobre la piel del melocotón. En ocho de los frutos, estas marcas se usaron luego como referencia para localizar dos planos de corte, longitudinal y ecuatorial, para ser usados durante la reconstrucción de las imágenes RMI. En los siete frutos restantes se emplearon dos planos de corte, longitudinal y ecuatorial, localizados siempre en el centro de la fruta, para obtener en cada día de exploración el mismo plano en las imágenes RMI. Antes de exponer los frutos en la cámara con las moscas, se hizo una exploración inicial para obtener las imágenes testigos de los frutos sin daño, y luego se realizó una exploración por día, durante los cuatro días siguientes, para obtener imágenes con daño. También se registraron fotos digitales del exterior del fruto en cada día de exploración. Solamente se aplicó en este experimento un tipo de secuencia RMI, y fue la espín eco SE contrastada en T_1 , cuyos parámetros

empleados se muestran en la Tabla 4.6. Se utilizó solo esta secuencia en este experimento debido a que la secuencia SE en T_2 no permitió contrastar bien, en las imágenes, las picaduras de la pulpa.

Las dos secuencias espín eco, contrastadas en T_1 y en T_2 (Tabla 4.6) utilizadas para estudiar estos daños internos producidos en los melocotones, fueron buscadas a partir de las secuencias escogidas en el estudio de selección explicado antes en el numeral 4.5.1, y fueron definidas también, como resultado de la búsqueda de secuencias para obtener imágenes de alta calidad en cítricos, procedimiento explicado, también, en el numeral 4.5.2. Además, estas secuencias mostraron, en exploraciones preliminares, un alto contraste entre las diferentes estructuras del fruto de melocotón, permitiendo una muy buena calidad de imagen. Las razones de escogencia de estas dos secuencias para estos experimentos se discutirán con más detalle en el capítulo de resultados. Los parámetros y planos de exploración empleados en cada uno de los experimentos realizados se indican con una “X” en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Secuencias, parámetros y planos de exploración utilizados en los experimentos de RMI con melocotones.

SECUENCIA	Espín Eco en T_1		Espín Eco en T_2	
	T_R , ms	500	T_R , ms	1500
T_E , ms	24	T_E , ms	90	
FOV, mm x mm	160x160	FOV, mm x mm	160x160	
Matriz,	192x192	Matriz	192x192	
Espesor, mm	10	Espesor, mm	5	
# cortes	1	# cortes	1	
Nex	1	Nex	1	
EXPERIMENTO	Plano Ecuat.	Plano long.	Plano Ecuat.	Plano Long.
				
Hongo en campo	X	X	X	Secuencia no usada*
Daño por frío en almacenamiento	X	X	X	X
Picadura de mosca	X	X	Secuencia no usada*	

* La secuencia espín eco, contrastada en T_2 , en este plano de corte, no se utilizó para detectar este daño debido al poco contraste obtenido entre los tejidos afectados y la pulpa.

El número de frutos empleados en cada experimento con melocotones fue diferente debido a las condiciones en las que se provocaban los daños. Por ejemplo, en el caso de daño por frío se pudo utilizar mayor cantidad de fruta por el volumen de las cámaras de almacenamiento mientras para el daño por picadura de mosca, el espacio de las cámaras de cría de mosca resultó un factor limitante.

4.6.2. Cítricos

4.6.2.1. Inoculación de hongos

Fueron recolectadas a mano 30 naranjas, variedad Valencia Latex, de una parcela del IVIA. De estas se escogieron 16 frutas sin daño visible y se lavaron mediante inmersión de 5 minutos en una solución de agua destilada con hipoclorito de sodio al 5% y luego se desinfectaron, también por inmersión durante 5 minutos, en una solución de fungicida comercial preparada al 0,1%. Posteriormente, los frutos fueron divididos en 4 grupos de 4 y colocados en bandejas que se dejaron en una cámara de secado con radiación ultravioleta de un día para otro. Al siguiente día, en tres de los grupos se procedió a la inoculación de micelio de tres clases de hongos, *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea* y *Diplodia natalensis*. Los hongos habían sido cultivados en el Laboratorio de Micología del IVIA durante 15 días, en placas Petri con agar nutritivo como medio de cultivo (Figura 4.15).



Figura 4.15. Hongos inoculados en fase de micelio.

El restante grupo de frutos fue dejado como control realizando sobre ellos el mismo procedimiento de inoculación, pero sin introducir hongo alguno. El método de inoculación consistió en realizar un orificio a través del pedúnculo del fruto con una aguja de 2 mm de diámetro y hasta una profundidad de 40 mm, luego se recogió con la punta de un bisturí una pequeña cantidad de micelio del medio de cultivo, y se introdujo con la punta

de un alambre fino en el interior del orificio, para finalmente sellar el orificio con cera caliente (Figura 4.16). Todos los instrumentos empleados fueron flameados para evitar en los frutos la contaminación de otros patógenos.



Figura 4.16. Método de inoculación del micelio.

Los tres grupos de frutos con hongo y el grupo control se depositaron, al finalizar la inoculación, en cristalizadores previamente desinfectados con alcohol. El fondo de cada cristalizador se cubrió con un papel estéril, humedecido con agua también estéril, para mantener la humedad relativa alta en el interior de la caja durante todo el experimento. Cada fruto se colocó sobre una placa de Petri, para evitar el contacto directo con el agua, y por cada cristalizador se introdujeron cuatro frutos marcados previamente. Cada cristalizador fue sellado a presión con un plástico transparente y una goma (Figura 4.17).



Figura 4.17. Cristalizadores con los frutos inoculados.

Los cristalizadores con los frutos fueron trasladados al Laboratorio de Resonancia Magnética en donde permanecieron durante todo el experimento bajo unas condiciones externas de temperatura media de 24,7 °C y de humedad relativa media del 35,6%. La temperatura y humedad relativa en el interior de los cristalizadores no fueron registradas.

Las adquisiciones de las imágenes se realizaron al inicio, y al completar el día 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12, 13 y 14 de almacenamiento. Las

secuencias utilizadas fueron las dos escogidas en el estudio de selección (numeral 4.5.2.). Estas secuencias fueron aplicadas en dos planos, ecuatorial y longitudinal, perpendiculares entre si. Los cortes (imágenes) obtenidos en cada día de exploración, según la secuencia y el plano aplicado, en los cuatro frutos de cada uno de los grupos de tratamientos se indican en la Tabla 4.7.

Cada fruto fue explorado hasta el día en que se evidenció externamente la podredumbre producida por el hongo. Los 4 frutos del tratamiento control se exploraron, respectivamente, hasta el día 9, 12, 13 y 14. Todos los frutos, el día que se realizó la última exploración, fueron abiertos para verificar la presencia o ausencia del daño interior. Después, y de acuerdo con los resultados de detección automática, se determinó el tiempo de anticipación de la detección del daño de las imágenes RMI a la aparición de los síntomas externos en la fruta.

Tabla 4.7. Número de cortes (imágenes) obtenidas por secuencia y plano.

Fruto #	SE 500-24-1, espesor 10mm (T ₁)		SE 1500-90-1, espesor 5mm (T ₂)	
	Ecuatorial	Longitudinal	Ecuatorial	Longitudinal
				
1	5	1	0	1
2	5	1	0	1
3	5	1	0	1
4	5	1	5	0

Posteriormente se llevo a cabo, en un nuevo ensayo, el mismo procedimiento de inoculación utilizando un total de 60 naranjas de la variedad Navel Barnfield. Las naranjas fueron divididas en 12 grupos de cinco frutos que se colocaron en esta ocasión en cajas plásticas con tapa hermética. Las 20 naranjas de cuatro cajas fueron inoculadas con micelio de *A. citri*, otras 20 se inocularon con micelio de *B. citrenea* y las restantes 20 fueron utilizadas como frutos de control. Todos los frutos se llevaron al Laboratorio de Resonancia Magnética donde permanecieron a una temperatura media de 22°C y una humedad relativa del 31% durante el tiempo que se extendió el ensayo.

Las exploraciones en este ensayo se realizaron al inicio, y diariamente, durante 11 días, en las muestras con *A. citri* y durante 6 días en las muestras

con *B. citrenea*. Las secuencias utilizadas fueron las mismas del ensayo previo con hongos. Estas secuencias fueron aplicadas, en cada fruto, utilizando solo un corte en los planos ecuatorial y longitudinal, obteniendo de cada fruto explorado cuatro imágenes RMI. Después de la exploración cada fruto fue pesado, se registró con una cámara digital mediante fotografía tomada en el plano de la inoculación, y se determinó el índice de color medio de la epidermis (IC), para tres zonas periféricas al orificio de inoculación, usando las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ con un colorímetro portátil, mediante la siguiente expresión, utilizada específicamente para cítricos (Alcañiz *et al.*, 1999):

$$IC = \frac{1000a^*}{L^*b^*} \quad (4.1)$$

El último día de exploración todos los frutos se abrieron, con cortes en los planos ecuatorial y longitudinal, para verificar la presencia o ausencia del daño interior producido por el hongo, y se determinaron los grados Brix del zumo extraído de las cuatro porciones por fruto. Todas las propiedades anteriores registradas en los frutos inoculados con hongos, fueron comparadas estadísticamente con las registradas en los frutos de control y, a partir de los resultados de detección automática de los daños, se determinó el tiempo de anticipación de la detección del daño con RMI para los dos tipos de hongos inoculados.

4.6.2.2. Frutos afectados por heladas en campo

Una muestra de 15 frutos de naranja de la variedad Navel Barnfield, con apariencia externa sana, fue recolectada en una parcela experimental del IVIA en Moncada-Valencia, la cual había sido afectada por heladas ocasionando daños valorados como leves (categoría I, la fruta presentaba al abrirla algún gajo seco). Otra muestra de 20 frutos, también con apariencia externa sana, fue seleccionada de una muestra con 50 frutos de naranja variedad Lane Late, proveniente de Cheste-Valencia, afectada también por heladas en campo con daños en la fruta valorados como muy severos (categoría II, al abrir el fruto se observaban varios gajos secos, tabiques desviados y oquedades en la pulpa). Como frutos testigos para las dos categorías de daño por heladas, se utilizaron 20 frutos de naranja variedad Navelate, de apariencia externa sana, seleccionados a mano de una muestra de 50 frutos recolectada en una parcela experimental del IVIA, que no había sido afectada por las heladas de campo.

Todos los frutos fueron lavados, desinfectados y llevados al laboratorio de RM para realizarles las exploraciones durante un solo día. Las secuencias y planos de exploración utilizados según los tratamientos se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Secuencias y planos de exploración empleados para detectar daño por heladas en cítricos.

Tratamiento	Variedad	SE en T ₁ *		GE en T ₁ **		SE en T ₂ *	
		Ecu.	Long.	Ecu.	Long.	Ecu.	Long.
Daño Categoría I	Navel Barnfield	X	X			X	X
Daño Categoría II	Lane Late	X	X	X	X		
Testigo	Navelate	X	X	X	X		

* Secuencias Espín Eco utilizadas en los anteriores experimentos

** Secuencia Gradiente Eco

La secuencia Gradiente Eco que fue aplicada en este experimento empleó los siguientes parámetros: T_E de 8ms, T_R de 30ms, una excitación, ángulo de basculación de 45°, espesor de corte de 10mm, FOV de 200x100mm², y matriz de 192x128. Esta secuencia, que aún no se había ensayado y permite reconstruir la imagen RMI con baja calidad, fue empleada aquí por el mínimo tiempo de adquisición que utiliza (solo 4 segundos), muy interesante de estudiar para éste específico daño en los cítricos.

En todos los frutos se registró el peso, y la apariencia externa, en el plano ecuatorial y longitudinal, se determinó con el índice de color medio (IC) a partir de las coordenadas CIE L*a*b* obtenidas en tres puntos diferentes de la piel localizados en la zona ecuatorial. Después de la última exploración los frutos se abrieron para verificar en su interior la presencia o no de los síntomas del daño. Además se determinaron los grados Brix del zumo extraído de las porciones del fruto. Estas propiedades se compararon mediante prueba LSD al 95% entre los dos tratamientos con daño y el tratamiento control.

4.7. Algoritmos desarrollados para la detección de daños

Antes del procesamiento digital de las imágenes RMI obtenidas para cada tipo de muestra con daño (experimento) se crearon dos bases de datos, una con las imágenes en las que se apreciaba visualmente el daño y otra en las que no se observaba este (imágenes de control). Dentro de cada experimento, las imágenes a su vez fueron sub-agrupadas por tipo secuencia (espín eco en T₁ y espín eco en T₂) y por el plano de corte aplicado (ecuatorial y

longitudinal). De cada subgrupo de imágenes se seleccionó una muestra, completamente al azar, conformada por el 25% de las imágenes, las cuales se utilizaron para la fase entrenamiento de los algoritmos de procesamiento digital desarrollados para detectar de manera automática el daño en cada experimento. El restante 75% de las imágenes en cada subgrupo fue utilizado para la fase de validación del respectivo algoritmo. Esta clasificación se llevó a cabo tanto en las imágenes RMI obtenidas en los experimentos de melocotones como en los realizados con cítricos.

4.7.1. Algoritmos empleados en los melocotones

4.7.1.1. Detección de daños producidos por el hongo saprofito y por frío

El daño observado en las imágenes RMI afectadas por frío, se presentó en forma de pequeñas manchas distribuidas en forma irregular sobre gran parte de la pulpa del melocotón, mostrando en la pulpa una textura³ diferente a la presentada por la pulpa de un fruto sano. Para el caso de las imágenes RMI de melocotones con daño por hongo, estas manchas se presentaron sobre la pulpa en menor cantidad pero con mayor contraste. Después de realizar varios procesamientos preliminares de las imágenes, se encontró que ambos tipos de daños podrían tratarse de forma muy similar.

En la Figura 4.18 se esquematiza el algoritmo completo utilizado para la detección de estos dos tipos de daño. Previamente, se realizó la calibración de los píxeles con las dimensiones reales de los frutos. Para esto se elaboraron tres algoritmos (Anexo A6) que fueron usados tanto en las imágenes de melocotones como de cítricos, dependiendo del campo de visión y de la matriz de reconstrucción utilizada en la adquisición.

Durante la fase de entrenamiento de los algoritmos de detección, se buscaron los umbrales de segmentación de los contornos de fruto y se extrajeron los parámetros, con sus intervalos de clase, que fueron usados posteriormente para la validación del algoritmo con muestras independientes. A continuación se explica, de forma genérica, la estructura del algoritmo. No obstante y considerando que el procedimiento desarrollado para detección de los daños es, en sí mismo, una contribución de esta tesis, los detalles de las partes de cada algoritmo son presentados en el capítulo de resultados.

³ *disposición espacial de los niveles de gris de los píxeles en una determinada región.*

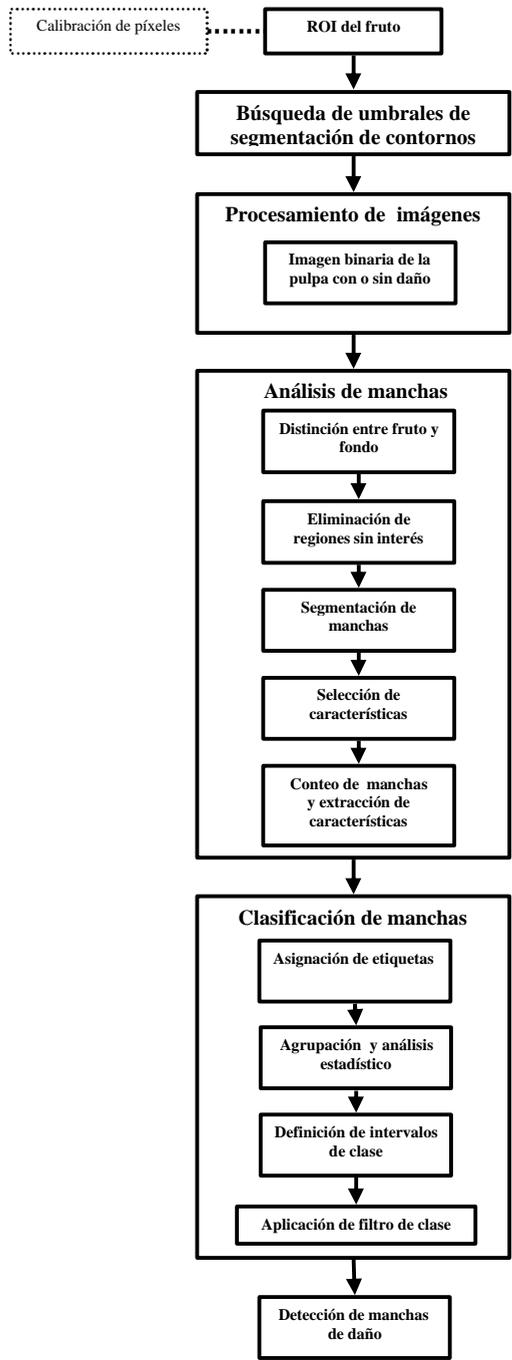


Figura 4.18. Esquema del algoritmo para la detección de daños por hongo saprofito y por frío en melocotón.

Estructura del algoritmo

Se destacan cuatro partes importantes (Figura 4.18) que son:

- **Segmentación de contornos.** Se desarrollaron tres algoritmos independientes para buscar el umbral de segmentación de los contornos de pulpa y el daño en las imágenes reconstruidas según el contraste y el plano de exploración.

- **Procesamiento de imagen.** Para obtener una imagen binaria de la pulpa con o sin daño se realizó un procesamiento basado en operaciones lógicas como la combinación “AND”, operaciones aritméticas como la sustracción de imágenes, operaciones morfológicas como la erosión para quitar las capas de píxeles más externas de la pulpa y la aplicación del filtro de media para eliminar manchas de ruido en la pulpa.

- **Análisis de manchas.** En esta parte primero se definió en la imagen qué píxeles hacían parte del fondo, del hueso y del daño y, qué píxeles hacían parte de la pulpa. Segundo, se fijó el tamaño de aquellas manchas que no se consideraban daño para descartarlas del análisis. Tercero, la imagen binaria se segmentó para dejar solo las manchas de interés. Cuarto, se seleccionaron las características: área, perímetro, longitud, compactación y las coordenadas del centroide (X_c , Y_c). Estas características, y todas las que se usaron en los demás algoritmos, son explicadas en el numeral 4.8.5 sobre el análisis de manchas y herramientas de programación. Quinto, se procedió al conteo y extracción de las características de las manchas.

- **Clasificación de manchas.** Primero, se asignaron etiquetas (nombres) a las manchas, tanto en las imágenes con daño como sin daño, de acuerdo con el tejido o la estructura a la que correspondían en el fruto. Segundo, para los dos tipos de imagen en cada subgrupo, las manchas con la misma etiqueta se agruparon y se analizaron en ellas parámetros de la estadística descriptiva, tales como la media, desviación típica y en los cuartiles. Tercero, se definieron a partir de los datos estadísticos, los intervalos de valores de clase para cada característica estudiada, y cuarto, éstos intervalos se usaron posteriormente, como filtros de eliminación de aquellas manchas que no interesaban ser detectadas durante la validación del algoritmo. Como resultado final, el algoritmo entrega una imagen procesada, con o sin manchas, indicando la detección o no detección del daño.

4.7.1.2. Detección del daño por picadura de mosca

El daño se presentó en las imágenes como pequeñas regiones de píxeles con un nivel de gris diferente al nivel de gris de los píxeles circundantes de pulpa. Estas regiones se localizaron en la periferia del fruto, en límites con la región correspondiente a la epidermis.

Para abordar la detección de este defecto se analizaron diferentes posibles alternativas, sin embargo el algoritmo empleado para la detección de éste daño fue, en su esquema y estructura general, similar al desarrollado para la detección del daño por frío y por hongo (Figura 4.18), con algunas diferencias que serán explicadas juntos con las alternativas de procesamiento en el capítulo de resultados.

4.7.2. Algoritmos empleados para la detección de daños en cítricos

Las regiones con daño por hongos se observaron en las imágenes RMI, como zonas localizadas con píxeles más oscuros que las regiones de otras estructuras como la pulpa, la columela y el albedo.

En el caso de los frutos afectados por las heladas, el daño se observó, en los dos planos de las imágenes RMI, como regiones de píxeles más oscuras que la región correspondiente a la pulpa. Estas zonas oscuras se presentaron entreveradas en la pulpa y su tamaño dependió de la categoría del daño. Los frutos con daño más severo presentaron mayor número y tamaño de estas zonas oscuras que los frutos con daño más leve.

Debido al alto contraste general presentado entre las regiones afectadas con relación a las regiones sanas de la fruta, se decidió desarrollar un algoritmo bastante similar para la detección supervisada de los dos tipos de daño. El esquema general del algoritmo se presenta en la Figura 5.30 del capítulo de resultados.

Estructura del algoritmo

Éste esta compuesto como en el caso de los algoritmos desarrollados para daños en melocotón por cuatro partes importantes:

- **Segmentación de contornos.** Consistió en la búsqueda de un umbral de segmentación de las regiones de daño en las imágenes usadas durante la fase de entrenamiento del algoritmo. Para las imágenes de cítricos afectados por hongos, este umbral se obtuvo a partir de la media y la desviación típica de las señales emitidas por éstas regiones y por las regiones de columela con daño, realizando para esto un muestreo en las imágenes de entrenamiento con daño. Para las imágenes de frutos con daño por heladas, debido al gran contraste presentado entre la pulpa y los daños se utilizó el algoritmo de búsqueda automática de umbral.

- **Procesamiento de imagen.** Consistió básicamente en la aplicación de un filtro de media para suavizar la imagen y en el caso de las imágenes con daño por helada y en las imágenes contrastadas en T_2 -plano ecuatorial, del ensayo con los tres hongos, se ejecutó el algoritmo de auto-segmentación para obtener una imagen binaria del fruto.

- **Análisis de manchas.** Para éste análisis se usó la imagen, en escala de grises o la imagen binaria, según se trataba de daño por hongo o por helada, respectivamente, y obtenidas durante la validación del algoritmo. En las imágenes de hongos contrastadas en T_2 -plano sagital las manchas se fijaron blancas y el fondo negro, en el resto de imágenes el fondo y el daño se estableció negro y la pulpa como blanca. Aquí se incorporaron para la validación del algoritmo los umbrales de segmentación determinados durante la fase de entrenamiento. Posteriormente, se seleccionaron las características de área, perímetro, perímetro convexo, longitud, compactación, rugosidad, número de huecos y las coordenadas del centroide de la mancha para su análisis y extracción.

- **Clasificación de manchas.** Esta parte del algoritmo se realizó con un procedimiento similar al utilizado en el caso de los melocotones.

4.8. Herramientas de análisis de imagen y de programación

En esta tesis se utilizó, para todo el procesamiento de las imágenes RMI, el programa de aplicación de análisis de imagen Matrox Inspector® versión 2.2, bajo plataforma Windows. A continuación se describen las principales herramientas de procesamiento disponibles en este programa que fueron utilizadas en esta tesis para realizar los diferentes análisis.

4.8.1. Calibración de los píxeles

Permite representar las imágenes procesadas con las coordenadas reales (unidades de longitud).

4.8.2. Selección de región de interés (ROI)

Permite seleccionar en una imagen una ROI con cualquier geometría para realizar operaciones de procesamiento sobre ésta. También permite definir una ROI basada en los niveles de gris de la imagen, utilizando la herramienta “*magic wand*”, que escoge automáticamente todos los píxeles que son similares en un específico rango de nivel de gris que el usuario define.

4.8.3. Herramientas estadísticas

Intensidad media de nivel de gris de una ROI. Para cualquier tipo de ROI seleccionada en una imagen el valor medio de nivel de grises (S_m) de los N píxeles que la conforman se calculó como:

$$S_m = \frac{\sum_{i=1}^N S_i}{N} \quad (4.2)$$

Donde S_i es la intensidad de nivel de gris del píxel i . Este valor se obtuvo para cada imagen con la expresión anterior aplicando el algoritmo `mediaROI.scr` (ver anexo A5).

Desviación típica del nivel de gris de una ROI. La desviación típica (DE) de la intensidad de nivel de gris de los N píxeles que conforman una ROI, se calculó aplicando el algoritmo `desviacionROI.scr` (Anexo A6) la expresión usada para éste fue:

$$DE = \sum_{i=1}^N \sqrt{\frac{(S_m - S_i)^2}{N - 1}} \quad (4.3)$$

Histogramas. Con esta opción, del menú de herramientas estadísticas, se obtuvo la distribución de niveles de gris de los píxeles de una ROI seleccionada previamente.

Perfiles. Mediante esta opción del mismo menú, se obtuvo una representación de los niveles de gris de píxeles a lo largo de una línea recta trazada en la imagen. El usuario puede definir el espesor de la línea, su longitud y programar sus coordenadas de trazo.

4.8.4. Operaciones de procesamiento de imagen

Umbralización. Método ampliamente usado para convertir una imagen en escala de gris en una imagen binaria, permitiendo separar objetos de interés del fondo de la imagen. El tipo más utilizado en este trabajo fue la umbralización binaria, en la que una imagen original $f(x,y)$ es convertida en una nueva imagen $g(x,y)$ para la cual:

$$g(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{si } f(x,y) \geq T \\ 0 & \text{si } f(x,y) < T \end{cases} \quad (4.4)$$

Donde T es un valor de umbral entre 0 y 255 definido por el usuario para la imagen $f(x,y)$.

Umbralización automática. Segmentación binaria de la imagen basada en la aplicación automática de umbral. El algoritmo que utiliza el programa analiza la distribución de nivel de grises en la imagen y selecciona el umbral más apropiado a partir del histograma de la imagen. En el caso que el histograma contenga solo dos picos, el valor de umbral es ajustado al mínimo valor entre los dos picos. Si el histograma contiene más de dos picos, entonces el valor de umbral es, generalmente, ajustado a un valor entre los dos picos principales, con excepción de las imágenes completamente oscuras (nivel de gris = 0) y completamente saturadas (nivel de gris = 255). La macro autoumbralización.scr, que viene incluida con el programa y ejecuta el algoritmo, se muestra en el anexo A8.

Operaciones de filtrado espacial. Basadas en procesamiento por grupo de píxeles vecinos con el fin mejorar y suavizar imágenes, acentuar contornos y remover ruido de una imagen. Los filtros utilizados en los procesamientos de imagen fueron:

- **Filtro de media:** Filtro lineal en el que el valor de cada píxel $h(i,j)$ es reemplazado por el promedio ponderado de todos sus M píxeles vecinos $f(k,l)$:

$$h(i, j) = \frac{1}{M} \sum_{(k,l) \in N} f(k, l) \quad (4.5)$$

Donde N es el número total de píxeles en la imagen. Este filtro pasa bajo resulta efectivo para reducir las componentes de alta frecuencia (ruido Gaussiano). La mascara usada aquí fue de 3×3 con $M=9$.

- **Filtro de mediana:** este filtro reemplaza el valor de un píxel por la mediana de los valores de los vecinos en una mascara $n \times n$ y se utilizó para eliminar el ruido pulsatorio presente en las imágenes binarias procesadas.

- **Filtro de Prewitt:** filtro espacial para la detección de cambios de gradiente de brillo en los píxeles adyacentes en una imagen. Realiza mediante un operador derivativo, la búsqueda de los cruces por cero utilizando las dos siguientes mascaras, aplicadas en la direcciones x e y , respectivamente:

$$S_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} ; S_y = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \quad (4.6)$$

Operaciones aritméticas. Este procesamiento se basa en operaciones píxel a píxel utilizando dos imágenes de entrada. La ecuación general para el procesamiento por punto es:

$$O(x, y) = I_1(x, y) \# I_2(x, y) \quad (4.7)$$

Donde $I_1(x,y)$ y $I_2(x,y)$ representan las dos imágenes de entrada y $O(x,y)$ es la imagen obtenida de la operación de combinación (#). Entre las funciones de combinación se incluyen operaciones matemáticas y lógicas. Las operaciones utilizadas en los algoritmos desarrollados fueron la de substracción (-) y la operación lógica de intersección “AND”.

Operaciones morfológicas. Basadas en la forma de los objetos son aplicadas principalmente a imágenes binarias mediante el uso de mascaras.

Las operaciones morfológicas utilizadas en los algoritmos fueron la erosión y la dilatación.

- **Erosión:** consiste en eliminar del objeto la capa más externas de píxeles pertenecientes al objeto y cuyos vecinos pertenecen al fondo. Esta operación disminuye el tamaño del objeto y agranda agujeros.

- **Dilatación:** consiste en añadir una nueva capa exterior al objeto. En este caso se buscan los puntos del fondo que tengan algún vecino perteneciente al objeto para marcarlos como objeto, logrando aumentar el tamaño del objeto y disminuir el tamaño de los agujeros.

4.8.5. Análisis de manchas

Esta herramienta del programa permitió identificar regiones de píxeles conectados, conocidas como manchas o “blobs”, pudiendo seleccionar, en imágenes binarias, los píxeles blancos como región de pulpa y los píxeles negros pertenecientes al fondo y a los daños de los frutos. También, permitió eliminar de entrada manchas con determinada área mínima y/o máxima que no interesaban en el análisis. Las siguientes características fueron consideradas en el análisis de las manchas:

Área (A). Número de píxeles presentes en una mancha. Para una imagen binaria $B(i,j)$, A , esta dado por:

$$A = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m B(i, j) \quad (4.8)$$

Perímetro (P). Longitud total en píxeles alrededor de toda la frontera de una mancha.

Perímetro convexo (Pc). Longitud en píxeles del casco convexo de una mancha.

Longitud (L). Relación entre el área (A) y el perímetro (P) de una mancha:

$$L = \frac{A}{P} \quad (4.9)$$

Compactación (C). Relación entre el perímetro (P) y el área (A) de una mancha:

$$C = \frac{P^2}{4pA} \quad (4.10)$$

Rugosidad (R). Relación entre el perímetro (P) y el perímetro convexo (P_c) de una mancha:

$$R = \frac{P}{P_c} \quad (4.11)$$

Centroide (X_c, Y_c). Posición x e y del centro de gravedad de la imagen $B(i, j)$ de una mancha esta dada por las ecuaciones:

$$X_c = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m jB(i, j)}{A} ; Y_c = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m iB(i, j)}{A} \quad (4.12)$$

Diámetro medio. Diámetro promedio de una mancha obtenido en ocho ángulos diferentes.

Número de huecos. Total de regiones de píxeles aislados dentro de una mancha.

En el análisis de manchas, después de seleccionar las características, se realizó la segmentación de la imagen y se contabilizó el número de manchas (regiones de píxeles negros) en la imagen binaria resultante. También, fue posible con esta herramienta, crear filtros de clase para eliminar aquellas manchas que no interesaban en el análisis. Después de aplicar el filtro las manchas fueron etiquetadas con un número. Finalmente, el programa entrega una tabla de resultados, indicando para cada mancha los valores de las características extraídas.

4.8.6. Aplicación de modelos

Esta opción del menú de análisis permitió explorar imágenes para identificar objetos o partes, basándose en la correlación con un modelo. El modelo es un patrón de nivel de gris previamente definido a partir de una

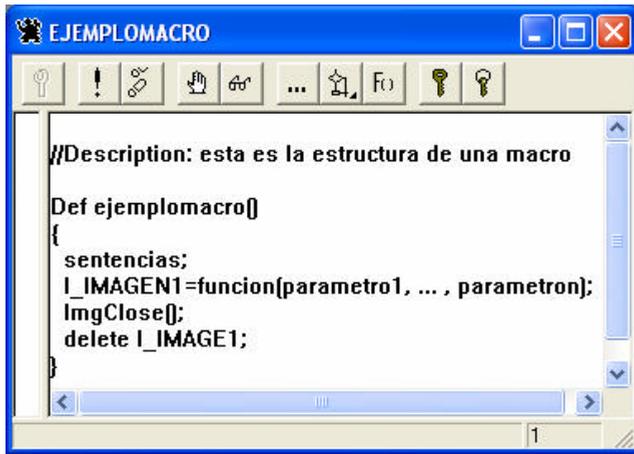
imagen muestra y utilizado para encontrar semejanzas (ocurrencias) de éste en otras imágenes. En la creación del modelo se definió su tamaño, se fijó el número de ocurrencias que se requieren hallar en la imagen objetivo, si el patrón es buscado en toda la imagen o en determinada región, se definió el nivel de aceptación del modelo desde un 0% (no ocurrencia) hasta un 100% (perfecta exactitud), se estableció la precisión posicional y se definió la velocidad de búsqueda del modelo.

4.8.7. Escritura y ejecución de macros

Este menú del programa permite automatizar la aplicación de todas las anteriores herramientas para el procesamiento de imagen mediante la ejecución de algoritmos escritos en lenguaje C-script. Para esto utiliza una ventana de interfase con el programa para crear, editar, cargar en la memoria, depurar y ejecutar mediante macros, los algoritmos desarrollados.

En el programa, una “script” es un conjunto de una o más sentencias que se pueden agrupar en unidades llamadas funciones de escritura o macros. Estas funciones permiten tomar parámetros, contener diferentes sentencias y llamar a otras funciones de escritura. Los tipos de funciones de escritura que se utilizaron fueron: propias del programa, creadas por el usuario y funciones externas DLL obtenidas de otras librerías.

Las macros del programa presentan una estructura en la que la primera línea corresponde a una breve descripción de lo que hace la macro (//Descripción). Luego, aparece la línea de declaración con la palabra clave Def, un espacio, y el nombre de la macro seguido de paréntesis. A continuación y entre llaves { } para abrir y cerrar la macro aparecen, línea por línea, el conjunto de sentencias utilizadas (cuerpo de la macro). Las sentencias de una macro contienen variables, palabras claves y funciones (Figura 4.19).



```
//Description: esta es la estructura de una macro

Def ejemplomacro()
{
  sentencias;
  I_IMAGEN1=funcion(parametro1, ..., parametron);
  ImgClose();
  delete I_IMAGE1;
}
```

Figura 4.19. Estructura de una macro en lenguaje C-script.

Las variables, asignadas a objetos o ventanas que contienen información, se nombran según el tipo de información así: I_nombre, para imágenes, R_nombre, para ROI; B_nombre, para análisis de manchas; y M_nombre, para patrones de modelos, entre otras. Las variables se definen siempre utilizando operadores de asignación como el operador (=). Por ejemplo, I_IMAGEN1=funcion().

Las palabras claves son códigos de letras que el programa utiliza para ejecutar determinadas órdenes. Por ejemplo; Def, se utiliza para definir una macro o una función. Delete, para borrar una variable, Return, para regresar el valor de una variable.

Las funciones de escritura presentan el siguiente formato: nombre(parámetro 1, ..., parámetro n), donde nombre es el identificador de la función y los n parámetros son argumentos formales que representan la información requerida para llamar una función o una sentencia. Los parámetros van separados por comas (.). Por ejemplo; ImgNewROI(long X1, long Y1, long X2, long Y2), es una función que define una ROI rectangular basada en las coordenadas de las esquinas extremas (X1, Y1) y (X2,Y2) de una ROI rectangular trazada sobre una imagen. Todas las funciones de escritura son accesibles en el programa a través de la opción “expression builder” y se encuentran organizadas por módulos, como el módulo de calibración, de imagen, de ROI, de operaciones morfológicas, aritméticas, mapeo, filtros, y análisis de manchas entre muchos otros.

4.9. Evaluación de los algoritmos

Una vez desarrollados todos los algoritmos de procesamiento digital, se realizó la evaluación de la fase de validación éstos. Las imágenes fueron cargadas y procesadas una a una con la respectiva macro. Primero se procesaron los subgrupos de imágenes con daño y a continuación los subgrupos control (imágenes sin daño). En cada imagen procesada con la macro se registraba, para el caso de la imágenes con daño, si se detectaba alguna mancha (detección acertada de fruto dañado, DAFD) o si no se detectaba (falsa detección de fruto dañado, FDFD) y para las imágenes sin daño, si no se detectaba nada (detección acertada de fruto sano, DAFS) o si se detectaba alguna mancha (falsa detección de fruto sano, FDFS).

Con los registros anteriores se determinaron, en cada subgrupo de cada experimento, los porcentajes de aciertos y de falsas detecciones obtenidos por la respectiva macro de la siguiente manera:

En las imágenes con daño:

$$\%DAFD = \frac{DAFD}{DET \text{ con daño}} * 100 \quad (4.13)$$

$$\%FDFD = \frac{FDFD}{DET \text{ con daño}} * 100 \quad (4.14)$$

En las imágenes sin daño:

$$\%DAFS = \frac{DAFS}{DET \text{ sin daño}} * 100 \quad (4.15)$$

$$\%FDFS = \frac{FDFS}{DET \text{ sin daño}} * 100 \quad (4.16)$$

Donde DET es el número total de imágenes utilizadas en la evaluación del algoritmo, según plano y secuencia de exploración aplicada en cada experimento.

Se deduce de las formulas anteriores que el algoritmo ideal debería permitir un %DAFD del 100% y un %FDFS del 0%, es decir que todo fruto con daño fuera detectado y que ningún fruto sano fuera detectado como dañado. Pero como en todos los sistemas de clasificación se presentan ineficiencias propias del sistema y debidas a los productos a clasificar, se fijaron como valores límites de clasificación, tanto en melocotones como en cítricos, un %DAFD igual o superior del 80% y un %FDFS igual o inferior del 20%.

Los resultados de detección obtenidos por los algoritmos fueron analizados según el tipo de daño presente en la fruta (experimento), según el contraste de la secuencia y el plano de exploración utilizado.

Finalmente, los algoritmos desarrollados para las imágenes RMI con determinado tipo de daño, reconstruidas con la misma secuencia y contraste y con el mismo plano de exploración (longitudinal y ecuatorial), fueron evaluados con todos los demás subgrupos de imágenes RMI sin daños de los demás experimentos, con el propósito de determinar la falsa discriminación de fruta sana como dañada (%FDFS) que cada algoritmo permite obtener y analizar de este modo la viabilidad de su aplicación en un sistema automático de detección.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el este capítulo se presentan, analizan y discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo de ésta tesis. Una imagen RMI de una fruta es, en sí misma, el resultado de una exploración de RM realizada bajo determinadas condiciones de la muestra y del equipo RMI. Por tanto cada imagen RMI contiene una matriz de datos (píxeles) representados por intensidades de nivel de grises, que permiten al investigador, en este caso, inferir acerca de lo que esta pasando en el interior de la fruta. Es por esto que el lector se encontrará, a lo largo de éste capítulo, con muchas imágenes RMI tabuladas y tratadas como datos de resultados.

Los aportes de esta investigación se presentan en cuatro apartados importantes. En el primero se trata la selección de las secuencias de reconstrucción ensayadas para obtener imágenes internas de alta calidad del interior de frutos de melocotón y de cítricos mediante el desarrollo propio de unos criterios de calidad y del procesamiento digital de las imágenes. En el segundo, se presentan los resultados obtenidos, aplicando estas secuencias, en el seguimiento de algunos desordenes internos en melocotones. En el tercero, se presenta el desarrollo de los algoritmos de procesamiento digital de las imágenes RMI obtenidas de melocotones y cítricos, sanos y afectados por diferentes daños. Por último, se presentan y discuten los resultados obtenidos en la evaluación de estos algoritmos de detección automática de daños.

5.1. Selección de secuencias de RMI para la obtención de imágenes internas de alta calidad

5.1.1. Melocotones

En la Tabla 5.1 se presentan las 40 secuencias evaluadas con la respectiva imagen RMI obtenida, indicando si fue reconstruida en 2D o en 3D, si fue contrastada en T_1 , T_2 o en DP, el tamaño del píxel, el tiempo de adquisición T_{ad} empleado durante la reconstrucción y si hubo presencia o ausencia de artefacto. La aplicación de estas 40 secuencias arrojó un total de 185 imágenes RMI (total de número de cortes, Tabla 4.1). La imagen RMI mostrada para cada secuencia fue escogida entre varios de los cortes obtenidos por fruto y en la mayoría de los casos corresponde a una imagen localizada en un plano central del fruto explorado.

Tabla 5.1. Imágenes RMI de frutos de hueso obtenidas según secuencias y parámetros de programación aplicados.

Secuencia #	Tipo	Imagen	Contraste	Pixel mm x mm	T _{ad} min : s	Observaciones	RMI
1	SE	2D	T ₁	0,39x0,39	0:31	Sin artefacto	
2	SE	2D	T ₁	0,39x0,39	1:55	Sin artefacto	
3	SE	2D	T ₁	0,52x0,52	0:24	Sin artefacto	
4	SE	2D	T ₁	0,52x0,52	1:27	Sin artefacto	
5	SE	2D	T ₁	0,78x0,78	1:55	Sin artefacto	
6	SE	2D	T ₁	1,04x1,04	0:24	Sin artefacto	
7	SE	2D	T ₁	1,04x1,56	0:38	Artefacto con ruido concéntrico	
8	SE	2D	T₁	1,04x1,04	1:27	Sin artefacto	
9	SE	2D	T ₁	1,04x1,04	1:50	Sin artefacto	
10	SE	2D	T₁	1,04x1,04	2:13	Sin artefacto	
11	SE	2D	T ₁	0,84x0,84	1:39	Sin artefacto	
12	SE	2D	T ₂	1,04x1,04	1:29	Con artefacto	
13	SE	2D	T ₂	1,04x1,04	16:10	Artefacto saturación de señal	

14	SE	2D	T ₂	1,04x1,04	1:46	Sin artefacto	
15	SE	2D	T ₂	0,83x1,00	3:24	Sin artefacto	
16	TSE	2D	T ₂	1,04x1,04	1:07	Sin artefacto	
17	TSE	2D	T ₂	1,04x1,04	3:14	Con artefacto	
18	HSE	2D	T ₁	1,04x1,04	1:27	Sin artefacto	
19	SE	3D	T ₁	0,83x1,00	2:31	Sin artefacto	
20	SE	3D	T ₁	1,04x1,04	3:01	Sin artefacto	
21	SE	3D	T ₂	0,62x0,94	1:46	Sin artefacto	
22	SE	3D	T ₂	1,04x1,04	3:31	Sin artefacto	
23	IR	2D	T ₁	1,04x1,04	2:32	Sin artefacto	
24	IR	2D	T ₁	1,04x1,04	2:32	Sin artefacto	
25	IR	2D	T ₁	1,04x1,04	2:32	Sin artefacto	
26	STIR	2D	T ₁	1,04x1,04	2:32	Sin artefacto	
27	ME	2D	DP	1,04x1,04	1:29	Con artefacto	
28	ME	2D	T ₂	1,04x1,04	1:29	Con artefacto	
29	ME	2D	DP	1,04x1,04	4:21	Con artefacto	

30	ME	2D	T ₂	1,04x1,04	4:21	Con artefacto	
31	TME	2D	DP	1,04x1,04	0:53	Con artefacto	
32	TME	2D	T ₂	1,04x1,04	0:53	Con artefacto	
33	TME	2D	DP	1,04x1,04	3:24	Con artefacto	
34	TME	2D	T ₂	1,04x1,04	3:24	Con artefacto	
35	GE	2D	T ₁	0,68x0,68	0:41	Ángulo basculación: 35° Sin artefacto	
36	GE	2D	T ₁	1,04x1,04	0:41	Ángulo basculación: 35° Sin artefacto	
37	GE	2D	T ₁	1,04x1,04	1:20	Ángulo basculación: 35° Sin artefacto	
38	GE	2D	T ₁	1,04x1,04	0:46	Ángulo basculación: 10° Sin artefacto	
39	GE-STIR	2D	T ₁	1,04x1,04	2:07	Ángulo basculación: 90° Sin artefacto	
40	GE-STIR	2D	T ₁	1,04x1,04	1:34	Ángulo basculación: 90° Sin artefacto	

T_{ad}: tiempo de adquisición de la imagen.

SE: secuencia espín-eco.

TSE: secuencia similar a "fast spin eco" utiliza la media transformada de Fourier y dos ecos para obtener dos imágenes, una contrastada en densidad protónica DP y otra en T₂.

HSE: secuencia SE con muy corto T_E para obtener imagen altamente contrastada en T₁.

IR: secuencia inversión recuperación.

STIR: secuencia inversión recuperación con corto tiempo de inversión T₁ para obtener imágenes con señal nula de las estructuras con grasa.

ME: secuencia multieco con dos ecos para obtener imágenes contrastadas en DP y en T₂.

TME: secuencia similar a "fast spin eco" para imágenes contrastadas en DP y en T₂.

GE: Secuencia eco gradiente.

GE-STIR: eco gradiente con inversión recuperación con corto tiempo de inversión T₁ para obtener imágenes con señal nula de las estructuras con grasa.

A continuación se analizan y discuten los diferentes criterios de calidad obtenidos a partir de las secuencias evaluadas y del procesamiento digital de

las imágenes RMI de frutos de hueso, para luego proceder a la selección de las mejores, de acuerdo con el procedimiento establecido (Tabla 4.3).

En la Figura 5.1 se presentan para todas técnicas de reconstrucción evaluadas los valores entregados por el equipo de resonancia para la relación S/R de las imágenes RMI contrastadas en T_1 , en T_2 y en densidad protónica DP. Los valores obtenidos de S/R no solo dependen del tipo de secuencia y de los parámetros programados, sino también de la bobina de RF empleada.

Se comprobó, de acuerdo con lo planteado en la teoría, que para las secuencias SE, TSE, ME, TME y GE; al incrementar el número de excitaciones N_{ex} se obtiene una relación S/R mayor, debido a la reducción del ruido aleatorio cuando se promedian varias imágenes del mismo plano. En las secuencias eco SE (secuencias 1 a 22), al aumentar el tiempo de repetición T_R se obtiene mayor relación S/R en T_1 , mientras que al aumentar el tiempo eco T_E , se obtiene menor relación S/R en T_2 . En las imágenes (1 a la 11) contrastadas en T_1 y reconstruidas en 2D, la relación S/R presentó valores entre 5 y 150%, mientras que las imágenes (19 y 20) reconstruidas en 3D presentaron valores muy superiores (362 y 520%). Estas secuencias (T3DT1) con reconstrucción de las imágenes en 3D, aunque no mostraron ningún tipo de artefacto y la relación S/R fue muy alta, presentaron valores relativamente bajos de contraste entre la pulpa y el hueso (Figura 5.3), debido, quizás, al T_R tan corto (30 ms) usado en estas secuencias, que no permitió obtener una separación amplia (contraste) de la señal emitida por ambas estructuras durante la relajación longitudinal.

Solo en una secuencia (7) contrastada en T_1 , se presentó un artefacto, debido muy probablemente al uso en esta secuencia de una matriz asimétrica de 192x128, que dio lugar a una imagen reconstruida con píxeles rectangulares (Figura 5.1).

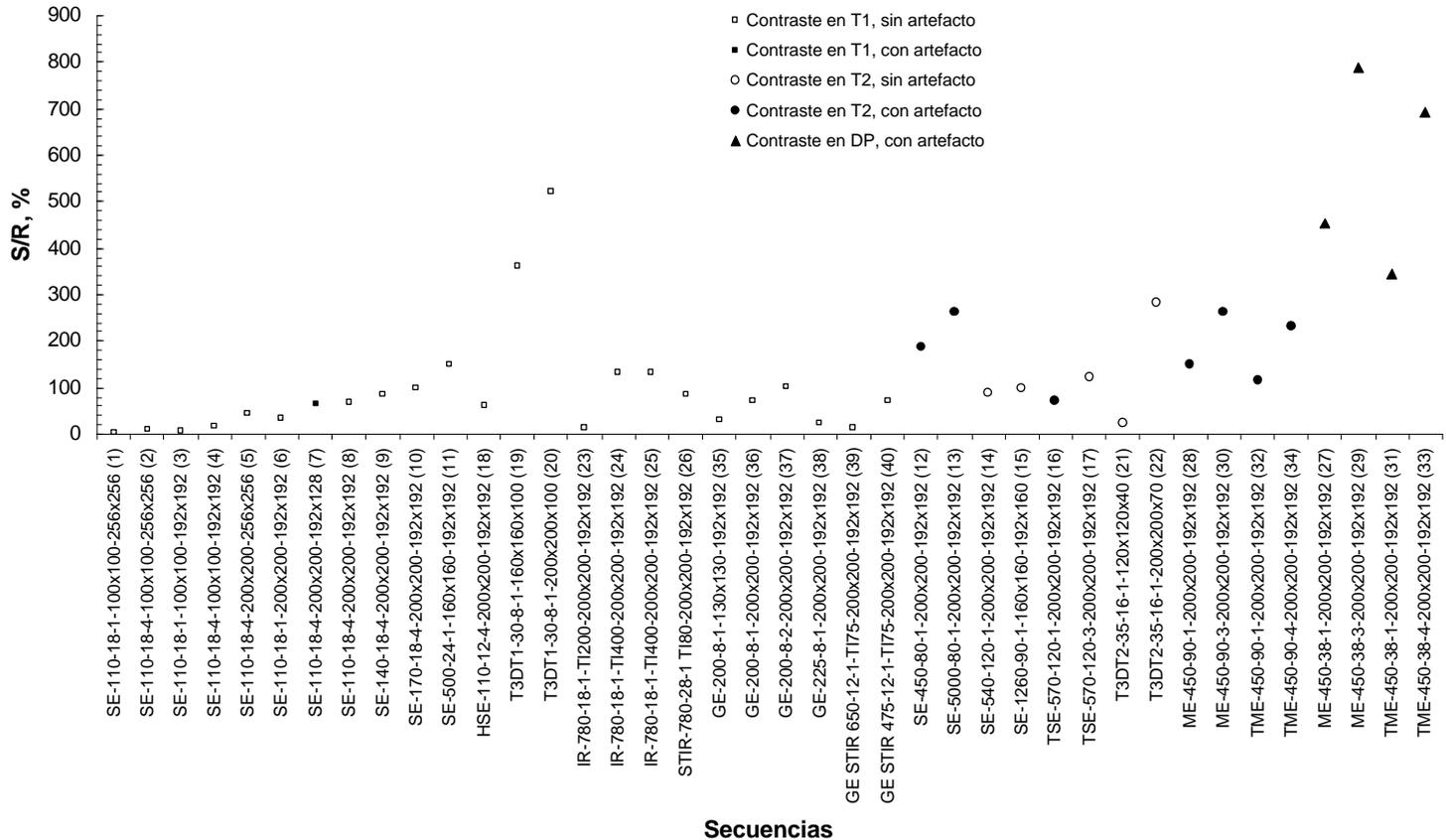
En las secuencias (11 a 17) contrastadas en T_2 y reconstruidas en 2D, la relación S/R varió entre 70 y 262% y en las secuencias (21 y 22) reconstruidas (T3DT2) en 3D los valores fueron de 24 y 283%. Esta marcada diferencia obtenida en las imágenes 3D fue debida a que se utilizaron frutos diferentes y se varió el tamaño de voxel en cada caso. Al incrementar el tamaño del voxel se obtuvo mayor relación S/R. En las imágenes reconstruidas en 2D, los valores obtenidos de S/R fueron debidos al uso de diferentes combinaciones de

T_R, T_E y tamaño de voxel (en las secuencias SE), y al incremento del número de excitaciones N_{ex} (en las secuencias TSE, ME y TME).

En 7 de las 12 secuencias contrastadas en T_2 se presentó algún tipo de artefacto como saturación de la señal (SE 12, 13) o repliegues (TSE 16, ME 28, 30 y TME 32, 34).

Las secuencias ME (27, 29) y TME (31, 33) contrastadas en densidad protónica DP (Figura 5.1) aunque entregaron valores muy altos en la relación S/R (entre 346 y 786%), estas secuencias presentaron demasiado ruido y artefactos que disminuyeron el contraste en las imágenes procesadas (Figura 5.3).

En la Figura 5.2 se muestra el volumen del voxel (resolución) usado en cada secuencia. Este varió entre $0,8 \text{ mm}^3$ y 8 mm^3 , de acuerdo con la combinación del campo de visión FOV, del tamaño de matriz $n \times m$, y del espesor de corte que permite ejecutar el equipo de resonancia. Este rango de variación del voxel fue utilizado en las secuencias SE (1 a 22), IR (23 a 26) y GE (35 a 40). En el resto de las secuencias ME (27 a 30) y TME (31 a 34) se empleó un voxel de $5,4 \text{ mm}^3$ con el cual se obtuvo una resolución aceptable para los propósitos de este experimento.



SE - 110 - 18 - 1 - 100x100 - 256x256 : Tipo secuencia - TR - TE - Nex - FOV - m x n

Figura 5.1. Relación S/R de las imágenes RMI contrastadas en T₁, T₂ y densidad protónica DP y secuencias que presentaron algún tipo de artefacto.

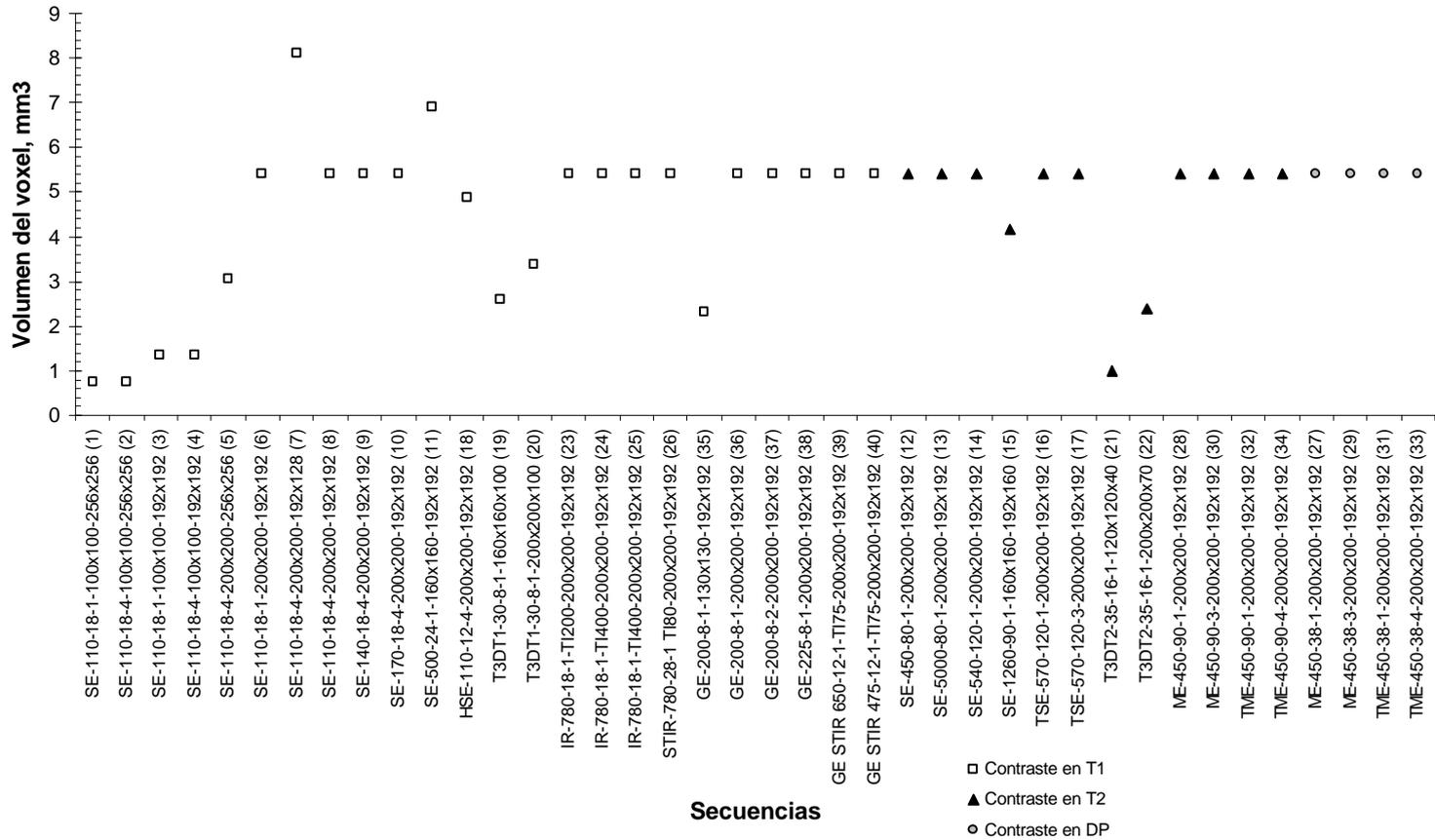


Figura 5.2. Volumen del voxel de las imágenes RMI originales.

En la Figura 5.3 se presentan los valores del contraste obtenidos entre la pulpa del fruto y el fondo de la imagen y entre la pulpa y el hueso del fruto para las secuencias ponderadas en los parámetros intrínsecos de relajación T_1 y T_2 y en densidad protónica DP.

En las secuencias eco (1 a 7) ponderadas en T_1 (relajación longitudinal) y aplicadas sobre la misma fruta, el contraste entre la pulpa y el fondo y entre la pulpa y el hueso se incrementó al aumentar el número de excitaciones N_{ex} . Aunque N_{ex} , es un parámetro que teóricamente no modifica el contraste, en las imágenes procesadas el contraste se incrementó debido seguramente a la reducción del ruido presente en la intensidad media de las señales de la pulpa, el hueso y el fondo de las imágenes procedentes de secuencias con más de una excitación.

En las secuencias SE (6, 8) con T_R de 110 ms, T_E de 18 ms y un voxel de $5,4 \text{ mm}^3$ el contraste en T_1 de la pulpa-fondo y de la pulpa-hueso fue muy alto (entre 90 y 100 niveles de gris). Cuando se aumentó el T_R en estas secuencias no se obtuvo un incremento en los contrastes, debido a que estas fueron aplicadas en tres frutos diferentes. Sin embargo, la secuencia SE (11) probada con un T_R de 500 ms y un T_E de 24 ms, empleando un volumen de voxel menor al empleado en las secuencias anteriores, permitió obtener el mayor contraste entre la pulpa y el fondo y uno de los mayores contrastes entre la pulpa y el hueso de todas las secuencias ponderadas en T_1 .

Con los parámetros utilizados en las secuencias SE (19, 20) reconstruidas en 3D y ponderadas en T_1 no se consiguió obtener entre estructuras contrastes mayores a los obtenidos con las secuencias reconstruidas en 2D.

En la Figura 5.3 se muestra que la misma secuencia IR (24, 25) con parámetros idénticos, pero aplicada en dos frutos diferentes, entrega imágenes con la misma relación S/R (Figura 5.1) pero con contrastes muy diferentes entre la pulpa y el hueso. Esto pudo ser debido a que la señal recogida en cada fruto correspondió a planos de reconstrucción muy diferentes. Al utilizar la misma fruta aplicándole la misma secuencia IR pero con diferente tiempo de inversión (secuencias 23 y 24), se obtuvo que al aumentar T_1 se incrementó considerablemente el contraste entre las estructuras y entre la pulpa y el fondo.

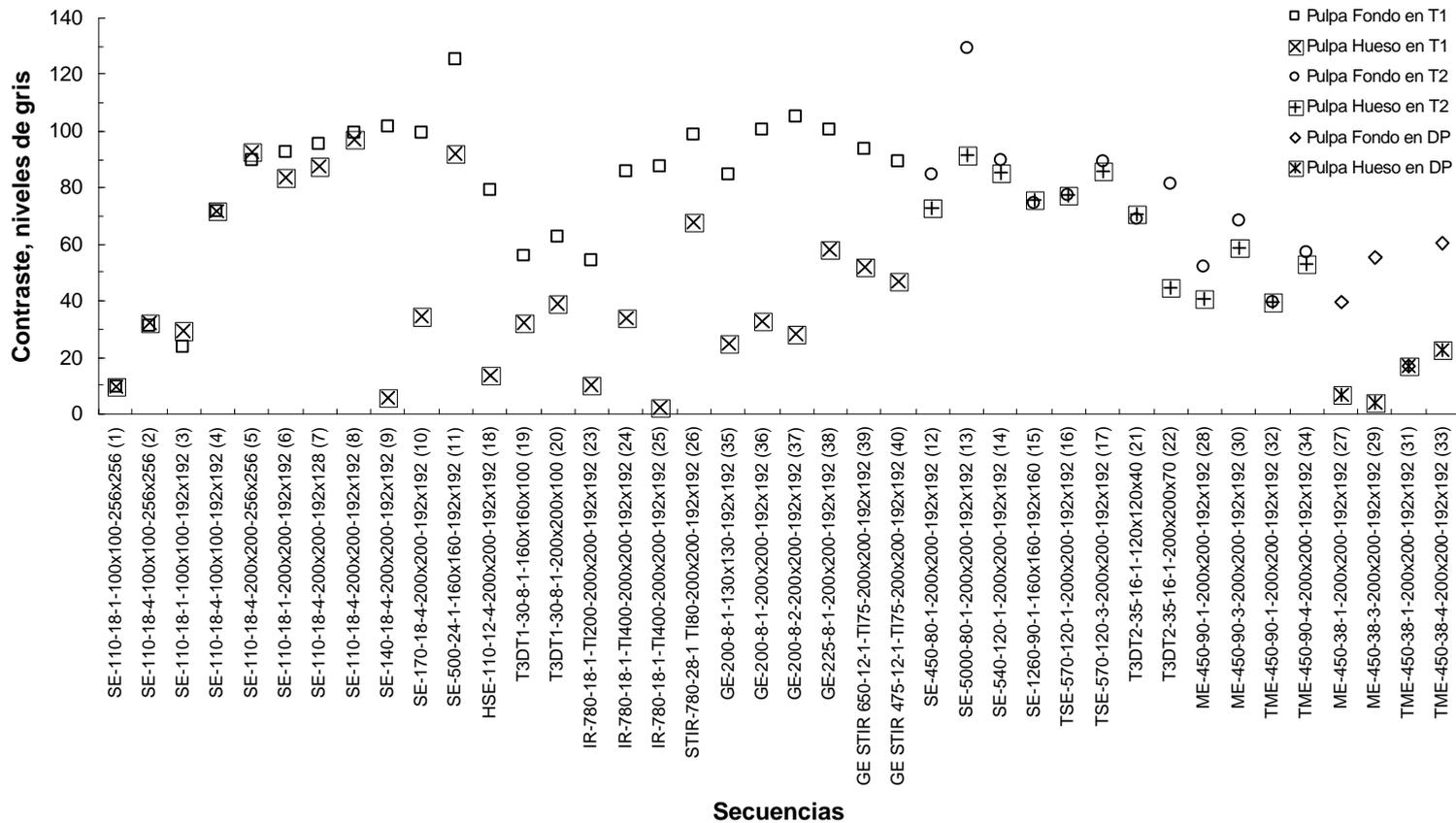


Figura 5.3. Contraste pulpa-fondo y pulpa-hueso obtenido en T₁, T₂ y en densidad protónica DP con las secuencias ensayadas.

Con la aplicación de la secuencia (26) STIR, que es una secuencia inversión recuperación con utilización de un menor T_1 , se obtuvo una señal media de la estructura del hueso comparativamente menor a la obtenida con las secuencias (23 a 25) IR probadas, mientras que la señal media de la pulpa no se redujo. De este modo, los contrastes en entre la pulpa y el hueso y entre la pulpa y el fondo, fueron mayores a los obtenidos con las secuencias IR. Este efecto fue debido probablemente a la anulación de la señal de los componentes grasos del hueso que con la secuencia STIR disminuyeron la intensidad media en el hueso, y no así en la pulpa, que permitió acentuar el contraste en T_1 .

En las secuencias GE (35 y 37) el aumento de volumen del voxel y el incremento de N_{ex} permitió, para las imágenes del mismo fruto, un incremento en el contraste. Esto puede ser explicado por la disminución de la desviación de la intensidad de la señal al incrementar el número imágenes (N_{ex}) y al aumentar el volumen de materia sobre la que la antena receptora de RF registra la señal.

Aunque en las secuencias GE (37 y 38) se presentó un aumento en el contraste pulpa-hueso al incrementar ligeramente el T_R y disminuir el ángulo de basculación θ de 35 a 10°, es probable que este efecto se deba al uso de ambas secuencias sobre frutos diferentes, pues teóricamente, la reducción de θ debería reducir el contraste ponderado en T_1 .

En las secuencias (39 y 40) GE STIR con un ángulo de basculación de 90°, al aumentar el T_R se incrementó ligeramente (en 5 niveles de gris) el contraste ponderado en T_1 . Esto, contrario a lo esperado en teoría, fue debido al uso de dos imágenes de frutos diferentes.

En síntesis, varias de las secuencias SE ponderadas en T_1 permitieron conseguir contrastes de más de 80 niveles de gris tanto entre la pulpa y el fondo como entre la pulpa y el hueso, mientras que las secuencias IR y GE permitieron contrastes altos en T_1 solamente entre la pulpa y el fondo.

Las secuencias SE (12 a 15, 21, 22), TSE (16, 17), ME (28, 30) y TME (32, 32) fueron utilizadas para contrastar las imágenes RMI en relajación transversal (T_2). Con las secuencias SE y TSE se consiguieron contrastes con más de 70 niveles de gris entre las estructuras pulpa-hueso y entre la pulpa y el fondo de las imágenes (Figura 5.3).

En particular con las secuencias (12, 14) SE reconstruidas en 2D y aplicadas al mismo fruto se logró incrementar el contraste ponderado en T_2 tanto de pulpa-hueso como de pulpa-fondo, aumentando simultáneamente los parámetros T_R y T_E . De forma similar, aunque utilizando frutos diferentes (12, 13), se logró aumentar el contraste pulpa-fondo y pulpa-hueso, al incrementar 10 veces el T_R . Sin embargo, la imagen reconstruida (13) presentó saturación de la señal en captación debido al uso de un T_R muy prolongado (5000 ms).

La secuencia Turbo Espín Eco TSE conocida también como “Fast Spin Eco”, empleó dos ecos para reconstruir dos imágenes, una ponderada en T_2 y otra en DP. Las imágenes contrastadas (16 y 17) en T_2 permitieron obtener contrastes pulpa-hueso y pulpa-fondo mayores a 75 niveles de gris.

La ponderación en T_2 obtenida con las secuencias ME (28, 30) y TME (32, 34) aplicadas al mismo fruto, entregó contrastes pulpa-hueso y pulpa-fondo entre 40 y 68 niveles de gris, pero con presencia de artefactos en las imágenes reconstruidas.

Las secuencias ME (27, 29) y TME (31, 33) ponderadas en densidad protónica DP, arrojaron los contrastes entre la pulpa y el hueso más bajos de todas las secuencias probadas y presentaron además artefactos de ruido (Figuras 5.3 y 5.1). Es probable, de acuerdo con lo planteado por Chen *et al.* (1989) que la densidad protónica sea muy similar en estas estructuras del fruto y esto explique el poco contraste obtenido con este tipo de secuencias.

En la Figura 5.4 se muestra la relación S/R de fondo (dividida por 100) obtenida en las imágenes procesadas para cada secuencia ensayada. Para las secuencias ponderadas en T_1 esta relación varió entre 0,44 y 0,95, en las secuencias ponderadas en T_2 varió entre 0,48 y 1,41, y en las secuencias ponderadas en DP entre 0,57 y 0,95.

En general la relación S/R de fondo presentada por las imágenes procesadas ponderadas en T_1 fue más uniforme que la presentada por las imágenes contrastadas en T_2 y en DP. La secuencia (13) SE con T_R de 5000 ms y T_E de 80 ms, presentó la imagen con mas alto contraste pulpa-hueso y fue también la imagen con mayor relación S/R de fondo (1,41). Esto puede explicarse por la mayor intensidad de señal dada por la pulpa con esta secuencia (una media de 165) a tal punto que fue la única secuencia que presentó saturación de la señal en captación.

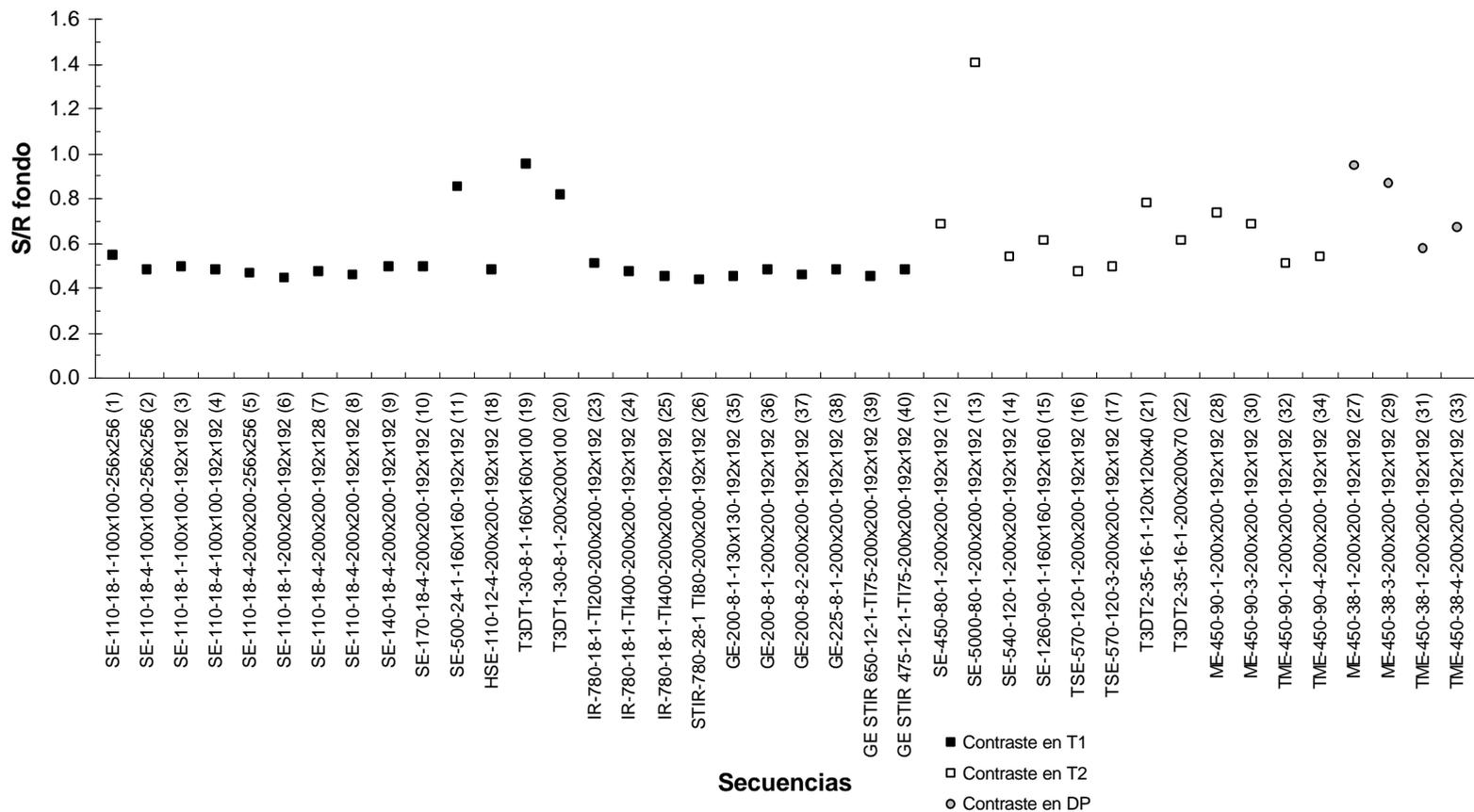


Figura 5.4. Relación S/R para las imágenes del fondo obtenida para las secuencias ensayadas.

Procesamiento digital de las imágenes y análisis de criterios de calidad

En la Tabla 5.2 se presentan los resultados del procesamiento digital de cada una de las imágenes obtenidas según la secuencia evaluada. Las últimas seis columnas corresponden a las variables utilizadas para evaluar los criterios de calidad establecidos.

Tabla 5.2. Señales medias y variables utilizadas para evaluar los criterios de calidad de las imágenes RMI.

#	SECUENCIA Tipo y parámetros programados	S _p n.g.	S _h n.g.	S _f n.g.	S/R _{RMI} %	Art	Voxel mm ³	C _{p-f} n.g.	C _{p-h} n.g.	S/R _f %
1	SE110-18-1-100x100-256x256	23	14	14	5	No	0,8	10	9	141
2	SE110-18-4-100x100-256x256	44	12	13	11	No	0,8	32	31	95
3	SE110-18-1-100x100-192x192	37	8	14	8	No	1,4	29	24	95
4	SE110-18-4-100x100-192x192	86	14	14	17	No	1,4	72	72	86
5	SE110-18-4-200x200-256x256	102	10	13	43	No	3,0	93	90	85
6	SE110-18-1-200x200-192x192	103	20	11	33	No	5,4	84	93	82
7	SE110-18-4-200x200-192x128	107	19	12	65	Si	8,1	88	95	77
8	SE110-18-4-200x200-192x192	110	13	11	67	No	5,4	97	99	73
9	SE140-18-4-200x200-192x192	114	109	13	84	No	5,4	5	102	68
10	SE170-18-4-200x200-192x192	112	77	12	100	No	5,4	34	99	68
11	SE-500-24-1-160x160-192x192	132	40	14	150	No	6,9	92	125	67
12	SE-450-80-1-200x200-192x192	102	29	18	187	Si	5,4	73	85	61
13	SE-5000-80-1-200x200-192x192	166	74	36	262	Si	5,4	92	129	61
14	SE-540-120-1-200x200-192x192	102	17	13	90	No	5,4	85	90	57
15	SE-1260-90-1-160x160-192x160	90	14	16	98	No	4,2	75	74	54
16	TSE-570-120-1-200x200-192x192	89	11	11	70	No	5,4	77	77	54
17	TSE-570-120-3-200x200-192x192	100	14	11	122	Si	5,4	86	89	54
18	HSE-110-12-4-200x200-192x192	92	79	14	62	No	4,9	14	79	51
19	T3DT1-30-8-1-160x160x100	77	109	21	362	No	2,6	32	56	50
20	T3DT1-30-8-1-200x200x100	82	121	19	520	No	3,4	39	63	49
21	T3DT2-35-16-1-120x120x40	88	18	19	24	No	1,0	70	69	49
22	T3DT2-35-16-1-200x200x70	96	52	15	283	No	2,4	44	81	49
23	IR-780-18-1-TI200-200x200-192x192	66	76	12	13	No	5,4	10	54	49
24	IR-780-18-1-TI400-200x200-192x192	98	132	12	133	No	5,4	34	86	48
25	IR-780-18-1-TI400-200x200-192x192	97	99	10	133	No	5,4	2	88	48
26	STIR-780-28-1 TI80-200x200-192x192	109	41	10	86	No	5,4	68	99	48
27	ME-450-38-1-200x200-192x192	63	69	23	454	Si	5,4	7	39	48
28	ME-450-90-1-200x200-192x192	68	28	16	151	Si	5,4	40	52	48
29	ME-450-38-3-200x200-192x192	78	82	23	786	Si	5,4	4	55	48
30	ME-450-90-3-200x200-192x192	84	25	16	262	Si	5,4	59	68	48
31	TME-450-38-1-200x200-192x192	30	13	13	346	Si	5,4	17	17	47
32	TME-450-90-1-200x200-192x192	51	11	11	115	Si	5,4	40	40	47
33	TME-450-38-4-200x200-192x192	76	54	16	693	Si	5,4	23	60	46
34	TME-450-90-4-200x200-192x192	69	16	12	231	Si	5,4	53	57	46

35	GE-200-8-1-130x130-192x192	97	72	12	30	No	2,3	25	85	46
36	GE-200-8-1-200x200-192x192	113	80	12	71	No	5,4	32	100	45
37	GE-200-8-2-200x200-192x192	116	88	11	101	No	5,4	28	105	45
38	GE-225-8-1-200x200-192x192	113	55	12	25	No	5,4	58	101	45
39	GE STIR 650-12-1-TI75-200x200-192x192	105	53	12	13	No	5,4	52	94	45
40	GE STIR 475-12-1-TI75-200x200-192x192	102	55	13	72	No	5,4	47	89	43

S_p , S_h , S_f : señal emitida por la pulpa, el hueso, el fondo, respectivamente

S/R_{RMI} : relación señal-ruido de fondo en imagen RMI original

S/R_f : relación señal-ruido de fondo en imagen RMI procesada

Art.: presencia de artefacto en la imagen RMI original

C_{p-f} , C_{p-h} : contraste pulpa-fondo y contraste pulpa-hueso

n.g.: nivel de gris

En la Tabla 5.3 se muestra el número de imágenes que cumplieron cada uno de los criterios de calidad establecidos para cada uno de los tres grupos de secuencias reunidos según la ponderación del contraste.

Tabla 5.3. Número de imágenes RMI que cumplieron los criterios de calidad establecidos.

Secuencias ponderadas en	# RMI	1	2	3	4	5		6
		$S/R_{RMI} > 60\%$	Sin artefactos	$T_{ad} < 300s$	Voxel $< 6 \text{ mm}^3$	$C_{p-f} > 70$	$C_{p-h} > 30$	$S/R_f > 50\%$
T₁	24	14	13	13	12	10	6	2
T₂	12	11	4	4	4	4	3	3
DP	4	4	0	0	0	0	0	0

Después de aplicar los seis criterios de calidad establecidos en este estudio, se encontró que de las 24 secuencias ponderadas en T_1 solo dos cumplieron con estos, de las 12 ponderadas en T_2 tres secuencias cumplieron y ninguna de las 4 secuencias ponderadas en DP cumplió con los criterios de calidad. En la Tabla 5.4 se muestran las cinco secuencias eco espín (SE y TSE) que fueron finalmente seleccionadas y con las que se lograron imágenes de 8 BIT de mejor calidad junto con los criterios de calidad obtenidos.

Tabla 5.4. Secuencias seleccionadas y parámetros de calidad obtenidos.

Secuencia - $T_R - T_E - N_{ex}$	# Secuencia	Contraste	$S/R_{RMI} \%$	Voxel (mm^3)	S_p	S_h	S_f	C_{p-f}	C_{p-h}	$S/R_{fondo} \%$	T_{ad} (s)
SE-110-18-4	8	T_1	67	5,4	110	13	11	97	99	73	87
SE-170-18-4	10	T_1	100	5,4	112	77	12	34	99	68	133
SE-540-120-1	14	T_2	90	5,4	102	17	12	85	90	57	106
SE-1260-90-1	15	T_2	98	4,1	90	14	15	75	74	54	204
TSE-570-120-1	16	T_2	70	5,4	88	11	11	77	77	54	67

T_R :	tiempo de repetición (ms)
T_E :	tiempo eco (ms)
N_{ex} :	número de excitaciones
S_p, S_h, S_f :	señal media de la pulpa, el hueso y el fondo, respectivamente (n.g.)
C_{p-f}, C_{p-h} :	contraste pulpa-fondo y pulpa-hueso, respectivamente (n.g.)
T_{ad} :	tiempo de adquisición de la imagen

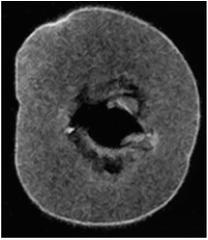
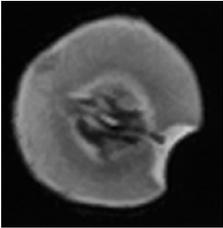
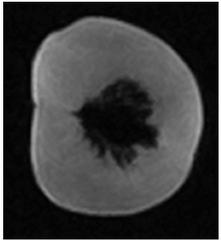
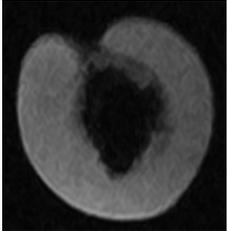
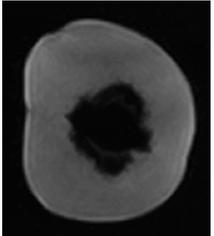
Aunque Chen *et al.* (1989), Sonogo *et al.* (1995) y Barreiro *et al.* (2000) en trabajos anteriores, adquirieron imágenes RMI de melocotones y nectarinas empleando diferentes secuencias SE y GE, los parámetros de reconstrucción utilizados por esos autores fueron muy diferentes a los definidos y utilizados en esta investigación.

El tiempo de adquisición varió para las secuencias escogidas entre 67 y 204 segundos, y fue bastante similar al utilizado por Sonogo *et al.* (1995) (entre 134 y 154 s) para la reconstrucción de imágenes de nectarinas y al empleado por Barreiro *et al.* (2000) de 192 s en la adquisición de imágenes de melocotones.

En la Tabla 5.5. se muestran las imágenes RMI de los frutos de hueso estudiados con sus parámetros de reconstrucción, correspondientes a cada una de las anteriores cinco secuencias seleccionadas. La mejor calidad alcanzada en estas imágenes fue debida, para el caso de las imágenes contrastadas T_1 , al menor tiempo de relajación longitudinal que presentan los espines de los tejidos del mesocarpio (píxeles más brillantes), en comparación con el mayor tiempo de relajación de los espines del endocarpio (píxeles oscuros), estructura del fruto en la que el agua tiene menor movilidad en el interior de los tejidos.

Por lo tanto, con los parámetros escogidos de T_R y T_E cortos se logró ponderar mejor la diferencia de señal que presentan los núcleos de hidrógeno de estos tejidos en T_1 , con una relación S/R alta, gracias al empleo del promedio de las señales de varias imágenes (4 excitaciones), pudiéndose disminuir el ruido aleatorio en las mismas, en comparación con las otras secuencias estudiadas en las que el ruido fue alto y se presentó poco contraste entre las señales de las estructuras estudiadas.

Tabla 5.5. Imágenes RMI obtenidas de los frutos de hueso con las secuencias y parámetros de reconstrucción seleccionados.

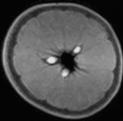
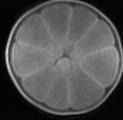
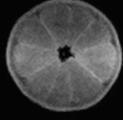
<p>Secuencia (SE): Eco Espín Contrastada en T_1 (Secuencia #8) T_R: 110 ms, T_E: 18 ms, N_{ex}: 4 Matriz: 192 x 192 Fov: 200mm x 200mm Espesor corte: 5 mm</p>	
<p>Secuencia (SE): Eco Espín Contrastada en T_1 (Secuencia #10) T_R: 170 ms, T_E: 18 ms, N_{ex}: 4 Matriz: 192 x 192 Fov: 200mm x 200mm Espesor corte: 5 mm</p>	
<p>Secuencia (SE): Eco Espín Contrastada en T_2 (Secuencia #14) T_R: 540 ms, T_E: 120 ms, N_{ex}: 1 Matriz: 192 x 192 Fov: 200mm x 200mm Espesor corte: 5 mm</p>	
<p>Secuencia (SE): Eco Espín Contrastada en T_2 (Secuencia #15) T_R: 1260 ms, T_E: 90 ms, N_{ex}: 1 Matriz: 192 x 160 Fov: 160mm x 160mm Espesor corte: 5 mm</p>	
<p>Secuencia (TSE): Turbo Eco Espín Contrastada en T_2 (Secuencia #16) T_R: 570 ms, T_E: 120 ms, N_{ex}: 1 Matriz: 192 x 192 Fov: 200mm x 200mm Espesor corte: 5 mm</p>	

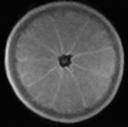
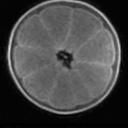
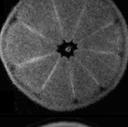
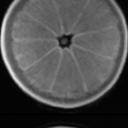
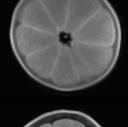
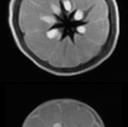
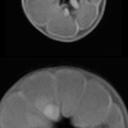
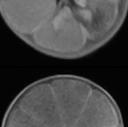
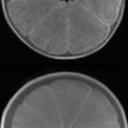
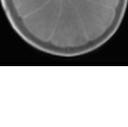
Para el caso de las imágenes contrastadas en T_2 , por el contrario, con un tiempo de repetición mucho más largo (más de 540ms) y un tiempo eco mayor (más de 90 ms) se logró una mayor ponderación en el tiempo de relajación transversal de los espines del mesocarpio. Con el uso de estos parámetros, los espines del endocarpio presentaron tiempos de relajación transversal cortos (píxeles oscuros), debido probablemente a la mayor rigidez estructural que presentan los tejidos y células del hueso, mientras que los espines del mesocarpio presentaron tiempos de relajación transversal largos (píxeles más brillantes), debido quizás a la mayor presencia de agua en este tejido. Estos parámetros permitieron obtener alto contraste entre estas estructuras, requiriendo el empleo de una sola excitación durante el proceso de reconstrucción de la imagen.

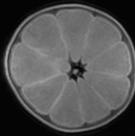
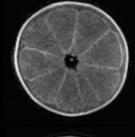
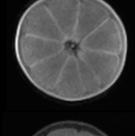
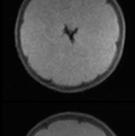
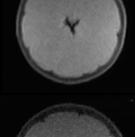
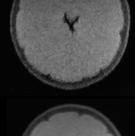
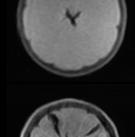
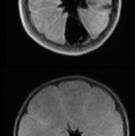
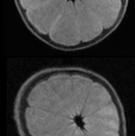
5.1.2. Cítricos

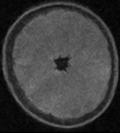
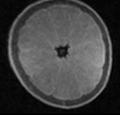
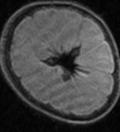
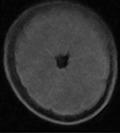
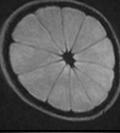
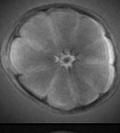
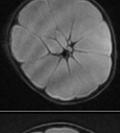
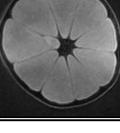
En la Tabla 5.6 se presentan las 31 secuencias evaluadas con la respectiva imagen RMI obtenida, indicando el tipo de contraste (T_1 o T_2), el tamaño del píxel, el tiempo de adquisición (T_{ad}) empleado durante la reconstrucción y si hubo presencia o ausencia de algún tipo de artefacto. La imagen RMI mostrada para cada secuencia corresponde a una imagen localizada en un plano central paralelo al plano ecuatorial del fruto explorado.

Tabla 5.6. Imágenes RMI de frutos de cítricos obtenidas según secuencias y parámetros de programación aplicados.

Secuencia #	Tipo	Contraste	Píxel mm x mm	Resolución mm ³	Observaciones	RMI
1	Eco espín	T_1	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
2	Eco espín	T_1	1,04x1,04	10,8	Sin artefacto	
3	Eco espín	T_1	1,04x1,04	10,8	Sin artefacto	

4	Eco espín	T ₁	0,83x0,83	6,9	Sin artefacto	
5	Eco espín	T₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
6	Eco espín	T ₁	0,39x0,39	1,5	Sin artefacto	
7	Eco espín	T ₁	0,83x0,83	6,9	Sin artefacto	
8	Eco espín	T ₁	1,04x1,04	10,8	Sin artefacto	
9	Eco espín	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
10	Eco espín	T ₁	0,83x0,83	3,4	Sin artefacto	
11	Eco espín	T ₁	0,52x0,52	2,7	Sin artefacto	
12	Eco espín	T ₁	0,83x0,83	3,4	Sin artefacto	
13	Eco espín	T ₁	0,83x0,83	6,9	Sin artefacto	

14	Eco espín	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
15	Inversión recuperación*	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
16	Inversión recuperación*	T ₁	1,04x1,04	10,8	Sin artefacto	
17	Gradiente eco+	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
18	Gradiente eco+	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
19	Gradiente eco+	T ₁	0,68x0,68	2,3	Sin artefacto	
20	Gradiente eco+	T ₁	1,04x1,56	8,1	Sin artefacto	
21	Gradiente eco☆	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
22	Gradiente eco☆	T ₁	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
23	Eco espín	T ₂	1,04x1,04	5,4	Artefacto por inhomogeneidades del campo magnético	

24	Eco espín	T ₂	0,83x0,83	6,9	Sin artefacto	
25	Eco espín	T ₂	1,04x1,04	5,4	Sin artefacto	
26	Turbo eco espín	T ₂	1,04x1,04	5,4	Artefacto por inhomogeneidades del campo magnético	
27	Turbo eco espín	T ₂	0,83x0,83	6,9	Sin artefacto	
28	Eco espín	T ₂	0,83x1,00	4,1	Artefacto por inhomogeneidades del campo magnético	
29	Eco espín	T ₂	1,04x1,04	10,8	Saturación de señal	
30	Eco espín	T ₂	1,04x1,04	5,4	Repliegues	
31	Eco espín	T ₂	0,83x0,83	3,4	Sin artefacto	

* Tiempo de inversión = 400ms
+ Ángulo de basculación = 35°
✱ Ángulo de basculación = 90°

A continuación se presentan los resultados del procesamiento digital de las imágenes RMI, el análisis de los criterios de calidad y la selección de las mejores secuencias de acuerdo con los parámetros establecidos para cítricos (Tabla 4.3).

Procesamiento digital de las imágenes y análisis de criterios de calidad

En la Tabla 5.7 se presentan los resultados del procesamiento digital correspondientes al contraste entre las diferentes regiones estudiadas, las relaciones señal/ruido, la presencia de artefactos y el tiempo de adquisición empleado por el equipo RMI en cada una de las imágenes, agrupados según la secuencia evaluada y la ponderación de las señales de RM de la imagen.

Tabla 5.7. Resultados del procesamiento digital de las imágenes RMI de cítricos según secuencia empleada y ponderación de la señal.

#	SECUENCIA		C _{F-F}	C _{F-A}	C _{A-P}	C _{P-T}	C _{P-C}	C _{C-T}	S/R	S/R	Art	T _{ad} m:s
	Tipo	Cte	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	RMI	fondo		
1	Eco espín	T ₁	143	96	73	13	121	108	67	143	No	1:27
2	Eco espín	T ₁	152	98	47	33	22	55	123	152	No	1:27
3	Eco espín	T ₁	124	70	37	45	86	131	57	149	No	0:24
4	Eco espín	T ₁	144	78	40	20	77	97	85	146	No	1:27
5	Eco espín	T ₁	177	117	34	23	68	92	100	135	No	2:13
6	Eco espín	T ₁	79	34	30	54	72	127	33	122	No	2:57
7	Eco espín	T ₁	172	93	18	13	78	90	128	135	No	2:13
8	Eco espín	T ₁	153	73	19	24	82	106	200	140	No	2:13
9	Eco espín	T ₁	197	148	63	28	109	137	203	163	No	4:51
10	Eco espín	T ₁	116	49	36	30	97	127	130	177	No	4:51
11	Eco espín	T ₁	109	38	34	19	105	124	102	134	No	4:51
12	Eco espín	T ₁	130	71	33	34	79	114	65	154	No	1:39
13	Eco espín	T ₁	169	95	28	21	67	88	150	146	No	1:39
14	Eco espín	T ₁	139	90	56	31	87	118	121	140	No	3:16
15	IR*	T ₁	195	120	2	38	75	113	133	148	No	2:32
16	IR*	T ₁	173	85	1	28	35	63	267	136	No	2:32
17	GE+	T ₁	81	34	66	7	81	88	71	154	No	0:41
18	GE+	T ₁	83	38	73	14	77	63	101	151	No	1:20
19	GE+	T ₁	74	40	66	1	77	76	43	265	No	1:20
20	GE+	T ₁	71	27	73	4	70	74	131	144	No	1:13
21	GE✳	T ₁	175	123	70	12	121	133	85	190	No	1:12
22	GE✳	T ₁	102	73	76	21	101	122	104	141	No	2:36
PROMEDIOS			134	77	44	23	81	102	153	114	*0 %	2:13
23	Eco espín	T ₂	96	68	81	16	101	85	90	187	Si	1:46
24	Eco espín	T ₂	78	45	51	11	67	79	115	192	No	1:46
25	Eco espín	T ₂	116	71	50	15	73	88	167	188	No	1:46
26	Turbo SE	T ₂	89	61	82	18	104	87	70	170	Si	1:07
27	Turbo SE	T ₂	74	48	44	2	61	59	90	145	No	1:07
28	Eco espín	T ₂	67	62	100	14	97	83	147	608	Si	3:24
29	Eco espín	T ₂	12	96	49	33	41	7	500	419	Si	3:16
30	Eco espín	T ₂	40	98	96	22	94	71	117	416	Si	4:51
31	Eco espín	T ₂	63	70	96	17	82	65	136	496	No	4:51
PROMEDIOS			71	55	72	16	80	69	313	159	*55 %	2:39

*Inversión Recuperación. tiempo de inversión = 400ms.

+Gradiente Eco, ángulo de basculación = 35°.

✧ Gradiente Eco, ángulo de basculación = 90°.

& Porcentaje de imágenes RMI ponderadas en T_1 o T_2 con presencia de artefactos.

Cte: tipo de contraste de la imagen (ponderación).

C_{F-F} , C_{F-A} , C_{A-P} , C_{P-T} , C_{P-C} , C_{C-T} : contraste flavelo-fondo, flavelo-albedo, albedo-pulpa, pulpa-tabique, pulpa-columela, columela-tabique, respectivamente.

S/R_{RMI} , S/R_{fondo} : relación señal-ruido de fondo en RMI antes y después del procesamiento.

Art: presencia de artefacto, T_{ad} : tiempo de adquisición de la imagen RMI.

En general todas las secuencias ponderadas en T_1 permitieron obtener un contraste más alto entre el flavelo y el fondo de la imagen, entre el flavelo y el albedo, entre la pulpa y el tabique y entre el tabique y la columela. Mientras que las secuencias ponderadas en T_2 permitieron obtener un contraste mayor entre el albedo y la pulpa. El contraste obtenido entre la pulpa y la columela con las secuencias ponderadas tanto en T_1 como en T_2 fue, en promedio, bastante similar (80 niveles de gris). Las dos estructuras del fruto que presentaron el contraste más alto, empleando las secuencias ponderadas en el tiempo de relajación T_1 , fueron la columela y el tabique (102 niveles de gris). Mientras que con las secuencias ponderadas en el tiempo de relajación T_2 , fueron la pulpa y la columela (80 niveles de gris).

Tanto en las secuencias ponderadas en T_1 como en T_2 los valores más bajos de contraste se presentaron entre la pulpa y el tabique (23 y 16 niveles de gris respectivamente). Precisamente por esto, este contraste fue el que se utilizó como uno de los criterios de selección para determinar la mejor calidad de imagen, dada la dificultad que se observó para distinguir esta estructura membranosa presente entre los gajos de los frutos.

La relación señal-ruido, antes y después del procesamiento digital de las imágenes presentó, en promedio, valores más altos en aquellas secuencias ponderadas en T_2 . Esto se puede explicar por la señal, en promedio más alta, obtenida con la aplicación de tiempos de repetición y de eco más largos para la reconstrucción de las imágenes usando secuencias ponderadas en T_2 , que incluso llegaron a saturar la señal en captación en algunas de estas secuencias.

Mientras en las secuencias en T_1 no se presentaron artefactos en la imagen reconstruida, la presencia de estas perturbaciones en las secuencias ponderadas en T_2 fue del 55% y su causa podría ser explicada por inhomogeneidades del campo magnético y saturación de las señales durante el proceso de reconstrucción, que son atribuidas a problemas propios del equipo RMI y no del producto explorado.

En promedio, el tiempo empleado por el equipo para la reconstrucción de las imágenes con las secuencias contrastadas en T_1 fue menor al empleado con las secuencias ponderadas en T_2 .

En la Tabla 5.8 se presentan los valores obtenidos en cada secuencia para cada uno de los seis criterios establecidos para determinar las imágenes con mejor calidad.

Tabla 5.8. Variables utilizadas para evaluar los criterios de calidad de las imágenes RMI de cítricos.

#	SECUENCIA Tipo y parámetros programados	S/R _{RMI} %	Art	T _{ad} s	Resolución mm ³	C _{P-T} n.g.	S/R _{fondo} %
1	SE-110-18-4-200x200-192x192	67	No	87	5,4	13	143
2	SE-110-18-4-200x200-192x192	123	No	87	10,8	33	152
3	SE-110-18-1-200x200-192x192	57	No	24	10,8	45	149
4	SE-110-18-4-160x160-192x192	85	No	87	6,9	20	146
5	SE-170-18-4-200x200-192x192	100	No	133	5,4	23	135
6	SE-170-18-1-200x200-256x256	33	No	177	1,5	54	122
7	SE-170-18-4-160x160-192x192	128	No	133	6,9	13	135
8	SE-170-18-4-200x200-192x192	200	No	133	10,8	24	140
9	SE-500-24-3-160x160-192x192	203	No	291	5,4	28	163
10	SE-500-24-3-200x200-192x192	130	No	291	3,4	30	177
11	SE-500-24-3-100x100-192x192	102	No	291	2,7	19	134
12	SE-500-24-1-160x160-192x192	65	No	99	3,4	34	154
13	SE-500-24-1-160x160-192x192	150	No	99	6,9	21	146
14	SE-1000-18-1-200x200-192x192	121	No	196	5,4	31	140
15	IR-780-18-1-200x200-192x192	133	No	152	5,4	38	148
16	IR-780-18-1-200x200-192x192	267	No	152	10,8	28	136
17	GE-200-80-1-200x200-192x192	71	No	41	5,4	7	154
18	GE-200-8-2-200x200-192x192	101	No	80	5,4	14	151
19	GE-200-8-2-130x130-192x192	43	No	80	2,3	1	265
20	GE-275-8-2-200x200-192x128	131	No	73	8,1	4	144
21	GE-180-8-2-200x200-192x192	85	No	72	5,4	12	190
22	GE-400-8-2-200x200-192x192	104	No	156	5,4	21	141
23	SE-540-120-1- 200x200-192x192	90	Si	106	5,4	16	187
24	SE-540-120-1- 160x160-192x192	115	No	106	6,9	11	192
25	SE-540-90-1- 200x200-192x192	167	No	106	5,4	15	188
26	SE-570-120-1- 200x200-192x192	70	Si	67	5,4	18	170
27	SE-570-120-1- 160x160-192x192	90	No	67	6,9	2	145
28	SE-1260-90-1- 160x160-192x162	147	Si	204	4,1	14	608
29	SE-1000-80-1- 200x200-192x192	500	Si	196	10,8	33	419
30	SE-1500-120-1- 200x200-192x192	117	Si	291	5,4	22	416
31	SE-1500-90-1- 160x160-192x192	136	No	291	3,4	17	496

S/R_{RMI}, S/R_{fondo}: relación señal-ruido de fondo antes y después del procesamiento.

Art: presencia de artefacto, T_{ad}: tiempo de adquisición de la imagen RMI.

C_{P-T}: contraste pulpa-tabique, n.g.: nivel de gris.

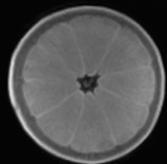
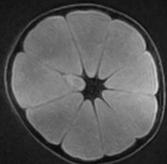
En la Tabla 5.9 se muestra el número de imágenes que cumplieron cada uno de los criterios de calidad establecidos para cada uno de los dos grupos de secuencias reunidos según la ponderación del contraste.

Tabla 5.9. Número de imágenes RMI que cumplieron los criterios de calidad establecidos.

Secuencias contrastadas en	# RMI	Criterio 1 S/R _{RMI}	Criterio 2 artefactos	Criterio 3 T _{ad}	Criterio 4 Resolución	Criterio 5 Cp-t	Criterio 6 S/R _{fondo}
T ₁	22	19	19	9	7	2	1
T ₂	9	9	4	4	4	1	1

Por tanto después de aplicar los seis criterios de calidad establecidos en este estudio, se encontró que las secuencias seleccionadas que permiten obtener la mejor calidad de imagen del interior del fruto cítrico, fueron las siguientes (Tabla 5.10):

Tabla 5.10. Secuencias seleccionadas y parámetros de calidad obtenidos.

Secuencia - T _R - T _E - N _{ex}	Cte	S/R _{RMI} %	T _{ad} (s)	Artefacto	Voxel (mm ³)	C _{P-T} n.g.	S/R _{fondo} %	RMI
SE-500-24-1 Matriz: 192x192 FOV: 160x160 (secuencia #13)	T ₁	150	99	No	6,9	21	146	
SE-1500-90-1 Matriz: 192x192 FOV: 160x160 (secuencia #31)	T ₂	136	291	No	3,4	17	496	

SE: secuencia espín eco
T_R: tiempo de repetición (ms)
T_E: tiempo eco (ms)
FOV: campo de visión (mm x mm)
N_{ex}: número de excitaciones
Cont: tipo de contraste (ponderación)
S/R_{RMI}, S/R_{fondo}: relación señal-ruido de fondo antes y después del procesamiento
T_{ad}: tiempo de adquisición de la imagen (s)
C_{p-t}: contraste pulpa-tabique (n.g.)
Cte: contraste
n.g.: nivel de gris

Imágenes RMI de cítricos fueron publicadas antes por Hinshaw *et al.* (1977), Andrew (1980) citado por Clark *et al.* (1997 y 1999), Chen (1989), Clark *et al.* (1999), Moltó y Blasco (2003), Galed *et al.* (2004), y Hernández *et al.* (2005). En estos trabajos se utilizaron diferentes parámetros de

adquisición y tipos de secuencias tales como; eco espín y gradiente eco en T_1 en T_2 en DP, “FAST SE” en T_2 , y FLASH en T_2^* con objetivos de visualización y equipos RMI muy diferentes en cada caso. Por lo anterior, la búsqueda de las secuencias seleccionadas en esta tesis no se basó en ninguno de estos trabajos antecedentes.

Los contrastes entre estructuras y la resolución de las imágenes obtenidas con las secuencias seleccionadas en este trabajo fueron, comparativamente, mejores a las publicadas por Chen (1989) y Galed *et al.* (2004). Sin embargo, las imágenes obtenidas por Clark *et al.* (1999) basadas en mapas en T_2 permitieron visualizar mejor la morfología de los sacos de jugo dentro de los segmentos de la pulpa en mandarina Satsuma que las imágenes contrastadas en T_2 de naranjas, obtenidas aquí, y las imágenes publicadas por Hernández *et al.* (2005), aunque de menor calidad, son las únicas de cítricos, que se tenga conocimiento, adquiridas en condiciones dinámicas.

Para el ensayo preliminar de seguimiento de daños en melocotones con imágenes RMI se utilizó la secuencia número 10 (Tabla 5.5), sin embargo para el experimento de detección automática de los daños por frío, por hongo saprofito y por mosca se decidió utilizar las mismas secuencias (13 y 31) seleccionadas para cítricos (Tabla 5.10). Estas secuencias y sus parámetros se escogieron, para ser evaluadas, por la adecuada calidad de imagen que permitieron entregar en exploraciones previas realizadas a frutos de melocotón. La alta calidad de imagen (gran contraste entre estructuras contiguas) lograda con ambos tipos de frutas tan distintas, podría ser explicada por la similar composición química que presentan estos productos (ver Anexo A2). Aunque no se realizaron pruebas específicas para determinar la composición de los frutos utilizados en esta tesis, los valores encontrados en la literatura indican que, a pesar de las diferencias morfológicas, los porcentajes de agua libre, de proteínas, lípidos, carbohidratos y de otros compuestos con presencia de hidrogeno, no presentan notables diferencias. Aunque la distribución de estos compuestos en los tejidos de las frutas sea diferente, las secuencias seleccionadas permitieron contrastar, adecuadamente, las señales emitidas por las diferentes estructuras morfológicas. En cuanto a los daños, a pesar de ser de diferente origen y fruta, también se pudieron visualizar con estas dos secuencias.

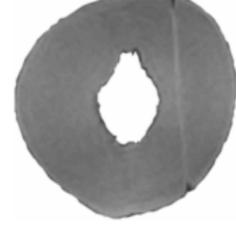
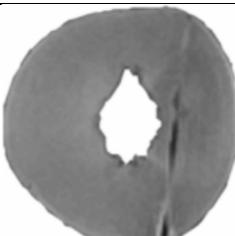
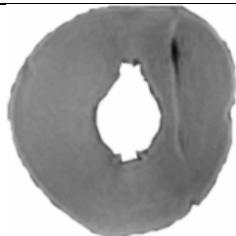
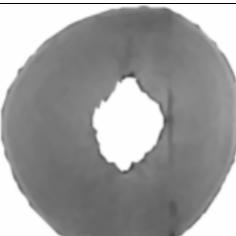
5.2. Resultados del ensayo preliminar en melocotones

5.2.1. Frutos inoculados con *Penicillium digitatum*

En las Tablas 5.11 y 5.12 se muestran respectivamente, las imágenes procesadas de la pulpa sin el hueso, para el plano de corte seleccionado, en los frutos inoculados con el método 1 (inoculación con gotas en media porción de fruto) y con el método 2 (inoculación de gotas inyectadas con jeringuilla).

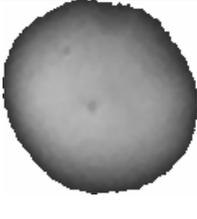
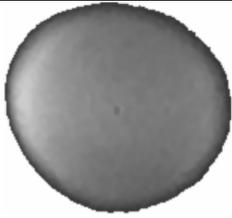
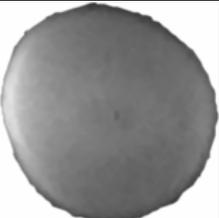
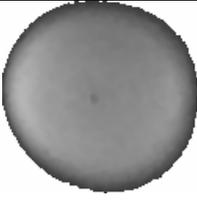
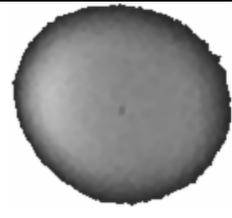
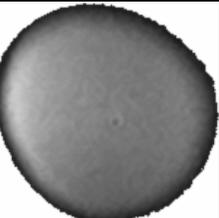
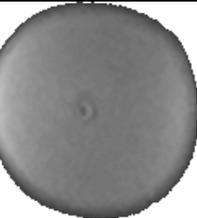
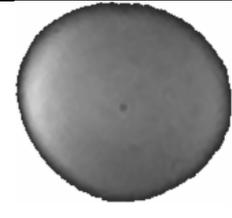
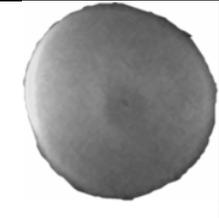
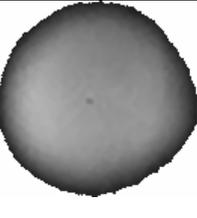
En todas las imágenes de los frutos inoculados con el método 1 se aprecia claramente la línea de corte, aunque en el tiempo cero ésta no es tan evidente. A partir de las 20 horas, las imágenes en los frutos inoculados con hongo muestran la línea de división del fruto conformada por píxeles de mayor intensidad de brillo (>124 niveles de gris) que probablemente corresponden a zonas en el mesocarpio donde el hongo se desarrolló. En los frutos 1, 2 y 3 las imágenes, a partir de las 48 horas, muestran en la línea divisora del fruto píxeles más oscuros que corresponden a cavidades con aire formadas entre las dos porciones de fruto. Estas cavidades que no fueron consideradas como daño, se hacen más evidentes con el tiempo cuando el fruto se ha deshidratado más. El fruto 3 (control) no mostró externamente desarrollo alguno del hongo durante el ensayo, a diferencia de los frutos inoculados con el patógeno.

Tabla 5.11. Imágenes MRI de melocotones inoculados con *Penicillium digitatum* usando el método 1.

Tiempo (horas)	Fruto 1 (10 ³ esporas/ml)	Fruto 2 (10 ⁵ esporas/ml)	Fruto 3 Agua (testigo)
0			
20			
48			
92			

Con el método de inoculación 2, aunque al inicio del experimento (0 horas) no se observó la perforación dejada por la aguja, ésta se pudo ver en todas las imágenes de los cuatro frutos, posteriormente. La cavidad se observó como un pequeño punto oscuro en el centro del fruto (Tabla 5.12), formado por píxeles de menor intensidad de brillo. Los frutos 5 y 6 inoculados con una concentración de 10^4 y 10^5 esporas por ml, respectivamente, presentaron desarrollo del hongo en el interior del fruto.

Tabla 5.12. Imágenes MRI de melocotones inoculados con *P. digitatum* usando el método2.

Tiempo (horas)	Fruto 4 (10^3 esporas/ml)	Fruto 5 (10^4 esporas/ml)	Fruto 6 (10^5 esporas/ml)	Fruto 7 Agua (testigo)
0				
20				
48				
92				

Este desarrollo se muestra ligeramente en las imágenes como una pequeña y concéntrica zona de píxeles con diferente intensidad de señal rodeando el orificio de perforación (imágenes adquiridas a las 48 horas), mientras que externamente no se logró apreciar daño en el fruto. Las imágenes RMI adquiridas a 92 horas también mostraron un crecimiento del área interna afectada por el hongo. Esta zona mostró, en el fruto 5, una región de píxeles con menor intensidad de brillo, mientras que el fruto 6 la zona mostró un grupo de píxeles con mayor intensidad de brillo, cubriendo casi toda la sección, y coincidiendo con lo reportado por Glidewell *et al.* (1997) para imágenes RMI de uvas, inoculadas con *B. cinerea*, usando un similar método de inoculación.

En la Tabla 5.13 se presentan los valores medios de nivel de gris (S_m) obtenidos en la región de la pulpa de cada fruto de melocotón, para los diferentes tiempos en que fue realizada la exploración con el equipo de resonancia magnética.

Tabla 5.13. Señal media (nivel de gris) de la región pulpa obtenida en las imágenes RMI de los frutos estudiados.

Tiempo (horas)	Método inoculación 1						Método inoculación 2							
	Fruto 1 (10^3)*		Fruto 2 (10^5)		Fruto 3 Control**		Fruto 4 (10^3)		Fruto 5 (10^4)		Fruto 6 (10^5)		Fruto 7 Control	
	S_m	DE	S_m	DE	S_m	DE	S_m	DE	S_m	DE	S_m	DE	S_m	DE
0	122	15	123	14	122	12	118	27	121	31	123	34	122	39
20	121	10	119	9	122	12	121	28	122	28	128	27	121	27
48	120	12	120	9	121	11	117	35	112	36	122	22	120	27
92	122	13	123	14	122	14	118	29	121	33	123	23	122	40

*Concentración del hongo (número de esporas/ml) , ** Agua destilada

S_m : Señal media , DE: desviación típica

Se puede observar que la señal media de la pulpa en todos los frutos varió muy poco. Esta señal estuvo entre 117 y 123 niveles de gris. Sin embargo la desviación típica de la señal fue mayor en las imágenes de los frutos inoculados con el segundo método. Esto fue debido a que las imágenes del método 2 utilizadas para el análisis, correspondieron a un plano de corte más externo con relación al centro del fruto y en el cual tuvo mayor efecto la presencia de ruido durante la reconstrucción de la imagen. La desviación típica para estos frutos estuvo entre 22 y 40 niveles de gris, mientras que para los frutos inoculados con el método 1 estuvo entre 9 y 15 niveles de gris. Los histogramas de distribución de niveles de gris de la pulpa en los frutos

utilizados en cada método fueron muy similares en forma y amplitud y la señal de la pulpa de los frutos del método 2 presentó un rango dinámico más amplio.

En la Tabla 5.14 se presentan los valores medios de la señal obtenidos para las regiones que presentaron daño en la pulpa en el momento de la exploración. En los dos métodos utilizados no se verificó por RM ningún daño al momento de la inoculación (inicio del experimento). En todos los frutos inoculados con el hongo mediante el método 1, se observó en las imágenes RMI una región de mayor brillo considerada como daño. En el método 2 se observó daño en los frutos inoculados a partir de 48 horas, excepto en el fruto inoculado con la menor concentración (10^3), en el cual no se observó desarrollo del hongo. En el método 1 el fruto control, inoculado con agua destilada, presentó una región con una señal media de 152 que realmente no correspondió a un daño como se verificó por inspección visual del fruto, mientras que en el fruto control del método 2 no fue claro si hubo un daño interno por contaminación, o si solo fue ruido en la señal debido al plano en que se reconstruyó la imagen. En las imágenes analizadas se presentó mucha variación en los valores de las señales medias de las regiones con daño y no se observó una tendencia clara, para los dos métodos probados, entre la señal de los píxeles de estas regiones con daño y las concentraciones de esporas empleadas. Se requiere obviamente en futuros ensayos probar los métodos de inoculación con suficientes frutos y repeticiones.

Tabla 5.14. Señal media de la región con daño por *Penicillium digitatum* obtenida en las imágenes RMI de los frutos estudiados.

Tiempo (horas)	Método inoculación 1			Método inoculación 2			
	Fruto 1 (10^3)* S_m DE	Fruto 2 (10^5) S_m DE	Fruto 3 Control** S_m DE	Fruto 4 (10^3) S_m DE	Fruto 5 (10^4) S_m DE	Fruto 6 (10^5) S_m DE	Fruto 7 Control S_m DE
20	129 7	128 9	152 4	Sin daño	Sin daño	Sin daño	Sin daño
48	141 5	126 3	Sin daño	Sin daño	129 5	125 3	Sin daño
92	130 5	124 10	Sin daño	Sin daño	103 4	159 13	Sin daño

*Concentración del hongo (número de esporas /ml) , ** Agua destilada

S_m : señal media , DE: desviación típica

En la Tabla 5.15 se presentan los valores medios de contraste entre la región de la pulpa y la región con daño determinados a partir de las señales medias de ambas imágenes en cada fruto. El contraste obtenido en T_1 con la secuencia espín eco aplicada, fue en la mayoría de imágenes muy bajo (2, 3 ó 7 niveles de gris), en otras fue bajo (20-30 niveles de gris) y solo en una fue

alto (64 niveles de gris). Para las imágenes de la Tabla 5.15, en que no se determinó el contraste fue debido a que no se encontró daño. Dado que se utilizó tan solo un fruto por cada concentración de esporas, no se pudieron observar relaciones claras entre la concentración del hongo y el contraste de las imágenes, y tampoco se observó una tendencia bien definida del contraste con el tiempo.

Tabla 5.15. Contraste pulpa-daño obtenido en las imágenes RMI estudiadas.

Tiempo (horas)	Método inoculación 1			Método inoculación 2			
	Fruto 1 (10 ³)*	Fruto 2 (10 ⁵)	Fruto 3 Control**	Fruto 4 (10 ³)	Fruto 5 (10 ⁴)	Fruto 6 (10 ⁵)	Fruto 7 Control
20	8	9	30	Sin daño	Sin daño	Sin daño	Sin daño
48	21	7	Sin daño	Sin daño	17	3	Sin daño
92	7	2	Sin daño	Sin daño	20	64	Sin daño

*Concentración del hongo (número de esporas /ml), ** Agua destilada

En la Tabla 5.16 se presenta el área de la pulpa y el área del daño, determinadas en las imágenes RMI de los frutos en que se desarrolló el hongo *P. digitatum*. Con estos valores se estimó también el porcentaje del área de la pulpa afectada por el hongo. En general se observó la tendencia lógica de incrementarse el daño con el tiempo, en concordancia a lo obtenido por Glidewell *et al.* (1997) en uva con *B. cinerea* y a los resultados de Galed *et al.* (2004) en mandarina Fortuna y naranja Valencia con *P. digitatum*, quienes también realizaron el seguimiento del daño con imágenes RMI a estos hongos.

Tabla 5.16. Evolución del área (mm²) de las regiones de pulpa y daño en los frutos infestados con *Penicillium digitatum*.

Tiempo (horas)	Método 1						Método 2					
	Fruto 1 (10 ³)*			Fruto 2 (10 ⁵)			Fruto 5 (10 ⁴)			Fruto 6 (10 ⁵)		
	Pulpa	Daño	%	Pulpa	Daño	%	Pulpa	Daño	%	Pulpa	Daño	%
0	2862	0	0,0	2938	0	0,0	3380	0	0,0	1608	0	0,0
20	2787	53	1,9	2756	64	2,3	3052	0	0,0	1951	0	0,0
48	2808	24	0,9	2652	64	2,3	2847	15	0,5	2273	5	0,2
92	2616	72	2,7	2619	42	1,6	3131	159	4,8	641	812	55,9

*Concentración del hongo (número de esporas /ml)

En los frutos de melocotón de este estudio, las diferencias en el área total de la pulpa se deben a que la imagen analizada no fue posible adquirirla exactamente en el mismo plano con relación a las demás. De otro lado, el fruto fue perdiendo agua y se fue encogiendo durante su almacenamiento. El

melocotón que presentó mayor área de pulpa afectada por el hongo (56%) fue el inoculado con la mayor concentración de esporas utilizando el método 2.

Finalmente, en la Tabla 5.17 se muestran las imágenes de los frutos a las 20 horas y a las 92 horas de la inoculación. En ellas se observa como a las 92 horas de inoculación se evidenció externamente el daño ocasionado, probablemente, por el hongo *P. digitatum*, manifestándose éste como un pardeamiento y ablandamiento de la piel alrededor del punto de corte (método 1) o de inyección (método 2). Se muestra también, en una sección de cada melocotón, el estado final de la pulpa según el tratamiento de inoculación realizado. No se descarta la posibilidad de que el daño, en principio atribuido al hongo *P. digitatum*, hubiese sido también provocado por la fuerte agresión mecánica realizada en los tejidos durante su corte en el caso de los frutos inoculados por el método 1.

Tabla 5.17. Imágenes de los frutos de melocotón a las 20 y 92 horas después de la inoculación de *Penicillium digitatum*.

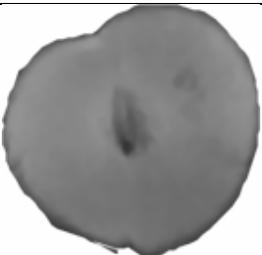
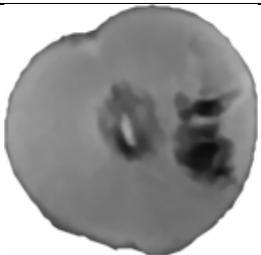
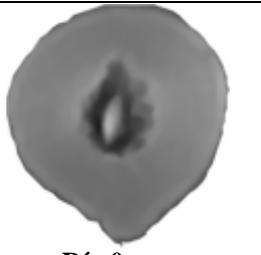
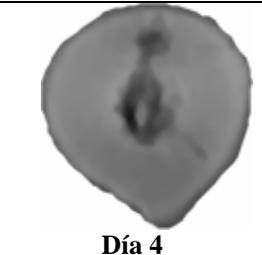
Fruto (# esporas/ml)	20 horas	92 horas	Sección interna final
1 (10^3)			
2 (10^5)			
3 (Testigo)			

<p style="text-align: center;">4 (10³)</p>			
<p style="text-align: center;">5 (10⁴)</p>			
<p style="text-align: center;">6 (10⁵)</p>			
<p style="text-align: center;">7 (Testigo)</p>			

5.2.2. Daño por larvas de *Ceratitis capitata* Wied

En la Tabla 5.18 se muestran las imágenes RMI sin fondo y suavizadas con un filtro de media para los cuatro frutos de melocotón usados en este estudio.

Tabla 5.18. Imágenes RMI que muestran la evolución del daño interno en melocotón ocasionado por larvas de la mosca de la fruta.

Fruto verde B1, corte 2		
 Día 0	 Día 4	 Día 7
Fruto verde B4, corte 1		
 Día 0	 Día 4	 Día 7
Fruto maduro B5, corte 1		
 Día 0	 Día 4	 Día 6
Fruto maduro B7, corte 1		
 Día 0	 Día 5	 Día 7

En dos de los frutos (B5 y B7) el deterioro interno se hizo evidente con RMI desde el inicio del ensayo y se observó un incremento progresivo de este daño debido a la actividad de las larvas de *Ceratitis capitata*. Este deterioro se manifestó en las imágenes como una pequeña región de píxeles generalmente de menor intensidad de brillo respecto a los píxeles correspondientes a la pulpa sana del fruto. Esta región se fue extendiendo en tamaño y localización con el tiempo hasta conseguir deteriorar una importante zona interna del mesocarpio y evidenciarse externamente con el oscurecimiento de la piel, como se comprobó al final del ensayo cuando se realizó la disección de cada uno (Tabla 5.21).

La Figura 5.5 muestra los histogramas de distribución de niveles de gris construidos a partir de la información generada en el análisis de las imágenes de los cuatro frutos, para cada una de las regiones estudiadas: la pulpa, el hueso (incluye la semilla) y el daño (zona de la pulpa deteriorada por las larvas de mosca).

Se encontró que la distribución de la señal emitida por la pulpa, comprendida entre 60 y 255 niveles de gris, fue bastante similar en los tres tiempos de muestreo. Con el paso de los días el número de píxeles correspondientes a la señal emitida por la pulpa se redujo debido al incremento de la región de pulpa afectada por las larvas de la mosca. Los histogramas obtenidos para el hueso presentaron un rango dinámico mucho más amplio, entre 6 y 254 niveles de gris. Éste presentó ligeras variaciones en algunos picos debido, principalmente a que las imágenes RMI analizadas presentaban diferentes planos de corte del fruto y, por tanto, del hueso, localizando en algunos la semilla que emite en T_1 una señal alta (frutos B4 y B5) mientras en otros esta no quedó ubicada por el corte (frutos B1 y B7).

La señal correspondiente a la región de pulpa con daño fue aumentando en rango dinámico y en número de píxeles con el tiempo. Como era de esperar, los histogramas para el daño resultaron más desplazados hacia la izquierda debido a la baja señal emitida por la pulpa. Los tejidos afectados y las cavidades dejadas por las larvas en la pulpa mostraron una baja señal en T_1 debido a la alteración y ausencia de agua. El deterioro ocurrió de manera muy similar tanto en los frutos maduros como en los inmaduros y se extendió en diferentes planos paralelos del fruto como lo indica la Tabla 5.18. Es probable que las pequeñas zonas con señal de mayor intensidad mostradas al interior de la región deteriorada, puedan corresponder a la señal emitida por las pequeñas

larvas (fruto B7, día 7), de acuerdo con lo reportado por Chen *et al.* (1989) para imágenes RMI de pera. Sin embargo, para probar esto habría que utilizar la secuencia con mayor campo de visión (FOV).

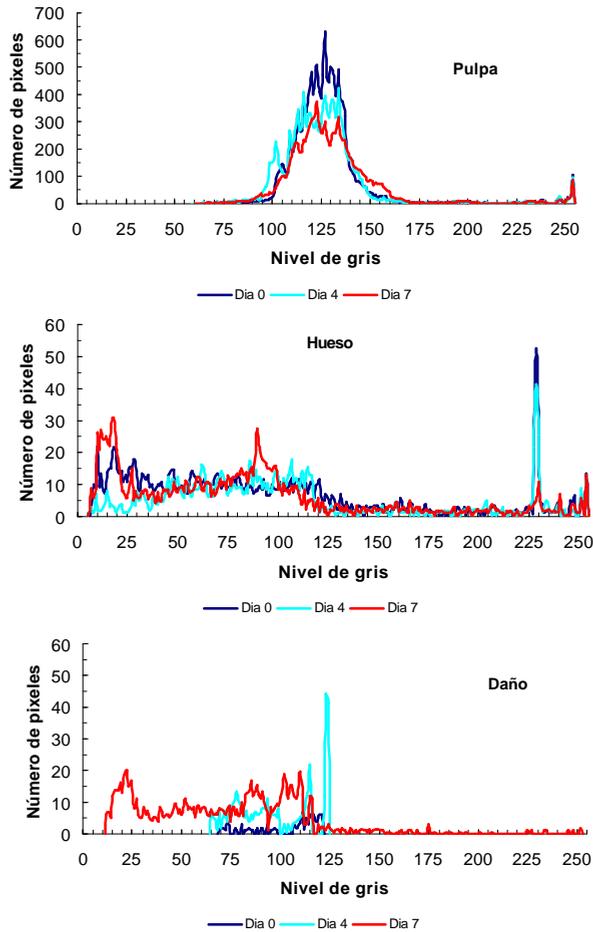


Figura 5.5. Histogramas de distribución de niveles de gris para las regiones de pulpa, hueso y daño para el melocotón en el tiempo.

En la Tabla 5.19 se presentan los valores medios de intensidad de la señal para cada región y el contraste obtenido entre estas para los cuatro frutos utilizados en el ensayo. Con la secuencia SE utilizada y para las imágenes estudiadas en estos frutos, los valores medios más altos de contraste en T_1 se alcanzaron al inicio y al final del ensayo entre las regiones de la pulpa y el

hueso. En los tres días de exploración, el contraste entre la pulpa y el hueso fue superior al contraste presentado entre la pulpa y el daño. La región afectada por las larvas de mosca mostró menor contraste respecto al hueso en comparación con la pulpa. Debido al crecimiento de la región deteriorada por el insecto al final del ensayo, el contraste entre la zona dañada y la pulpa aumentó considerablemente.

Tabla 5.19. Señal media y contraste obtenido entre las regiones del melocotón infestado por *C. capitata*.

Tiempo	Señal media (n.g.)*			Contraste (n.g.)		
	Pulpa	Hueso	Daño	Pulpa-hueso	Pulpa-daño	Hueso-daño
Día 0	126	84	103	42	23	19
Día 4	123	93	105	30	18	12
Día 7	127	79	91	48	36	13

*n.g.: nivel de gris

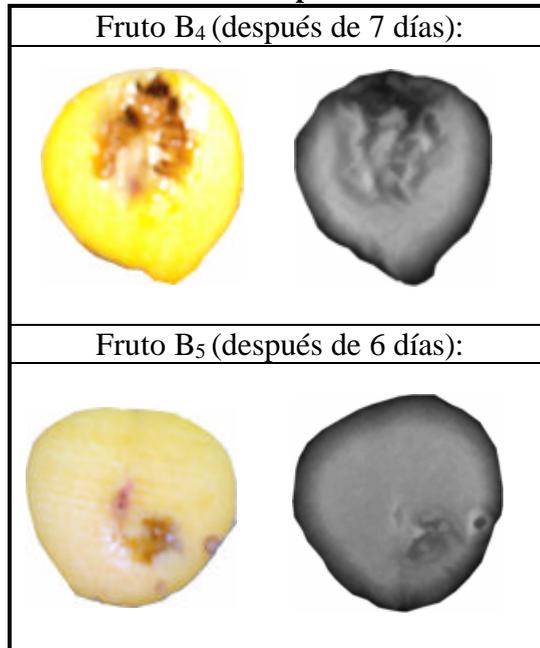
En la Tabla 5.20 se presentan los valores medios de las áreas correspondientes a las regiones pulpa y daño ocasionado en ésta para los frutos estudiados. Estos valores corresponden al promedio de los cuatro planos (imágenes) escogidos, cada uno calculado con un espesor de 10 mm. La reducción en el área de la pulpa fue debida al incremento del área dañada por el insecto, que alcanzó al séptimo día el 6% del área inicial, y probablemente también fue debida a la pérdida de peso (10%) por la deshidratación que sufrieron los frutos dejados a temperatura y humedad relativa ambiente durante el ensayo.

Tabla 5.20. Variación del área de la pulpa y del daño durante el ensayo.

Día	Pulpa mm ²	Daño	
		mm ²	%
0	2233	5,2	0,2
4	2087	41,2	2,0
7	2003	125,4	6,3

En la Tabla 5.21 se muestran para dos de los frutos de melocotón utilizados en el ensayo la comparación entre sus imágenes RMI y las respectivas fotos de la sección del fruto (al final del ensayo) una vez cortado en un plano similar al de la adquisición de la imagen RMI.

Tabla 5.21. Imágenes del daño interno en melocotón ocasionado por larvas de mosca.



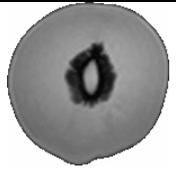
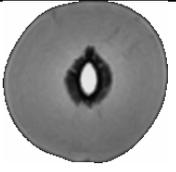
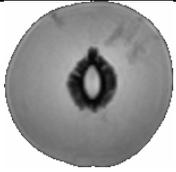
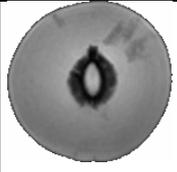
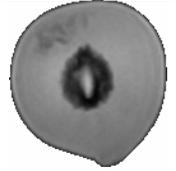
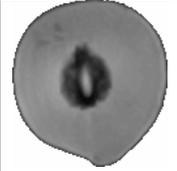
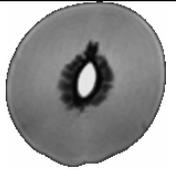
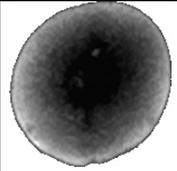
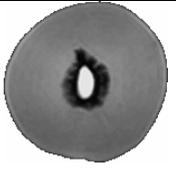
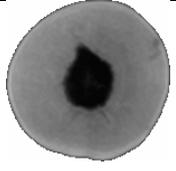
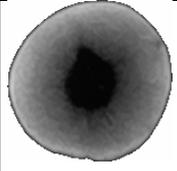
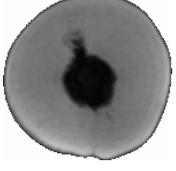
Se deduce de la Tabla 5.21 que las imágenes RMI representan con buena aproximación el deterioro interno ocasionado en el melocotón por la mosca de la fruta, deterioro que es difícil de observar al poco tiempo de la infección sin recurrir a un método destructivo de inspección de calidad.

5.2.3. Frutos almacenados a muy baja temperatura

En la Tabla 5.22 se muestran las imágenes RMI, sin fondo, de un plano central de los frutos de melocotón y obtenidas para dos temperaturas de almacenamiento, a 1°C y a -10°C.

Los frutos utilizados en el ensayo presentaban desde el inicio daños internos en la pulpa, no apreciados externamente y debidos a la mosca de la fruta. Este daño interno no tuvo progreso durante los siguientes cinco días de observación, debido a las bajas temperaturas en las que muy probablemente las larvas de la mosca no pudieron sobrevivir.

Tabla 5.22. Imágenes MRI de melocotones almacenados a 1°C y a -10°C.

Frutos a 1°C:	Inicio	Día 2	Día 5
N₁			
N₂			
N₃			
Frutos a -10°C:	Inicio	Día 2	Día 5
C₁			
C₂			
C₃			

En las Figuras 5.6 y 5.7 se presentan respectivamente, los histogramas de distribución de niveles de gris para las tres regiones estudiadas en los melocotones almacenados a 1°C y a -10°C. Se puede observar el gran efecto que tuvo la temperatura de congelamiento en la distribución de la señal para los diferentes tiempos de exploración en las tres estructuras estudiadas. El debilitamiento de la señal de la pulpa (oscurecimiento en las imágenes RMI mostradas en la Tabla 5.22) para los melocotones almacenados a -10°C, correspondió con un ensanchamiento del histograma en el que los niveles de gris presentaron una distribución más uniforme de sus píxeles hacia el quinto día de almacenamiento a -10°C (Figura 5.7). Esta disminución de la señal también fue registrada por Kerr *et al.* (1997) en el pericarpio interior y en la pulpa de kiwi, cuyas imágenes RMI fueron ponderadas en T₂. Este comportamiento es de esperarse, pues la cristalización de las moléculas de agua, presentes en los tejidos de la pulpa de estos frutos, ocasiona que los protones emitan poca señal durante su relajación tanto en T₁ como en T₂.

Una situación diferente se observó con la pulpa de los melocotones almacenados a 1°C, en la que el agua libre de sus tejidos no alcanzó el punto de congelamiento, y por el contrario aumentó ligeramente la señal media, de 119 a 130 niveles de gris, durante su relajación en T₁ (leve desplazamiento del histograma de la pulpa hacia la derecha en la Figura 5.6).

Para la región del hueso, la señal media se mantuvo muy similar durante los 5 días de almacenamiento a 1°C con una media relativamente baja que osciló entre 46 y 49 niveles de gris (Figura 5.6). Sin embargo en los frutos congelados la señal media bajó a 9 niveles de gris, señal que se podría considerarse casi nula, evidenciando así la cristalización que sufrieron también los rígidos tejidos de esta estructura del melocotón.

En el caso de la semilla a 1°C ésta estructura disminuyó su señal de 215 niveles de gris al inicio del ensayo, a 127 niveles de gris al quinto día de almacenamiento tal como lo indica el desplazamiento hacía la izquierda del histograma (Figura 5.7) y el oscurecimiento del centro del hueso en las imágenes de la Tabla 5.22.

A la temperatura de -10°C al segundo y al quinto día de medición, la semilla no emitió señal en T₁, razón por la cual no se visualiza en el interior del hueso en las imágenes de los frutos congelados (Tabla 5.22) ni en el último histograma de la Figura 5.7. Según Kerr *et al.* (1997), los procesos de

relajación de los protones asociados al hielo (generalmente sólidos) son tan rápidos que ellos no contribuyen a la señal.

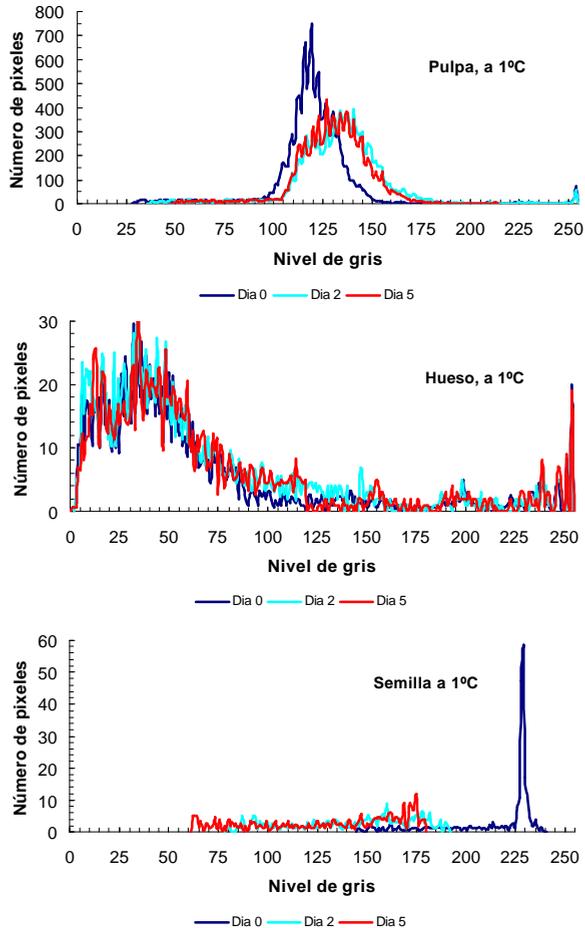


Figura 5.6. Histogramas de distribución de niveles de gris para las regiones de pulpa, hueso y semilla en los melocotones almacenados a 1°C.

Las imágenes RMI al inicio del ensayo en todos los frutos presentaron similitud en distribución de la señal, pues para ese tiempo de exploración todos los frutos provenían de las mismas condiciones de almacenamiento previas. Sin embargo, las imágenes y sus histogramas obtenidos en los días dos y cinco, mostraron diferencias claras en la señal entre los frutos

almacenados a las dos temperaturas probadas. Esta diferencia podría ser entonces atribuida a la cristalización sufrida por los tejidos de los frutos congelados, que en las imágenes se observa como la disminución del brillo desde el pericarpio hacia el mesocarpio del fruto. La señal nula de la semilla al interior del hueso podría ser explicada, probablemente, como consecuencia de la cristalización del agua interior de esta estructura, y no por la deshidratación interna del fruto, ya que la pérdida media de agua de los frutos almacenados a -10°C fue bastante menor comparada con la obtenida en los frutos almacenados a 1°C (aproximadamente un 3 % el segundo día y un 7% el quinto día de almacenamiento).

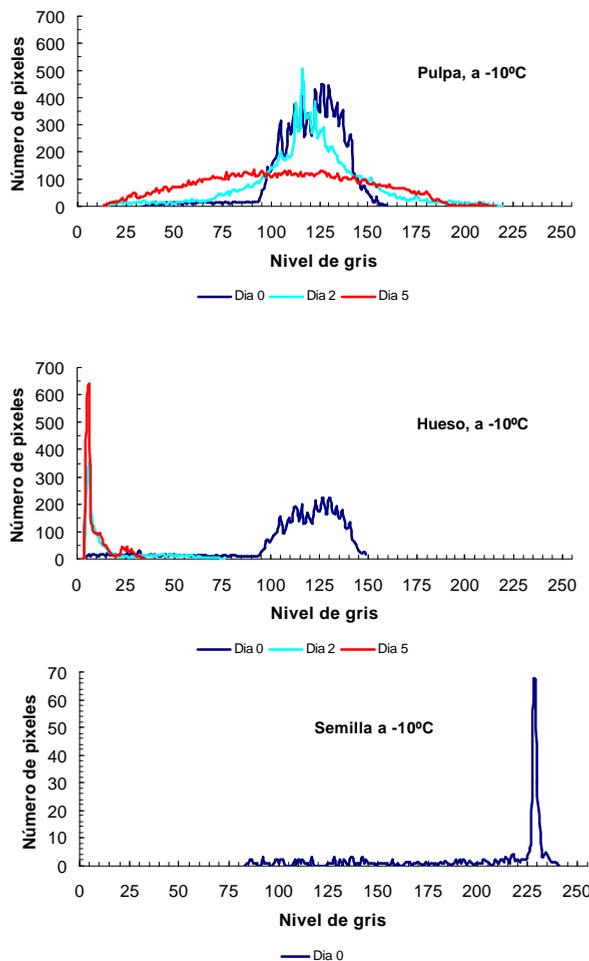


Figura 5.7. Histogramas de distribución de niveles de gris para las regiones de pulpa, hueso y semilla en los melocotones almacenados a -10°C .

En la Tabla 5.23 se presenta la señal media (S_m) y su desviación típica (DE) obtenida para cada región en los frutos almacenados a 1°C y a -10°C al inicio, a los dos y a los cinco días del ensayo. Para los tres tiempos en que se aplicó la secuencia eco contrastada en T_1 , se presentaron diferencias estadísticas entre la señal emitida por la pulpa y la emitida por el hueso. Sin embargo, no se presentó efecto de la temperatura de almacenamiento en la señal media para cada una de las regiones estudiadas. En el caso de los frutos dejados a 1°C, la señal media de la semilla difirió estadísticamente de la señal media de la pulpa solo al inicio del experimento, y para el día 5 la señal emitida por el hueso en los frutos congelados presentó diferencias estadísticas respecto a los frutos almacenados a 1°C. Las mayores desviaciones de la señal media se presentaron a partir del día 2 en los frutos dejados a 1°C y estas fueron mayores a 12 niveles de gris.

Tabla 5.23. Señal media obtenida según temperatura de almacenamiento y región estudiada del fruto de melocotón.

T °C	Región	Día 0		Día 2		Día 5	
		S_m *	DE**	S_m	DE	S_m	DE
1	Pulpa	119 ^b	3	132 ^b	4	130 ^c	2
	Hueso	46 ^a	8	48 ^a	12	49 ^b	10
	Semilla	215 ^c	7	139 ^b	15	127 ^c	22
-10	Pulpa	120 ^b	6	120 ^b	6	106 ^c	10
	Hueso	43 ^a	3	15 ^a	7	9 ^a	3
	Semilla	215 ^c	9	Sin señal	Sin señal	Sin señal	Sin señal

* En una columna valores con distinta letra denotan diferencia al 5% según Test de mínima diferencia significativa

** Desviación típica

Con los valores medios de señal se determinaron los contrastes entre las regiones estudiadas en los tres días de exploración (Tabla 5.24). El valor más alto de contraste se obtuvo para ambas temperaturas de almacenamiento, al inicio del ensayo, entre el hueso y la semilla. El mayor contraste se registró entre la pulpa y el hueso en los frutos congelados al segundo y quinto día de almacenamiento. Para la secuencia SE utilizada aquí, los contrastes más bajos se presentaron entre la pulpa y la semilla de los frutos almacenados a 1°C a partir del segundo día de almacenamiento.

Tabla 5.24. Contrastes medios entre las regiones estudiadas.

Día	Contraste a 1°C			Contraste a -10°C		
	Pulpa-hueso	Pulpa-semilla	Hueso-semilla	Pulpa-hueso	Pulpa-semilla	Hueso-semilla
0	73	95	168	76	95	172
2	84	7	91	104	s.c.*	s.c
5	81	3	77	97	s.c.	s.c.

* s.c.: sin contraste

El resultado al seguimiento del área de las tres regiones estudiadas, en los frutos almacenados a las dos temperaturas, se presenta en la Tabla 5.25. En los frutos almacenados a 1°C el área de la pulpa y del hueso disminuyó con el tiempo, mientras en la semilla el número de píxeles de esta región se mantuvo constante. Para los frutos congelados la disminución del área de la pulpa fue mínima, mientras que el área correspondiente a la señal del hueso creció con el tiempo. Esto indicó que el proceso de cristalización del agua presente en el melocotón ocurrió desde la semilla, en el interior del hueso, hacia el exterior llegando a los tejidos del mesocarpio del fruto, contrariamente al proceso de congelamiento observado por Kerr *et al.* (1997) en kiwi, que se registro desde regiones externas hacia el corazón del fruto en su interior.

Tabla 5.25. Evolución del área (mm²) de las regiones estudiadas en los frutos de melocotón almacenados a bajas temperaturas.

T °C	Día	Pulpa		Hueso		Semilla	
		Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
1	0	2276	446	200	12	42	10
	2	2174	381	229	12	40	9
	5	2065	374	214	15	40	8
-10	0	2360	10	250	28	33	20
	2	2338	9	312	6	---	---
	5	2307	90	357	81	---	---

Solo se tiene conocimiento de un trabajo previo realizado con melocotones en este campo, por McCarthy *et al.* (1989) citado por Schrader *et al.* (1992), pero desafortunadamente se desconocen los detalles del mismo para su comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio.

A parte del estudio de Kerr *et al.* (1997) con kiwi, en la literatura se reportan los estudios de Duce *et al.* (1992) en calabacín, Gamble (1994) con arándanos, Hills y Remigereau (1997) con manzanas y Gambhir *et al.* (2005) con naranjas. Estos investigadores coinciden en que el congelamiento de la fruta produce en los tejidos una ruptura de las células, liberando su contenido durante proceso de descongelamiento, reduciendo la susceptibilidad magnética y ocasionando cambios en la morfología y en la distribución del agua, que permiten explicar, desde el nivel celular, las diferencias en las señales obtenidas en las diferentes imágenes RMI.

En la Tabla 5.26, se muestra finalmente la apariencia externa de todos los frutos utilizados en el presente ensayo, al inicio y al final del almacenamiento para las dos temperaturas empleadas. En los frutos *N* almacenados a 1°C no se presentaron cambios externos mientras que los frutos *C* almacenados a -10°C, como era de esperarse, mostraron síntomas externos del congelamiento tales como el endurecimiento y recubrimiento de la piel con una fina película de escarcha blanca al momento de realizarles la exploración.

Tabla 5.26. Imágenes de los melocotones al inicio y final del almacenamiento a bajas temperaturas.

Frutos a 1°C:	Inicio	Día 5
N ₁		
N ₂		
N ₃		

Frutos a -10°C:	Inicio	Día 5
C ₁		
C ₂		
C ₃		

5.3. Algoritmos desarrollados para la detección de daños

5.3.1. Detección en melocotones

Un total de 325 imágenes fueron adquiridas, clasificadas y procesadas para el estudio de detección de daños en melocotones. En la Tabla 5.27 se indican, según la secuencia de exploración y el plano de corte del fruto, el número de imágenes RMI obtenidas para el entrenamiento y para la evaluación de los algoritmos desarrollados para cada uno de los experimentos.

Tabla 5.27. Imágenes RMI de melocotones obtenidas, según experimento, para el desarrollo de los algoritmos de procesamiento digital.

Experimento	Imagen	Espín Eco en T ₁				Espín Eco en T ₂	
		Plano Ecuat.		Plano long.		Plano Ecuat.	
		ENT	DET	ENT	DET	ENT	DET
Hongo en campo	Con daño	8	24	3	7	3	11
	Sin daño	8	17	4	10	3	7
Frío en almacenamiento	Con daño	12	35	14	42	5	14
	Sin daño	6	17	8	14	3	5
Mosca de la fruta	Con daño	Plano no usado ¹		8	21	Secuencia no usada ²	
	Sin daño			4	12		

ENT: imágenes usadas para el entrenamiento

DET: imágenes usadas para la detección

5.3.1.1. Imágenes RMI con daño por hongo saprofito

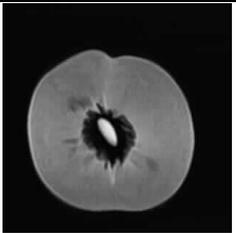
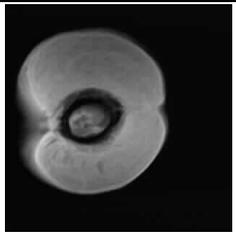
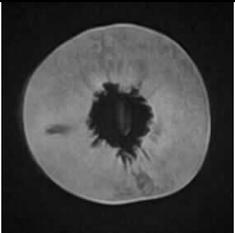
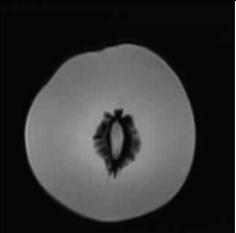
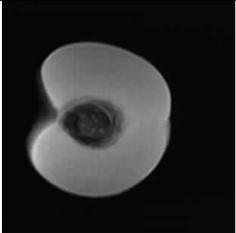
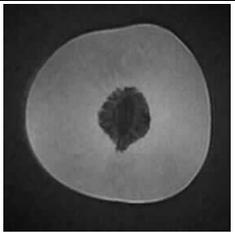
En la Tabla 5.28 se presentan, según contraste y plano de exploración, las imágenes RMI de frutos de melocotón Calanda de la variedad “Amarillo tardío” clon “Jesca”, con presencia interior de daño por hongo saprofito y sin daño (testigos), obtenidas con las secuencias espín eco evaluadas en este experimento.

En comparación con los testigos; las imágenes con daño exhibieron, para los dos contrastes y planos de exploración, regiones bien definidas de píxeles dentro del mesocarpio con menor intensidad de brillo. Estos píxeles correspondieron a los tejidos alterados por la podredumbre, muy probablemente provocada por *Alternaria sp.* Estos tejidos afectados presentaron tiempos de relajación menores a los tiempos de los tejidos sanos, permitiendo que la secuencia espín eco utilizada, con los parámetros escogidos, los pudiera distinguir dentro de la pulpa. El daño, como se ve en las imágenes y se pudo constatar al abrir posteriormente los frutos, se presentó en zonas del mesocarpio próximas al endocarpio del fruto.

¹ En este plano y contraste se obtuvo pocas imágenes con daño, por lo cual éstas fueron agrupadas para su análisis con las del plano longitudinal.

² Esta secuencia permitió poco contraste entre la pulpa y las regiones de daño por lo cual no se utilizaron las imágenes RMI obtenidas con la misma.

Tabla 5.28. Imágenes RMI contrastadas en T₁ y en T₂ de melocotones Calanda, variedad “Amarillo tardío”, con daño por hongo saprofito y sin daño.

Subgrupo	Espín Eco en T ₁		Espín Eco en T ₂
	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal	Plano Ecuatorial
Con daño			
Sin daño			

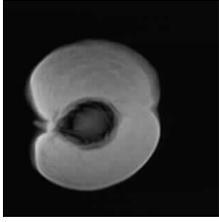
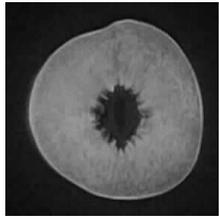
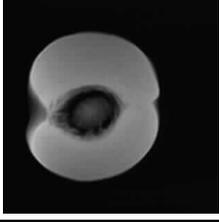
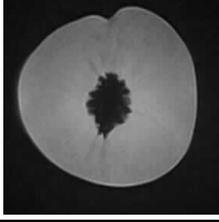
De los 182 frutos explorados con RMI, se observó el daño en 17 frutos (9,3%), los restantes 165 frutos no presentaron este tipo deterioro interno. El contraste en T₁ utilizando el plano ecuatorial permitió obtener mayor número de imágenes con el daño, seguido del contraste T₂-plano ecuatorial y del contraste en T₁-plano longitudinal.

5.3.1.2. Imágenes RMI con daño por frío

Las imágenes RMI de melocotones Calanda, variedad “Amarillo tardío” clon “Jesca”, obtenidas con daño por frío y sin daño, se muestran en la Tabla 5.29 según el contraste y plano de exploración de la secuencia espín eco aplicada.

Este daño se manifestó en las imágenes adquiridas como pequeñas manchas distribuidas en forma irregular sobre gran parte del mesocarpio del melocotón, mostrando en éste una textura diferente a la presentada en el mesocarpio de un fruto sano, la cual fue mucho más uniforme. Imágenes RMI de nectarinas afectadas por este tipo de daño, publicadas previamente por Sonego *et al.* (1995), también presentaban características similares y comunes a las observadas en este estudio.

Tabla 5.29. Imágenes RMI contrastadas en T₁ y en T₂ de melocotones Calanda, variedad “Amarillo tardío”, con daño por frío y sin daño.

Subgrupo	Espín Eco en T ₁		Espín Eco en T ₂
	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal	Plano Ecuatorial
Con daño			
Sin daño			

Las alteraciones de contraste en la pulpa, que se evidenciaron en las imágenes RMI de melocotones, pueden atribuirse como lo plantea Sonego *et al.* (1995), en nectarinas, a una reducción en la densidad protónica ocasionada por la presencia de espacios gaseosos en los tejidos afectados, que probablemente alteraron las señales emitidas por éstos en comparación a las señales más uniformes emitidas por tejidos del mesocarpio de frutos sin la presencia del daño.

Durante el experimento fueron explorados con RMI un total de 122 frutos, de los cuales 66 (54%) presentaron los síntomas de daño por frío, de estos, 20 frutos (16%) correspondieron al tratamiento control (1°C, 99 % HR) y 46 frutos (38%) fueron del tratamiento susceptible al daño (5°C, 99 % HR). Las imágenes RMI que más permitieron visualizar el deterioro interno fueron, en el siguiente orden, las reconstruidas en T₁ usando el plano longitudinal y ecuatorial, seguidas de las imágenes reconstruidas en T₂ en el plano ecuatorial.

Estructura del algoritmo

- **Segmentación de contornos.** En las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10 se presentan los esquemas de los algoritmos implementados, durante la fase de entrenamiento, para buscar el umbral de segmentación de los contornos de la pulpa y el daño en las imágenes reconstruidas en T_1 - plano ecuatorial, T_1 plano longitudinal y T_2 plano ecuatorial, respectivamente.

Para el subgrupo de imágenes en T_1 -plano ecuatorial (Figura 5.8), a la imagen RMI original del fruto se aplicó un filtro de media para reducir el ruido, en la imagen resultante I_1 se ejecutó un algoritmo de autoumbralización obteniendo una imagen binaria de la fruta I_2 , en la cual la pulpa es blanca y el hueso y el fondo son negros, estas dos imágenes fueron combinadas píxel a píxel mediante el operador lógico “AND”, y a la imagen resultante I_3 se le aplicó un filtro de Prewitt para la detección de los contornos. Finalmente, en la imagen resultante I_4 se buscó el mínimo umbral ($U_{\min i}$) para segmentar el contorno de la pulpa, el hueso y las manchas de daño. Para todas imágenes de entrenamiento con daño (N_d) del plano ecuatorial, contrastadas en T_1 , se determinó un umbral mínimo medio (\bar{U}_{\min}), definido como:

$$\bar{U}_{\min} = \sum_{i=1}^{N_d} \left[\frac{U_{\min i}}{N_d} \right] \quad (5.1)$$

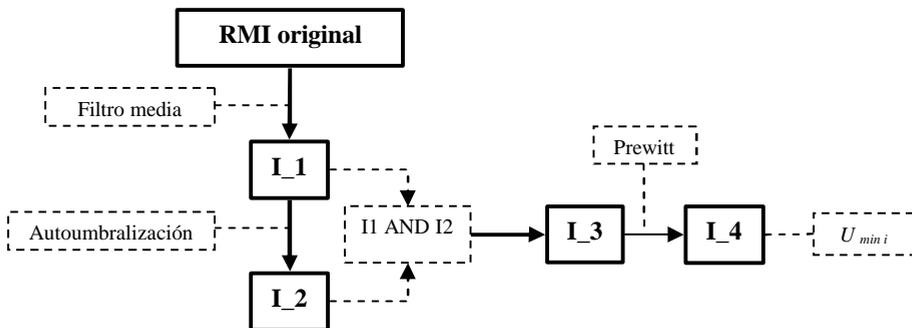


Figura 5.8. Esquema del algoritmo de búsqueda del contorno en imágenes con daño por hongo saprofito y por frío contrastadas en T_1 - plano ecuatorial.

Para el subgrupo de imágenes contrastadas en T₁-plano longitudinal, fue necesario buscar dos umbrales de segmentación de contorno; el primero (U₁) para segmentar solamente el contorno del fruto y del hueso, el cual se determinó, después de filtrar la imagen original con los filtros de media y de Prewitt, usando todas las N_T imágenes de entrenamiento, con daño y sin daño, mediante la siguiente expresión:

$$U_1 = \sum_{i=1}^{N_T} \left[\frac{U \max_i}{N_T} \right] \quad (5.2)$$

Y el segundo umbral (U₂), que se buscó empleando solo las N_d imágenes con daño, después de aplicar los filtros y las operaciones morfológicas mostradas en el diagrama de flujo de la Figura 5.9. Este umbral permitió segmentar el contorno de la pulpa y de las manchas de daño. La expresión utilizada para determinarlo fue:

$$U_2 = \sum_{i=1}^{N_d} \left[\frac{U \min_i}{N_d} \right] + \sqrt{\frac{(\bar{U} \min - U \min_i)^2}{N_d - 1}} \quad (5.3)$$

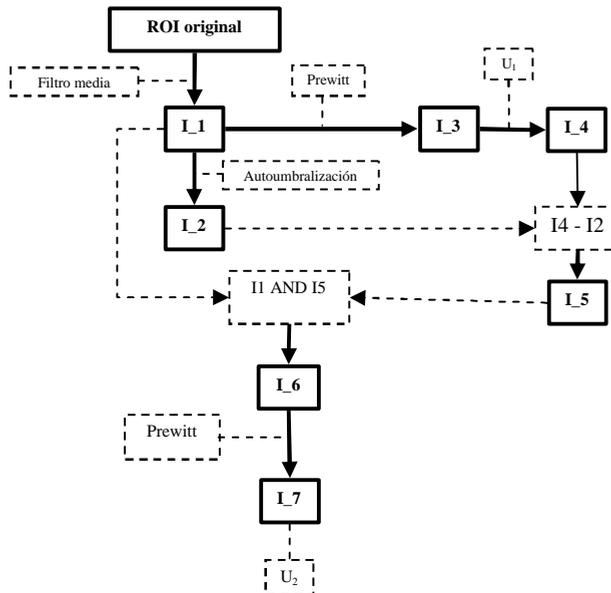


Figura 5.9. Esquema del algoritmo de búsqueda del contorno en imágenes con daño por hongo saprofito y por frío contrastadas en T₁- plano longitudinal.

Para el caso de las imágenes contrastadas en T₂-plano ecuatorial (Figura 5.10), el umbral de segmentación (U_2), fue calculado con la ecuación (5.3), empleando las imágenes de entrenamiento con daño. Este umbral permitió segmentar adecuadamente los contornos del fruto, del hueso y de las manchas en la pulpa, simultáneamente.

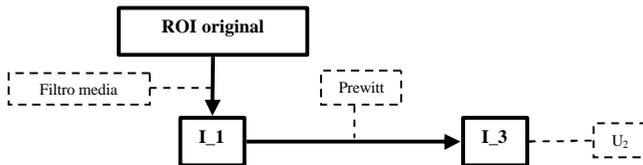


Figura 5.10. Esquema del algoritmo de búsqueda del contorno en imágenes con daño por hongo saprofito y por frío contrastadas en T₂ - plano ecuatorial.

En la Tabla 5.30 se indican los valores para los umbrales de segmentación de los contornos de la pulpa, el hueso y los daños, determinados según el contraste de la imagen y el plano de exploración utilizado. Estos valores se usaron para la fase de validación de los algoritmos y permitieron obtener, en cada caso, una imagen binaria de los contornos.

Tabla 5.30. Umbrales de segmentación de la pulpa, el hueso y el daño.

Contraste	Plano	Umbral	No. Ecuación	Valor , nivel de gris
T ₁	Ecuatorial	\bar{U} min	(5.1)	10
T ₁	Longitudinal	$U_1 ; U_2$	(5.2) ; (5.3)	73 ; 13
T ₂	Ecuatorial	U_2	(5.3)	19

- **Procesamiento de imagen.** Para el subgrupo de Imágenes contrastadas en T₁-plano ecuatorial, el algoritmo de procesamiento se esquematiza en la Figura 5.11 y las imágenes obtenidas en cada parte del proceso para los dos tipos de daño, por hongo saprofito y por frío, se muestran en la Figuras 5.12 y 5.13, respectivamente.

A continuación se explica paso a paso el algoritmo: Partiendo de la imagen RMI original se seleccionó una ROI rectangular, correspondiente al fruto, y se le aplicó un filtro de media para suavizar el ruido (I_1); a esta imagen se le aplicó el algoritmo de autoumbraización para separar el hueso y el fondo de la pulpa obteniendo la imagen binaria (I_2); esta imagen fue erosionada 5 veces para eliminar las capas externas de píxeles de la pulpa (I_3); luego se aplicó, punto por punto, el operador lógico “AND” entre las imágenes I_2 AND I_1, obteniendo la imagen del fruto sin el hueso I_4; a la imagen I_4 se aplicó un filtro Prewitt de detección de bordes y la imagen resultante fue segmentada usando el umbral \bar{U} min de 10, obteniendo los contornos de la pulpa, el hueso y el daño en la imagen I_5; luego se combinaron I_5 AND I_3 para eliminar el borde de la pulpa obteniendo I_6; a continuación se hizo la substracción píxel por píxel de las imágenes I_2 – I_6, obteniendo la imagen binaria I_7 de la pulpa con las manchas de daño, con el hueso y con ruido formado manchas muy pequeñas en la pulpa. Esta imagen fue procesada con un filtro de mediana, aplicado 7 veces, obteniendo finalmente la imagen binaria I_8 con las manchas de daño por hongo.

De forma análoga para las imágenes RMI contrastadas en T₁-plano longitudinal y para las contrastadas en T₂-plano ecuatorial, los algoritmos se esquematizan, respectivamente, en la Figuras 5.14 y 5.17, y las imágenes obtenidas, en cada parte de los algoritmos, para los dos tipos de daño se muestran en la Figuras 5.15 y 5.16 (contrastos en T₁-plano longitudinal) y en las Figuras 5.18 y 5.19 (contrastos en T₂-plano ecuatorial).

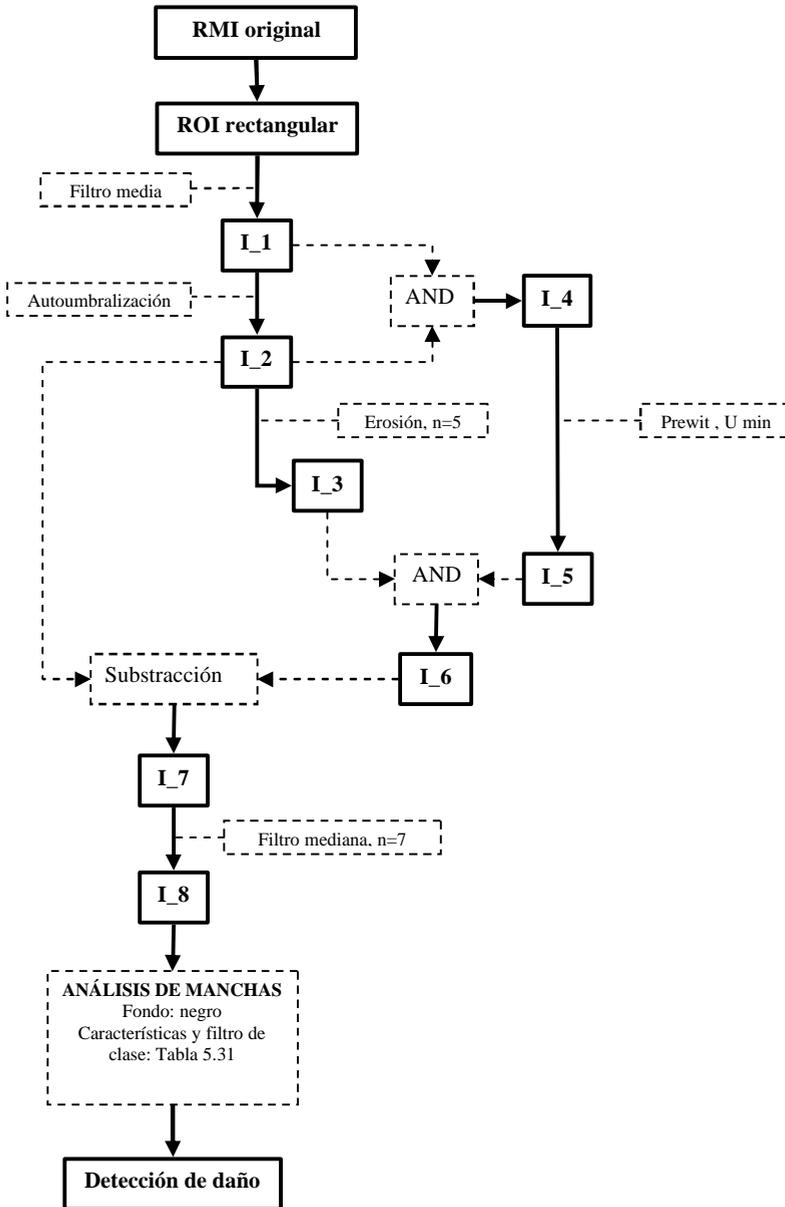


Figura 5.11. Esquema del algoritmo de procesamiento para la detección de daños por hongo saprofito y por frío en melocotón para imágenes en T₁- plano ecuatorial.

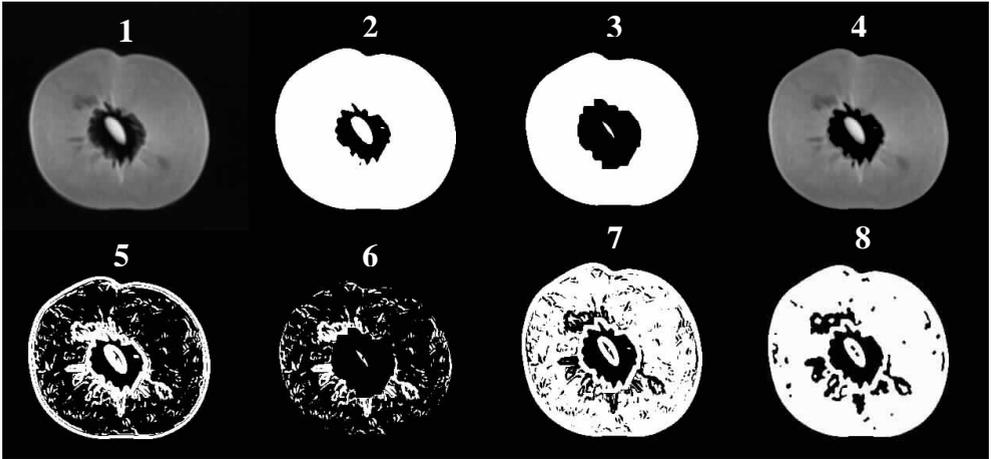


Figura 5.12. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 plano ecuatorial, con daño por hongo saprofito.

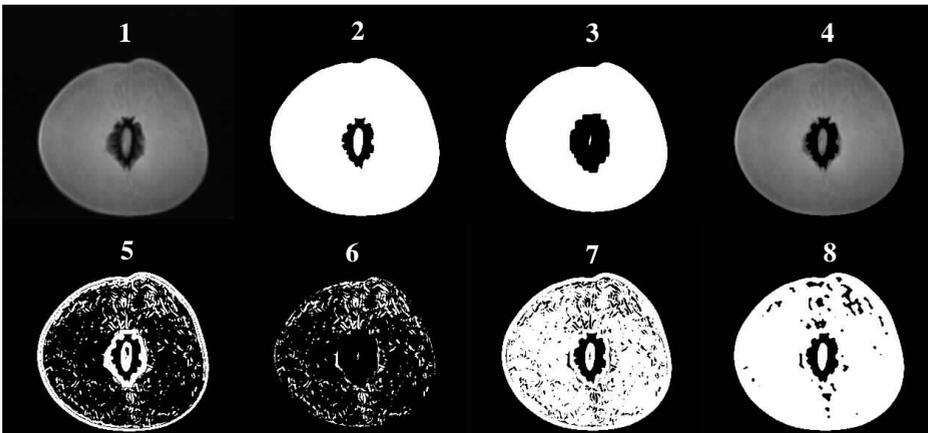


Figura 5.13. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 plano ecuatorial, con daño por frío.

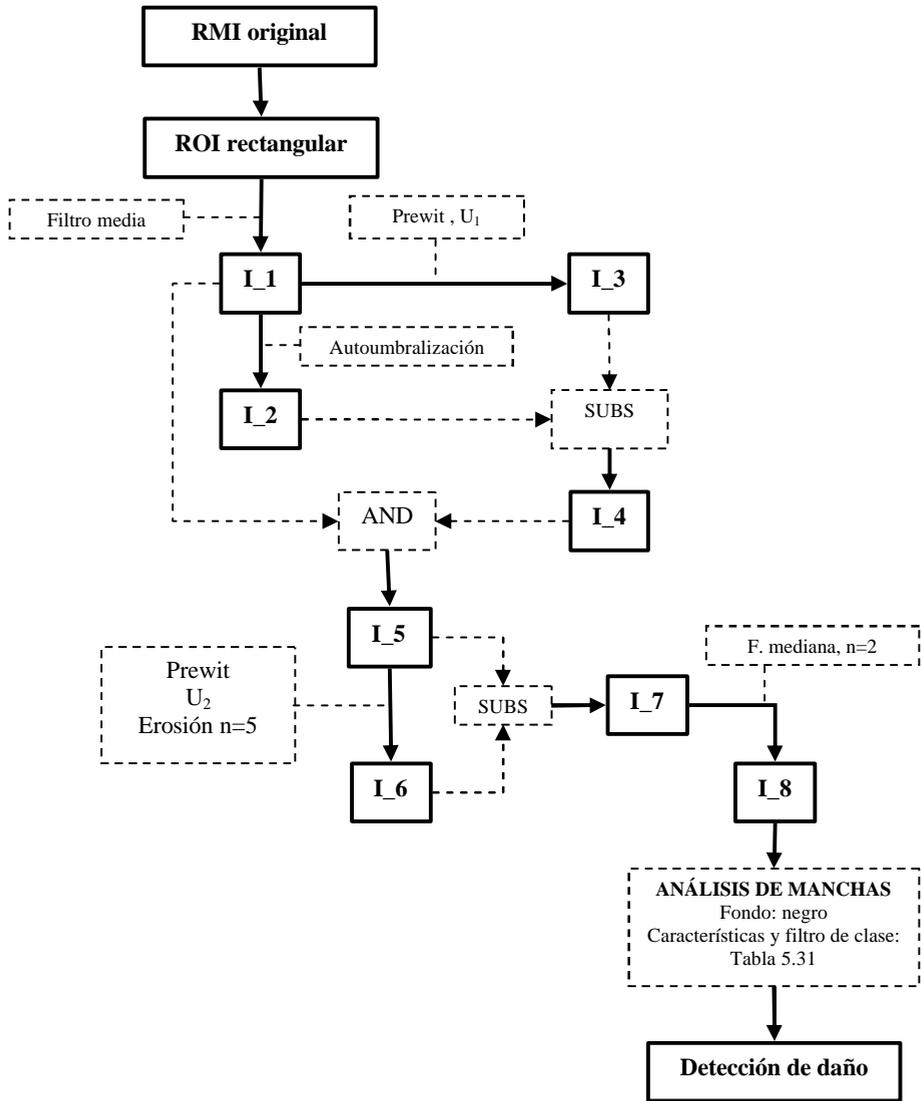


Figura 5.14. Esquema del algoritmo de procesamiento para la detección de daños por hongo saprofito y por frío en melocotón para imágenes en T_1 - plano longitudinal.

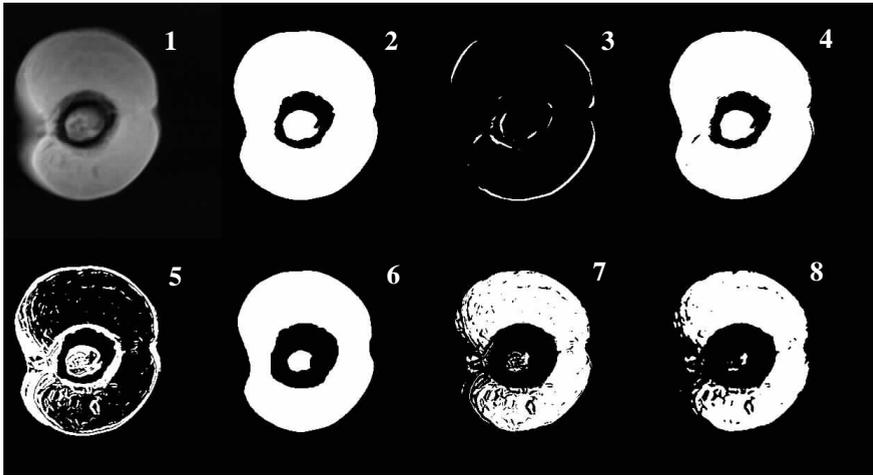


Figura 5.15. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 - plano longitudinal con daño por hongo saprofito.

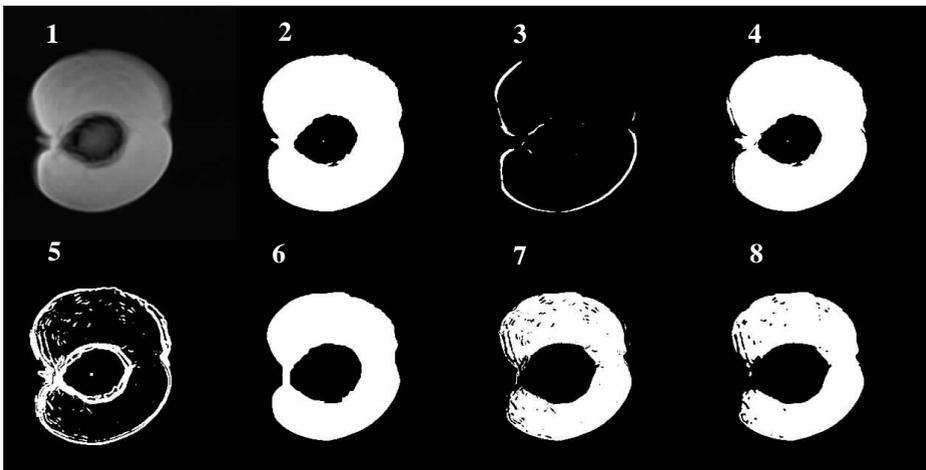


Figura 5.16. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T_1 - plano longitudinal, con daño por frío.

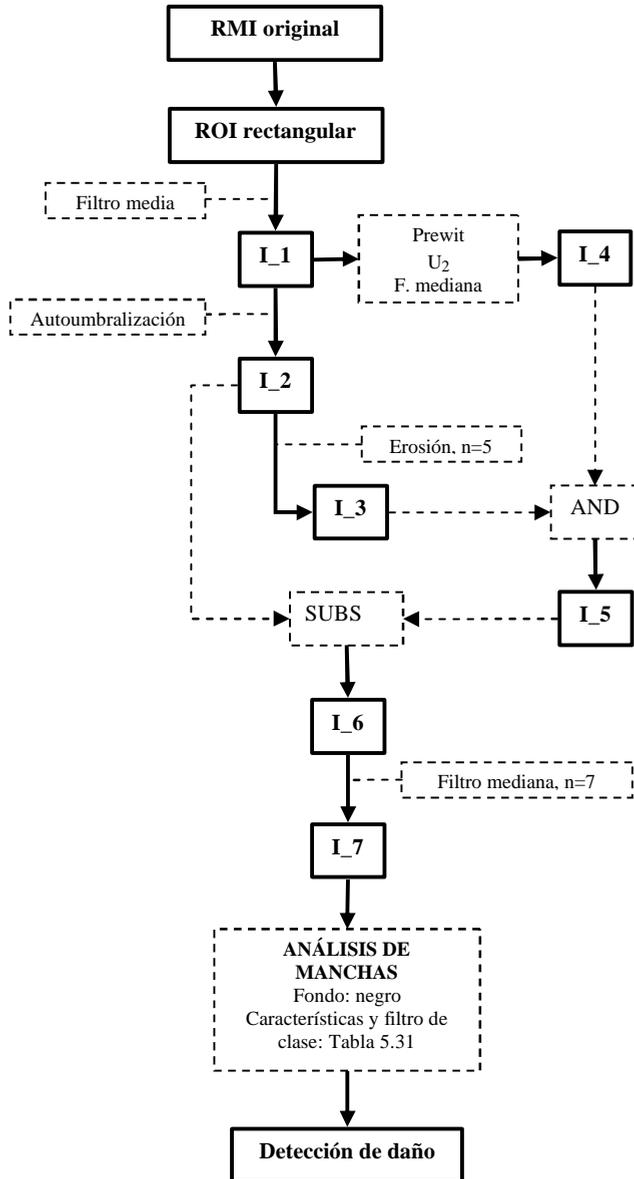


Figura 5.17. Diagrama de flujo del procesamiento de imágenes RMI en T₂- plano ecuatorial, de los experimentos de daño por hongo saprofito y por frío.

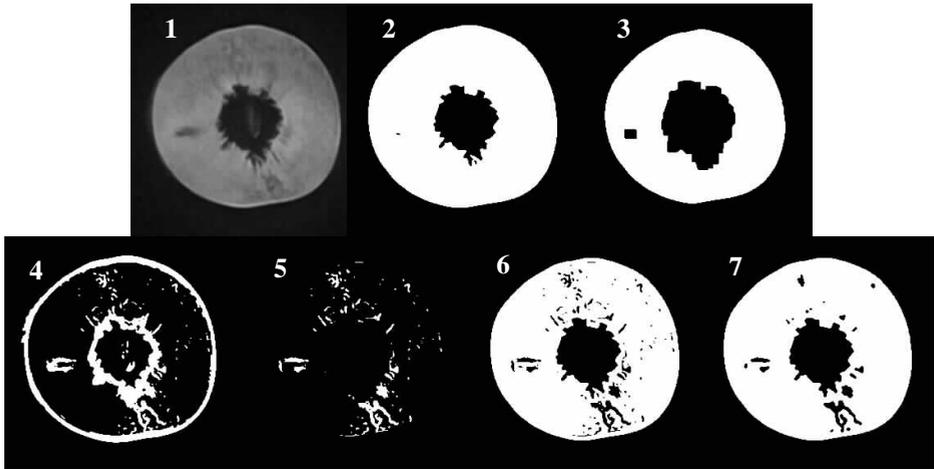


Figura 5.18. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T₂- plano ecuatorial, con daño por hongo saprofito.

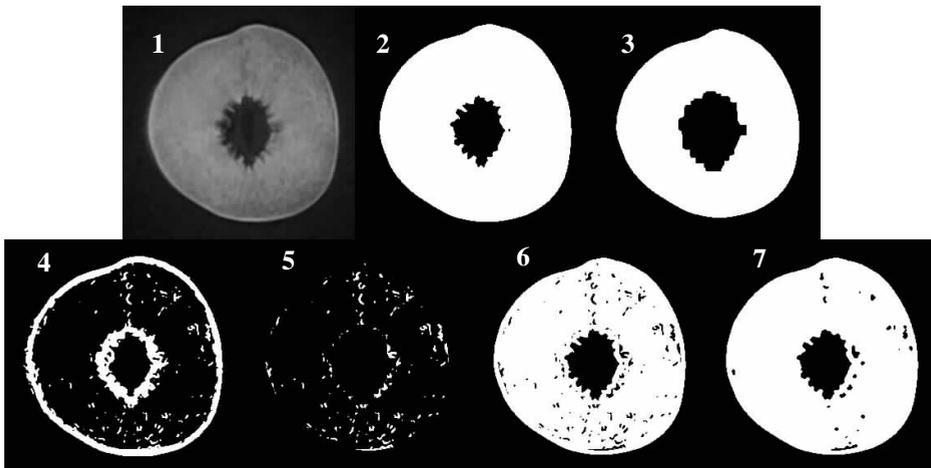


Figura 5.19. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T₂- plano ecuatorial, con daño por frío.

- **Análisis y clasificación de manchas.** Las características seleccionadas para el análisis de manchas de las imágenes binarias, y los diferentes intervalos de valores de clase utilizados como filtros para cada característica estudiada obtenidos durante el entrenamiento y aplicados para la validación del algoritmo, se indican en la Tabla 5.31.

Tabla 5.31. Características seleccionadas e intervalos de clase para eliminación de manchas en imágenes RMI para la detección de daños por hongo y por frío.

RMI con	Cte	Plano	A, mm ²	Xc, mm	Yc, mm	L, mm	P, mm	C
Daño por hongo	T ₁	Ecuat.	<1,27; >155	46,1<; <52,3	52,7<; <58,9			
		Long.	<1,00; >100	<20,7				
	T ₂	Ecuat.	<2,10; >200			>1,4		
Daño por frío	T ₁	Long.	<2,10; >145				<5,52	<1,41
		Ecuat.	<0,49; >100	<20,4				
	T ₂	Long.	<1,47; >254					>4

A: área, Xc, Yc; centroides; L: longitud, P: perímetro, C: compactación
Cte: contraste de la imagen

Las regiones de daño, por hongo saprofito y por frío, detectadas y etiquetadas, de manera automática, por los algoritmos de detección durante su fase de validación se presentan, para cada contraste y plano de exploración, en la Figura 5.20.

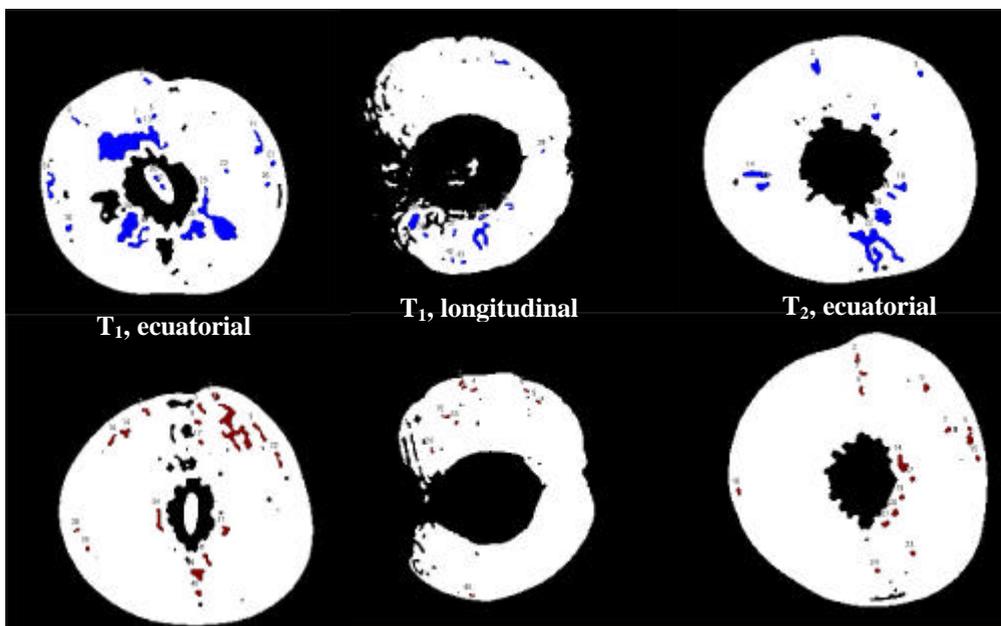


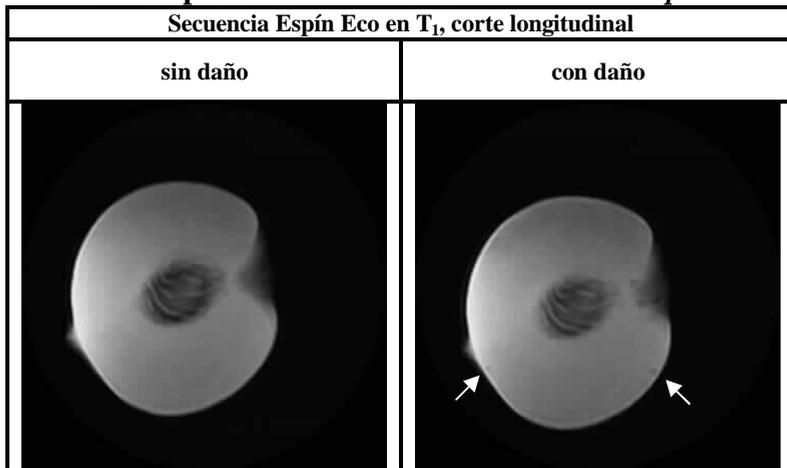
Figura 5.20. Detección del daño en melocotones afectados por hongo saprofito (color azul) y con deterioro por frío (color violeta).

5.3.1.3. Imágenes RMI con picadura de *Ceratitis capitata* Wied.

En la Tabla 5.32 se presentan dos imágenes RMI de un mismo fruto de melocotón, variedad Baby Gold, antes (sin daño) y 24 horas después de haber sido picado por la mosca de la fruta *Ceratitis capitata*. En la literatura consultada no se encontró ningún trabajo previo que haga referencia a la visualización y detección con RMI del daño interior que ocasiona esta plaga al melocotón. El daño se presentó, al igual que en el ensayo preliminar discutido anteriormente, como una pequeña región de píxeles más oscuros dentro del mesocarpio adyacente a la epidermis (zonas señaladas en la imagen derecha). Dos picaduras se pueden observar en la imagen derecha de la Tabla 5.32, por el ligero contraste que éstas presentan respecto a la pulpa del fruto. Sin embargo este contraste no fue igual en todas las picaduras de las imágenes adquiridas y varió dependiendo de su localización en el mesocarpio.

De los 15 frutos utilizados en el experimento 14 fueron picados por la mosca y fueron infestados más de una vez, dado el número elevado de hembras presentes en la cámara de infestación. Las picaduras fueron realizadas en diferentes sitios de la epidermis.

Tabla 5.32. Imágenes RMI de melocotón, variedad Baby Gold, sin daño y con daño por la mosca de la fruta *Ceratitis capitata*.



Alternativas para el procesamiento digital

- **Segmentación aplicando un umbral medio.** Se exploró la búsqueda de un umbral promedio, obtenido como la señal media de 16 regiones de daño obtenidas en diferentes imágenes de entrenamiento, marcadas con una ROI, usando la misma tolerancia de niveles de gris. El umbral obtenido fue de 103 niveles de gris. Este umbral funcionó bien en muy pocas imágenes, debido a la gran variabilidad que presentaba, dentro de un mismo fruto, la señal media emitida por los píxeles de diferentes picaduras. Además, determinadas regiones de la pulpa emitían una señal media bastante similar a la de las picaduras. Por tanto, al aplicar este umbral en la mayoría imágenes no se segmentaron todas las picaduras y en cambio si se segmentaron regiones pertenecientes a la pulpa y que no estaban afectadas por la mosca. Por lo anterior esta alternativa de análisis fue rápidamente descartada.

- **Análisis de perfiles a lo largo de línea trazada sobre la pulpa.** Se estudió el perfil de la intensidad de señal a lo largo de una línea que cubre píxeles del mesocarpio, sin y con picadura, de imágenes previamente suavizadas con el filtro de media (Figura 5.21).

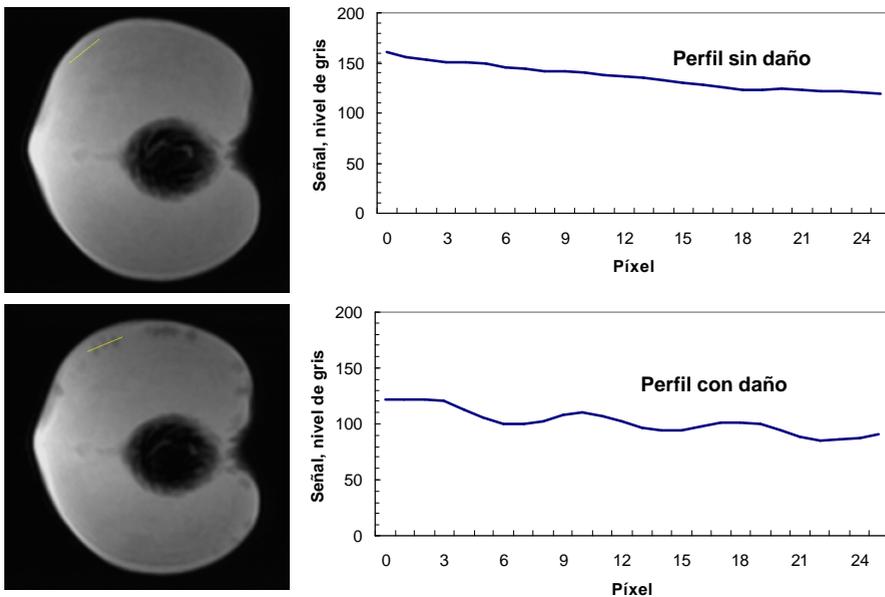


Figura 5.21. Líneas de perfil de la señal del mesocarpio sin daño y con daño por picadura de *C. capitata*.

Se puede observar, por ejemplo, que el perfil a lo largo de la línea amarilla, trazada en la parte superior izquierda de la pulpa en el mismo fruto, antes y después de haber sido picado por la mosca, presenta diferencias. Las diferencias radican en la presencia de valles en el perfil, que corresponden a los píxeles de las picaduras sobre la línea trazada en la imagen del fruto con daño, mientras que la imagen del fruto sin picadura presenta un perfil menos ondulado y sin estos valles.

Desafortunadamente, con el programa utilizado aquí no se pudieron generar perfiles de líneas curvas, más interesantes de aplicar en este caso para la detección de las picaduras, dado que éstas se presentaron en el mesocarpio siguiendo la curvatura de la epidermis del fruto. Además, la herramienta de análisis de líneas de perfil presentó dificultades de automatización. Por estas circunstancias no se avanzó en la exploración de esta alternativa, dejándose de lado, pero que podría considerarse en futuros trabajos.

- **Análisis mediante la aplicación de modelos.** Varios modelos fueron creados a partir de regiones de daño escogidas en imágenes de frutos picados. En la Figura 5.22-a se muestra uno de los modelos evaluados, en el que la región de picadura (píxeles grises dentro de la máscara roja) usada como modelo ha sido ampliada 16 veces para facilitarle al lector su visualización.

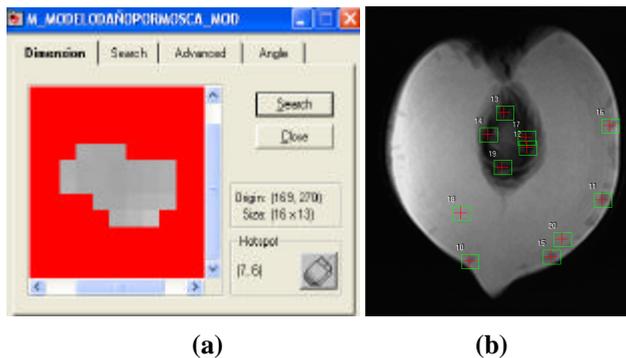


Figura 5.22. Modelo para la detección de picaduras de *C. capitata*.

Este modelo y otros desarrollados, fueron aplicados a las imágenes con daño y sin daño, obteniendo en cada imagen los puntos (marcados por una cruz roja dentro del recuadro verde) de detección del modelo (Figura 5.22-b). Sus coordenadas y el porcentaje de similitud que la región detectada presenta con el modelo evaluado también se analizaron.

Ninguno de los modelos creados permitió detectar la mayoría de las picaduras, además se detectaban falsas regiones de picadura en el mesocarpio, en el hueso e incluso en el fondo de la imagen. La principal razón a las falsas detecciones efectuadas por estos modelos, fue que las regiones de picaduras diferían en el tamaño y en la distribución de los niveles de gris de sus píxeles, facilitando de este modo la confusión al modelo aplicado. Por lo anterior esta alternativa de análisis también se descartó.

- **Detección mediante búsqueda de bordes.** Debido a la gran variabilidad presentada, dentro de una misma imagen y de una imagen a otra, en la señal media de los píxeles de las picaduras, se decidió entonces explorar la detección mediante la búsqueda de los contornos de estas regiones de daño, aprovechando el ligero contraste observado con relación a la región de mesocarpio. Para la obtención del contorno del mesocarpio afectado por picaduras de mosca se realizó el procesamiento mostrado en el diagrama de flujo de la Figura 5.23.

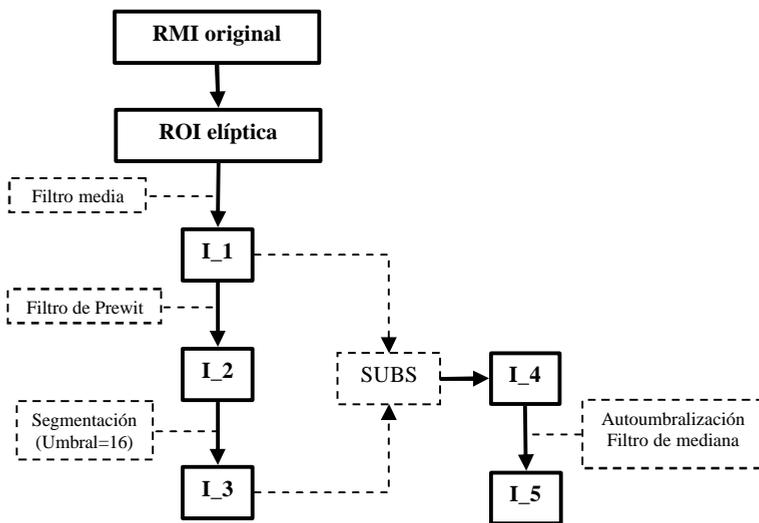


Figura 5.23. Procesamiento para la obtención del contorno del mesocarpio del melocotón.

A partir de la imagen RMI original se seleccionó una ROI elíptica del fruto que fue suavizada mediante la aplicación de un filtro de media, a la imagen I_1 obtenida se le aplicó un filtro de Prewitt para la detección de bordes (I_2), y se aplicó un umbral de 16 niveles de gris para segmentar los

contornos de la pulpa y las picaduras (I_3). Se realizó luego la resta de las imágenes I_1 – I_3 para obtener la imagen del fruto con los bordes resaltados (I_4), esta imagen finalmente se convirtió a una imagen binaria (I_5) mediante la aplicación del algoritmo de autoumbraización, seguido de la aplicación de un filtro de media, para la eliminación de manchas muy pequeñas de ruido. Las imágenes obtenidas en cada fase del procesamiento se presentan en la Figura 5.24.

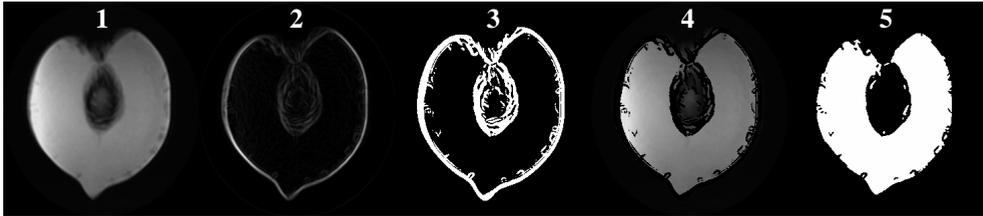


Figura 5.24. Procesamiento digital de imagen RMI, para la obtención del contorno del mesocarpio con picadura por *C. capiata*.

Tanto las imágenes I_3 como I_5 fueron utilizadas en el análisis de manchas, empleando características como el área y el perímetro del contorno del mesocarpio, para compararlas con los valores de los frutos sanos, sin picadura, pero desafortunadamente no se obtuvo distinción alguna debido a la variación del tamaño de la pulpa de las imágenes de los frutos estudiados. La característica del número de huecos tampoco fue efectiva como filtro de clase, debido a que durante el procesamiento, las imágenes sin daño resultaban con algunas manchas de píxeles negros en la pulpa (ruido) que se confundieron con picaduras. Una variación del anterior procesamiento realizada para obtener una imagen del contorno del mesocarpio, sin la epidermis, se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 5.25.

En este caso se aplicó nuevamente el filtro de Prewitt a la imagen I_5 para obtener el contorno exterior del mesocarpio I_6 y mediante la substracción, píxel a píxel, del la imagen binaria I_7 (imagen autosegmentada de I_1), se obtuvo el contorno del mesocarpio sin la epidermis I_8, Figura 5.26.

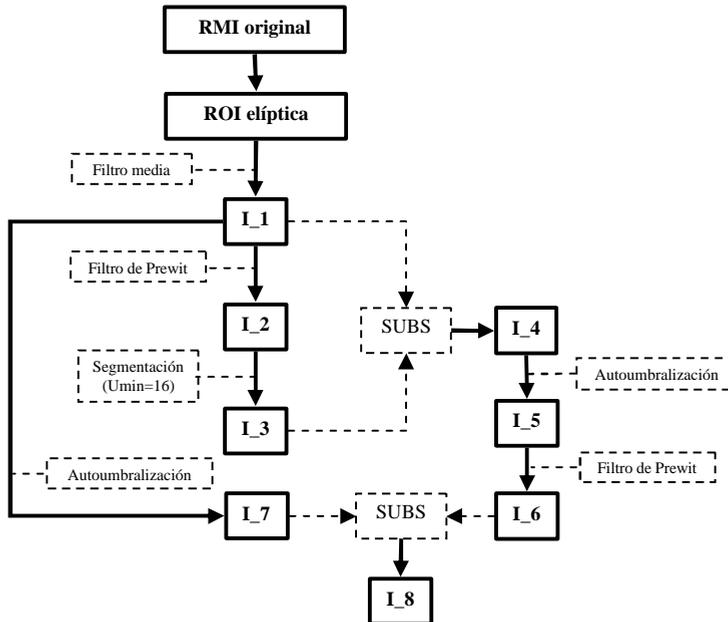


Figura 5.25. Procesamiento para la obtención del contorno del mesocarpio del melocotón sin la epidermis.

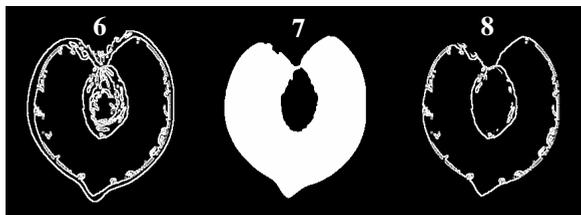


Figura 5.26. Procesamiento para la obtención del contorno del mesocarpio con picadura de *C. capitata* sin la epidermis.

Esta nueva alternativa permitió obtener una imagen final, I_8, en la que las picaduras resaltan en el contorno del mesocarpio, sin embargo el análisis de manchas también presentó dificultades para detectar estos “resaltos” al estar todos los píxeles encadenados con el contorno.

No obstante, el tratamiento de las imágenes mediante aplicación del algoritmo de autoumbraalización y de la búsqueda de bordes con operaciones aritméticas y morfológicas, que a continuación se explicará, resultó ser la alternativa más viable de usar, en esta tesis, para la detección de la picadura de la mosca en el melocotón.

Algoritmo de detección

El algoritmo desarrollado presenta la estructura general indicada en la Figura 4.18, con las diferencias que a continuación se explican.

- **Segmentación de contornos.** Se utilizó un algoritmo similar al esquematizado en la Figura 5.10. Sin embargo, en la imagen obtenida, previo procesamiento, se buscaron dos valores de umbral: un umbral mínimo, U_{\min_i} , para segmentar el contorno de la pulpa, el hueso y el daño, y un umbral máximo, U_{\max_i} , para segmentar solo el contorno de la pulpa. Con estos dos valores se obtuvo un umbral promedio, $U_{\text{medio}} = 21$, para todas las N_T imágenes de entrenamiento, calculado como:

$$U_{\text{medio}} = \sum_{i=1}^{N_T} \left[\frac{(U_{\min_i} + U_{\max_i})}{2N_T} \right] \quad (5.4)$$

Éste umbral permitió segmentar en la imagen el contorno de la pulpa con las picaduras.

- **Procesamiento de imagen.** En la Figura 5.27 se presenta el algoritmo de procesamiento desarrollado y en la Figura 5.28 se muestran las imágenes obtenidas durante cada paso del proceso, el cual se describe a continuación. A la imagen RMI original se aplicó un filtro de media, obteniendo I_1. La autoumbralesización de ésta imagen permitió obtener la imagen binaria I_2 de la pulpa, esta se erosionó en cinco ocasiones para obtener I_8. De otro lado a la imagen binaria del contorno del fruto I_3 se combinó, usando el operador AND con I_1 para obtener I_4 (imagen en escala de grises de los contornos). I_4 fue autosegmentada para obtener la imagen binaria I_5. Esta imagen se resto con I_2 para obtener otra imagen binaria de la pulpa I_6 con las entradas de las picaduras. A ésta imagen se le aplicó un filtro de media para quitar ruido y fue dilatada tres veces para obtener I_7. Ésta imagen se resto a I_8 para obtener los puntos periféricos de picaduras de la pulpa en la imagen I_9. Finalmente, esta última imagen se resto de la imagen suavizada I_1 para obtener la imagen en escala de grises del fruto con las manchas de picaduras sobre la pulpa, I_10.

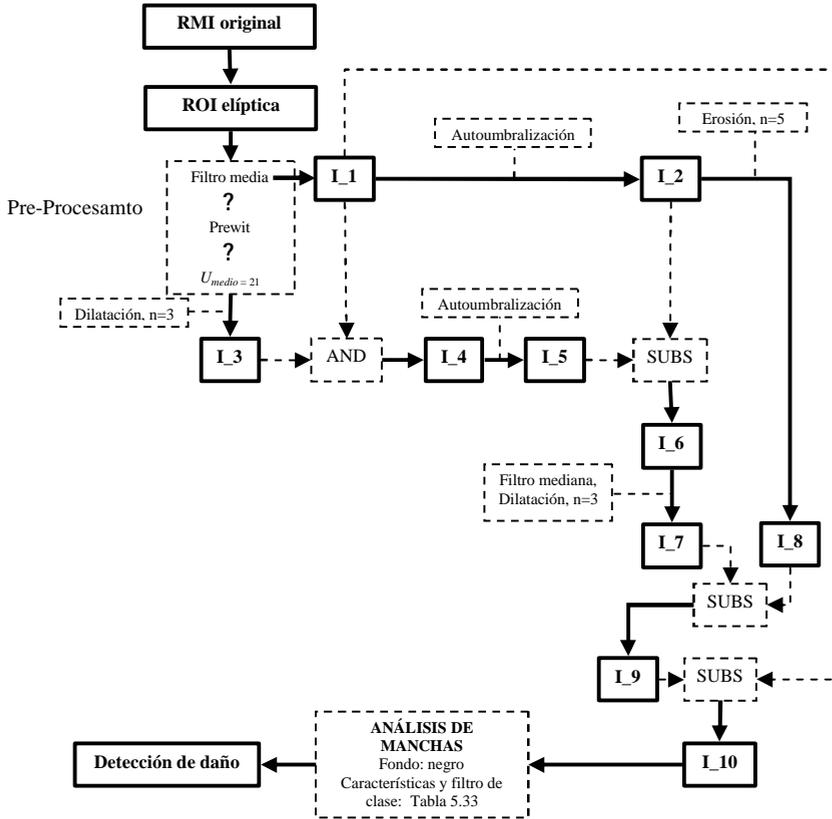


Figura 5.27. Diagrama de flujo del procesamiento de las imágenes RMI del experimento de daño por *Ceratitis capitata*.

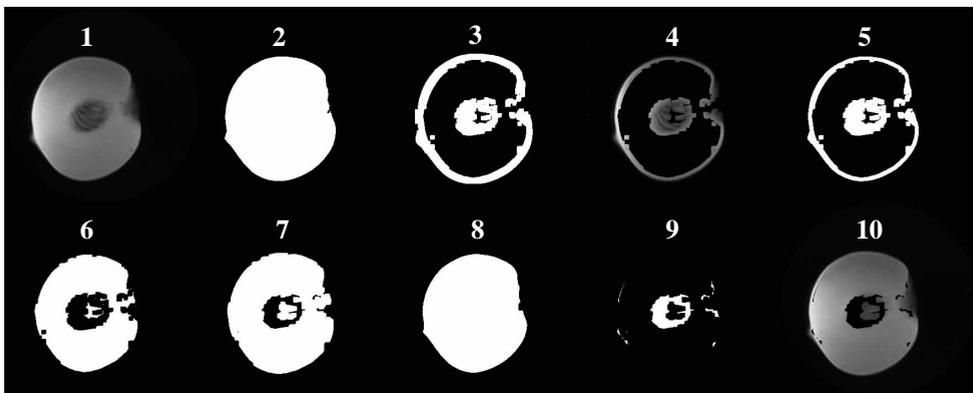


Figura 5.28. Procesamiento digital de imagen RMI, contrastada en T₁ plano longitudinal, con daño por *Ceratitis capitata*.

- **Análisis y clasificación de manchas.** Sobre la imagen resultante en escala de grises, se realizó el análisis de manchas. En ésta parte del algoritmo, se eliminaron aquellas manchas con área menor a $0,1 \text{ mm}^2$, consideradas ruido en la imagen y no picaduras de mosca. Las características seleccionadas durante la fase de entrenamiento para el análisis de manchas de la imagen I_10, y los diferentes intervalos de valores de clase utilizados como filtros para cada característica en la fase de validación del algoritmo, se indican en la Tabla 5.33.

Tabla 5.33. Características seleccionadas en el análisis de manchas e intervalos de clase en las imágenes RMI con daño por *Ceratitits capitata*.

Característica seleccionada	Intervalo de clase
Área, mm	< 0,97 ; > 9,0
Compactación, adimensional	< 1,3 ; > 4,8
Diámetro medio, mm	> 1,2 ; > 5,3
Longitud, mm	< 0,3 ; > 7,9
Xc, mm	> 44 ; < 56
Yc, mm	> 46 ; < 58

En la Figura 5.29 se muestran las imágenes detectadas, sin daño y con daño por picadura de mosca (regiones marcadas en verde), en el mismo fruto de melocotón (antes y después de haber sido picado), obtenidas con el algoritmo de detección desarrollado.

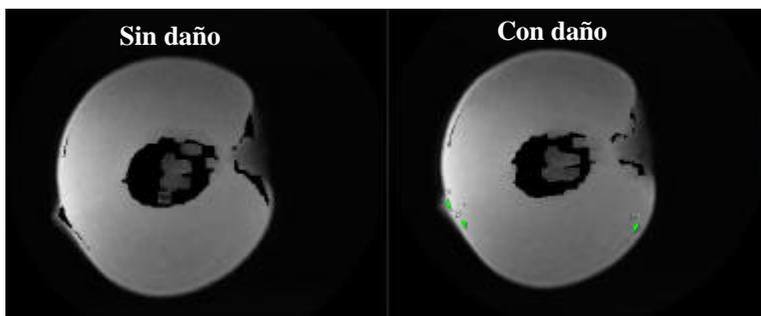


Figura 5.29. Detección del daño por picadura de *C. capitata* en melocotón.

5.3.2. Detección en cítricos

Un total de 1229 imágenes RMI fueron adquiridas, clasificadas y procesadas para el estudio de detección de daños en cítricos. En la Tabla 5.34 se indica el número de imágenes RMI obtenidas para el entrenamiento y para la evaluación de los algoritmos desarrollados para cada uno de los experimentos, según la secuencia de exploración y el plano de corte del fruto.

5.3.2.1. Imágenes RMI con daño por hongos

El porcentaje de frutos que desarrollaron daño interior fue bastante alto; 100% para los frutos inoculados con *D. natalensis*, 90% para *A. citri* y 95% para *B. cinerea*. Estos elevados porcentajes indican la gran efectividad del método de inoculación utilizado para la preparación de las muestras. Además de lo anterior, la manifestación externa de los síntomas fue tardía, ocurriendo a partir del 4 y del 5 día en los frutos con *D. natalensis* y con *B. cinerea*, respectivamente, y prácticamente sin evidencia alguna durante 11 días de seguimiento en los frutos inoculados con *A. citri*.

En las Tablas 5.35, 5.36 y 5.37 se presentan imágenes RMI típicas que fueron obtenidas sin presencia de daño y con daño interno producido por los hongos *A. citri*, *B. cinerea* y *D. natalensis*, respectivamente, en los diferentes frutos explorados.

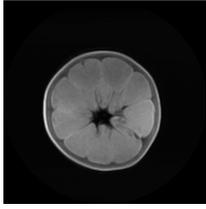
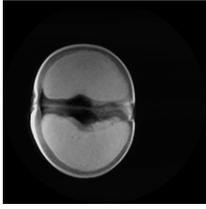
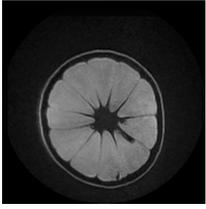
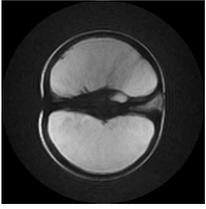
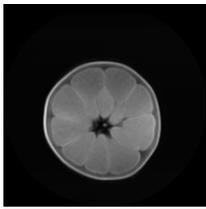
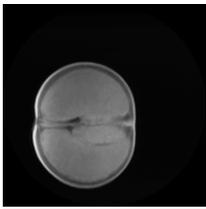
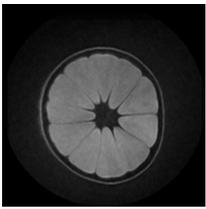
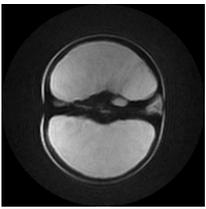
Tabla 5.34. Número de imágenes RMI de cítricos, con daño y sin daño, obtenidas según experimento y utilizadas para el desarrollo y evaluación de los algoritmos de procesamiento digital.

Experimento	Imagen	Espín Eco en T ₁				Espín Eco en T ₂				Gradiente Eco en T ₁			
		Plano Ecuat.		Plano Long.		Plano Ecuat.		Plano Long.		Plano Ecuat.		Plano Long.	
		ENT	DET	ENT	DET	ENT	DET	ENT	DET	ENT	DET	ENT	DET
Preliminar	Con Daño	No analizado		7	20	5	14	5	21	Secuencia no usada			
	Sin Daño	No analizado		7	20	5	14	5	21				
Alternaria	Con Daño	15	44	20	59	12	38	18	53				
	Sin Daño	7	22	7	22	7	15	8	22				
Botrytis	Con Daño	5	16	3	7	4	13	8	24				
	Sin Daño	7	17	4	12	4	13	6	18				
Heladas	Daño Categoría I	25	78	26	79	11	34	25	77	Secuencia no usada			
	Daño Categoría II	5	15	5	15	Secuencia no usada				5	15	5	15
	Sin Daño	5	15	5	15	5	15	5	15	5	15	5	15

ENT: imágenes usadas para el entrenamiento del algoritmo

DET: imágenes usadas para la validación del algoritmo

Tabla 5.35. Imágenes RMI contrastadas en T₁ y en T₂ de cítricos, sin y con daño por *Alternaria alternata* pv *citri*.

Subgrupo	Espín Eco en T ₁		Espín Eco en T ₂	
	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal
Con daño				
Sin daño				

Los daños inducidos en los frutos por los hongos inoculados se presentaron, en las imágenes RMI, como regiones de píxeles más oscuras que las regiones de estructuras como la pulpa, la columela y el albedo. En las imágenes reconstruidas en el plano ecuatorial, el daño se localizó en la zona de la columela y se extendió radialmente por los tabiques de los gajos. En el plano longitudinal, el daño se observó generalmente en parte de la columela y el albedo más próximo al eje estilar del fruto. Estos síntomas fueron algo similares a los reportados por Galed *et al.* (2004) en imágenes RMI contrastadas en T₂ de mandarinas Fortuna y naranjas Valencia, afectadas internamente por *P. digitatum*. En el estudio citado, se observaron, sobre el mesocarpio, áreas oscuras (deshidratadas) correspondientes al hongo, mientras que en el meristemo floral (columela), contrario a lo observado en el actual estudio, se visualizó una zona brillante correspondiente a la acumulación de agua móvil. Las diferencias presentadas en las imágenes contrastadas en T₂ de estos dos trabajos pudieron deberse al discrepante mecanismo de infección y colonización de cada hongo (Tuset, 1988), y quizás también al diferente estado de maduración que presentaban los frutos usados en cada estudio.

Manchas oscuras entre los tejidos de la pulpa fueron observadas en los frutos inoculados con *D. natalensis* en una fase avanzada de desarrollo de este hongo y coincidieron con el síntoma reportado por Galed *et al.* (2004) en un estado avanzado de colonización de *P. digitatum* en mandarina.

En general en la presente investigación, las imágenes ponderadas en T₂ ofrecieron mayor contraste de señal, entre las regiones de daño y los tejidos sanos adyacentes, que las imágenes contrastadas en T₁. Sin embargo las imágenes reconstruidas en T₁-plano longitudinal permitieron ver mejor el daño, como una mancha oscura, localizada en la zona del albedo próxima al pedúnculo.

La mayor cantidad de imágenes RMI con daño se presentó con los frutos inoculados con *A. citri*. Esto fue debido a que el tiempo de desarrollo de este hongo, comparado con los otros dos, fue bastante grande, lo cual permitió realizar un mayor número de exploraciones antes que los síntomas de la podredumbre se hicieran evidentes externamente.

Tabla 5.36. Imágenes RMI contrastadas en T₁ y en T₂ de cítricos, sin y con daño por *Botrytis cinerea*.

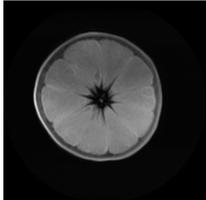
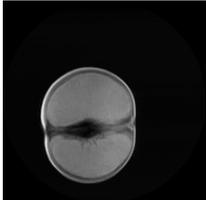
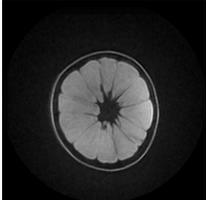
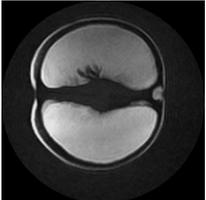
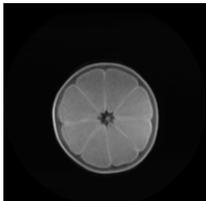
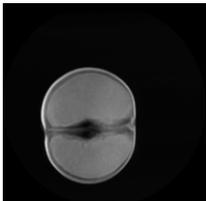
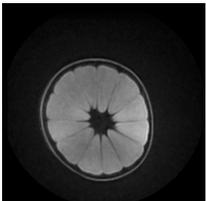
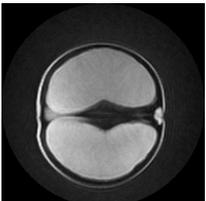
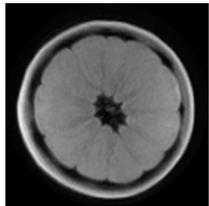
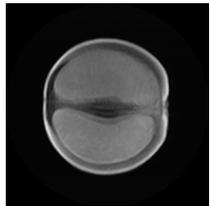
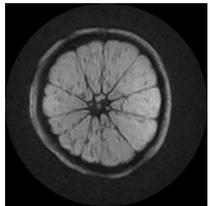
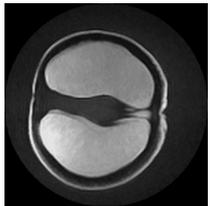
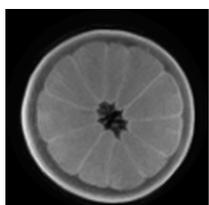
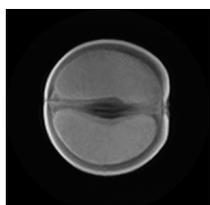
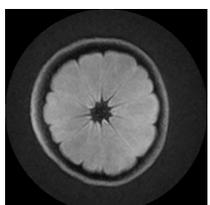
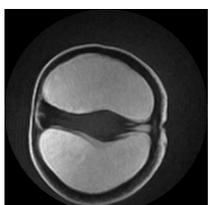
Subgrupo	Espín Eco en T ₁		Espín Eco en T ₂	
	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal
Con daño				
Sin daño				

Tabla 5.37. Imágenes RMI contrastadas en T₁ y en T₂ de cítricos, sin y con daño por *Diplodia natalensis*.

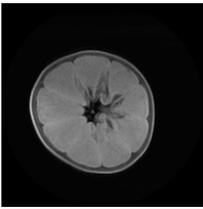
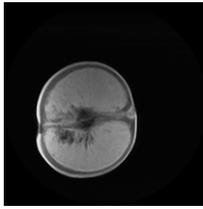
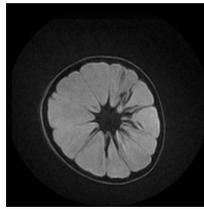
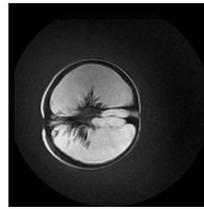
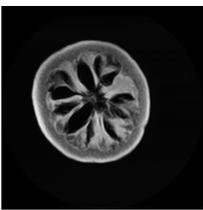
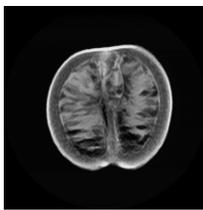
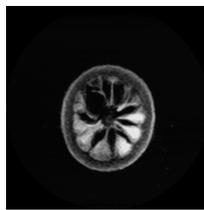
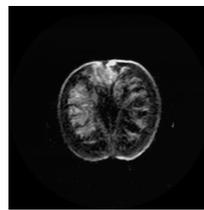
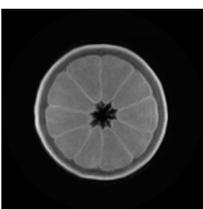
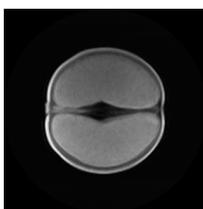
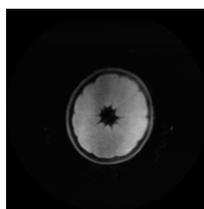
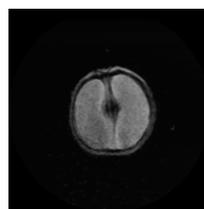
Subgrupo	Espín Eco en T ₁		Espín Eco en T ₂	
	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal
Con daño				
Sin daño				

Las imágenes RMI de cítricos mostrando los daños internos provocados por *D. natalensis*, *A. citri* y *B. cinerea*, obtenidas en esta tesis, para nuestro conocimiento son las primeras que se publican para este tipo de frutos. Trabajos similares se habían realizado con *B. cinerea* en frambuesa roja, grosella negra, uva y fresa (Goodman *et al.*, 1992; Goodman *et al.*, 1996; Clark *et al.* 1997; y Glidewel *et al.*, 1997) pero no con naranjas.

5.3.2.2. Imágenes RMI con daño por heladas

En la Tabla 5.38 se muestran las típicas imágenes RMI de cítricos con dos categorías de daño por heladas en campo e imágenes de frutos sin daño utilizados como control. El daño, categoría I, se observó en las imágenes como regiones bien definidas de píxeles más oscuros localizadas dentro de uno o varios gajos. El daño, categoría II, se presentó, como regiones más grandes de píxeles oscuros presentes prácticamente en todos los gajos de la fruta. Estas regiones oscuras correspondieron en el daño leve a los gajos secos y deshidratados, mientras en el daño severo correspondieron a oquedades dentro del mesocarpio de la fruta. Los frutos de control, sin daño, no presentaron ninguna de los síntomas anteriores y por el contrario el nivel de gris de los píxeles correspondientes al mesocarpio, se presentó bastante uniforme.

Tabla 5.38. Imágenes RMI contrastadas en T₁ y en T₂ de cítricos, sin y con daño, producido por heladas en campo.

Daño	Espín Eco en T ₁		Espín Eco en T ₂ (GE en T ₁)*	
	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal	Plano Ecuatorial	Plano longitudinal
Cat I				
Cat II				
Sin daño				

* En las imágenes con daño por heladas, categoría II, se usó la secuencia T₁ (GE) en lugar de T₂ (SE)

Este tipo de daño en cítricos había sido revelado por primera vez con RMI por Chen *et al.* (1989), quien utilizando una secuencia eco espín en T₁, mostró las regiones secas y el grado de sequedad en una naranja Washington Navel. Posteriormente, Hernández *et al.* (2003) fueron los primeros en adquirir y procesar imágenes dinámicas de naranjas afectadas con esta clase de deterioro. Tanto en esos trabajos como en el presente, los tejidos afectados se visualizan como regiones oscuras, de baja intensidad de señal, debido a la carencia de agua en estas regiones del fruto. Los tejidos sanos de la pulpa, en cambio, presentan píxeles con una intensidad de brillo mayor. De acuerdo con el trabajo publicado recientemente por Gambhir *et al.* (2005), estas diferencias en las señales emitidas por los tejidos afectados y sanos, se explican por la reducción significativa (>10%) en el tiempo de relajación T₂ que padecen los tejidos de la pulpa, cuando son congelados.

Estructura del algoritmo

El esquema del algoritmo desarrollado se muestra Figura 5.30. Cómo en la detección de daños en las imágenes de melocotón, éste algoritmo se empleó en dos fases, una de entrenamiento (resaltada en rojo) y otra de validación (en azul). En cada una se usaron imágenes independientes.

- **Segmentación de contornos.** En la Tabla 5.39 se indica la ecuación o método para determinar cada umbral y los valores respectivos obtenidos para los subgrupos de imágenes y el tipo de daño estudiado (experimento). El valor de umbral determinado para los frutos afectados por hongos, varió entre 66 y 100 niveles de gris dependiendo del tipo de patógeno, del contraste de la imagen y del plano explorado.

Tabla 5.39. Umbrales de segmentación de regiones en cítricos.

Experimento	Contraste	Plano	Región	Ecuación/método*	Umbral, ng**
Preliminar (3 hongos)	T ₁	Longitudinal	Daño	Sm	66
	T ₂	Ecuatorial	Columela-daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral
	T ₂	Longitudinal	Daño	Sm	92
<i>A. citri</i>	T ₁	Ecuatorial	Daño	Sm	100
	T ₁	Longitudinal	Daño	Sm-DE	86
	T ₂	Ecuatorial	Columela-daño	Sm+DE	91
	T ₂	Longitudinal	Columela-daño	Sm-DE	93
<i>B. cinerea</i>	T ₁	Ecuatorial	Columela	Sm-DE	91
	T ₁	Longitudinal	Columela-daño	Sm-DE	74
	T ₂	Ecuatorial	Columela-daño	Sm	80
	T ₂	Longitudinal	Columela-daño	Sm-DE	86
Helada categoría I	T ₁	Ecuatorial	Daño	Sm-DE	87
	T ₁	Longitudinal	Daño	Sm	87
	T ₂	Ecuatorial	Pulpa-daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral
Helada categoría II	T ₂	Longitudinal	Pulpa-daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral
	T ₁	Ecuatorial	Daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral
	T ₁	Longitudinal	Daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral
	T ₁ (GE)	Ecuatorial	Daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral
	T ₁ (GE)	Longitudinal	Pulpa-daño	Alg. AutoUmb.	Autoumbral

*Sm: señal media (ecuación 4.2) , DE: desviación típica de Sm (ecuación 4.3),

Alg. AutoUmb.: Algoritmo de autoumbralización (Anexo A8)

**ng: nivel de gris del umbral

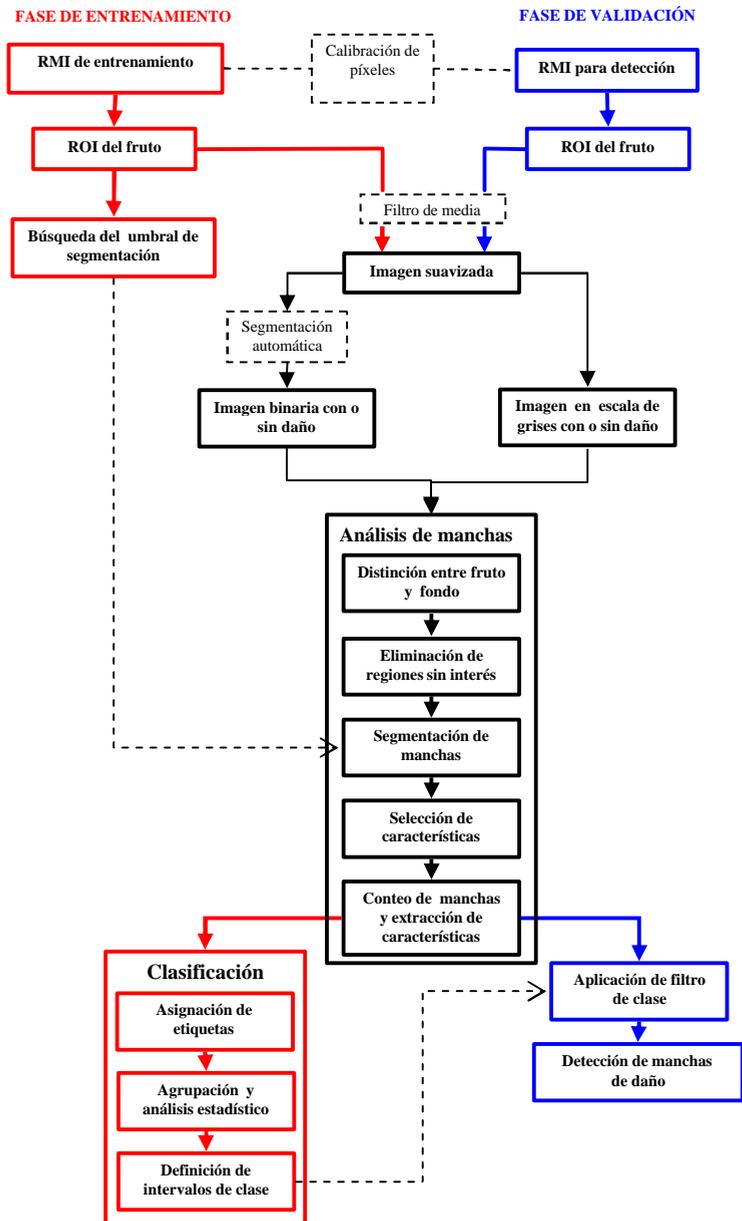


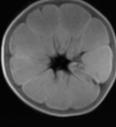
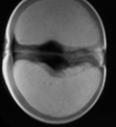
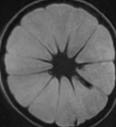
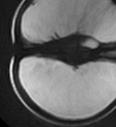
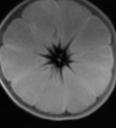
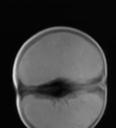
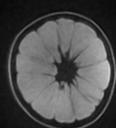
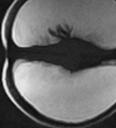
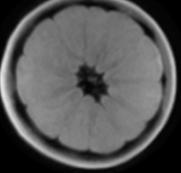
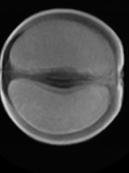
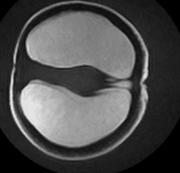
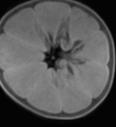
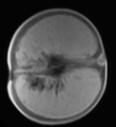
Figura 5.30. Esquema del algoritmo para la detección de daños en cítricos ocasionados por hongos y por heladas en el campo.

- **Procesamiento de imagen.** En cada imagen RMI original se seleccionó una ROI, a la cual se le aplicó, generalmente, el filtro de media para suavizar y disminuir el ruido presente. A las imágenes afectadas por heladas y a las imágenes contrastadas en T₂-plano ecuatorial del experimento preliminar con tres hongos, se les aplicó luego un algoritmo de autoumbraización, para obtener una imagen binaria de la pulpa (en blanco) con las regiones de daño y de fondo (en negro).

Se quitaron aquellas regiones de manchas muy pequeñas consideradas como ruido y se eliminaron también aquellas manchas de tamaño consideradas fondo o estructuras sanas de la fruta. En el caso de la imagen en escala de grises se aplicó el umbral buscado antes y para el caso de la imagen binaria se aplicó un umbral fijo de 128 como nivel de gris.

En la Tabla 5.40 se muestran para cada tipo de daño, según la secuencia y plano de exploración, las imágenes típicas obtenidas después de realizar el procesamiento digital anterior, esquematizado en la Figura 5.30.

Tabla 5.40. Imágenes típicas obtenidas del procesamiento digital para cada uno de los daños estudiados en cítricos.

Tipo de daño	Contraste en T ₁		Contraste en T ₂ (T ₁ GE)	
	Ecuatorial	Longitudinal	Ecuatorial	Longitudinal
<i>A. citri</i>				
<i>B. cinerea</i>				
<i>D. natalensis</i>				
Helada Cat I				
Helada Cat II				

* En las imágenes con daño por heladas, categoría II, se usó la secuencia T₁ (GE) en lugar de T₂ (SE)

- **Análisis y clasificación de manchas.** Las características seleccionadas para el análisis de manchas y los diferentes intervalos de valores de clase utilizados, como filtros de eliminación de mancha, para cada característica de las imágenes de entrenamiento, se presentan en la Tabla 5.41. Toda mancha dentro del intervalo indicado, en cualquiera de las características escogidas según el tipo de daño, contraste y plano de la imagen; fue eliminada y no fue considerada como región con daño.

En la Tabla 5.42 se presentan las típicas regiones de daño, provocadas por los hongos y por las heladas, que fueron detectadas y etiquetadas, de manera automática, por los algoritmos en la fase de validación, luego de aplicar los filtros de clase obtenidos en la fase de entrenamiento. Las regiones detectadas con daño, en las imágenes se indican con un color diferente para cada tipo de deterioro y corresponden a las mismas imágenes RMI con daño mostradas en las tablas anteriores.

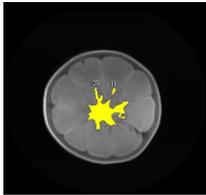
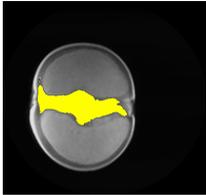
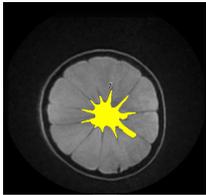
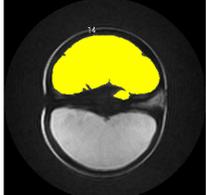
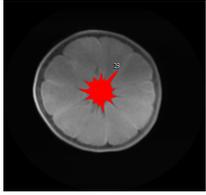
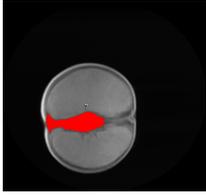
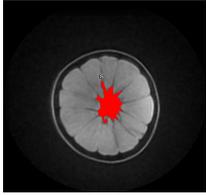
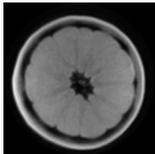
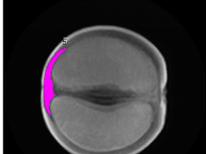
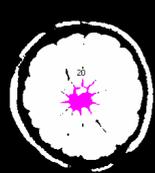
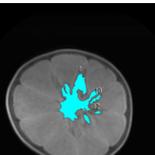
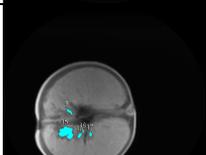
En la mayoría de las imágenes con daño por hongo, contrastadas en T_1 -plano longitudinal, se detectó la región de la columela con el daño localizado en un extremo (zona del albedo), y en otras fueron detectadas pequeñas manchas dentro de los gajos, mientras que en las imágenes contrastadas en T_2 , mismo plano, se detectó al menos una región de gajo completa con entrantes periféricos debidos a la podredumbre del hongo. En las imágenes en T_1 -plano longitudinal con daño por heladas, éste se detectó como pequeñas manchas dentro de los gajos, localizadas cerca de la columela. Para el caso de las imágenes con este daño reconstruidas con la SE en T_2 y con la secuencia GE en T_1 , fue detectado el contorno de al menos uno de los gajos afectados.

Tabla 5.41. Características seleccionadas e intervalos de clase para eliminación de manchas no deseadas en la detección de daños en imágenes RMI de cítricos.

RMI con	Cte	Plano	A, mm ²	Xc, mm	Yc, mm	L, mm	P, mm	C	R	# H
<i>D. natalensis</i> (ensayo preliminar)	T ₁	Long.	<16; >1000	>38,3						
	T ₂	Ecuat.	<80; >429			<33,6	<50,8	<3,72		
Long.		<8,65	<39,1	>78,1	55,8 >; <133,6	>312,5	>6	1,20>; <1,26		
<i>A. citri</i>	T ₁	Ecuat.	<3,15; >500 15>; <110	<48; >73	<42; >88	5>; <33				
		Long.	<3,5 50>; <244	<29; >65	<42; >95	10>; <38		8>; <19		
	T ₂	Ecuat.	<1,0				5,4>; <144	2>; <7,5		
		Long.	<600; >2345						<1,2; >1,95	
<i>B. cinerea</i>	T ₁	Ecuat.	<1; >300 6>; <140	<40; >89	<49; >90	7>; <26,7	>130			
		Long.	<7,5	>50	<43; >76	19,9>; <38	>136			
	T ₂	Ecuat.	<1,9				15>; <110			
		Long.				<50	240>; <321	>10	<1,185	
Helada cat I	T ₁	Ecuat.	<1; >5000 134<; <217	<30; >80	<41; >80			>12		
		Long.	<1; >5000 142<; <368	<34,4; >70	<48,5; >83			8>; <22,2		
	T ₂	Ecuat.	<2,2; >515			20>; >47 >197	38>; <110 >400			
		Long.	<160			100>; <139	<82	<1,77	=0	
Helada cat II	T ₁	Ecuat.	<3; >5000 59,1<; <125,2	60,4<; <63,2	65,5<; <68,4					
		Long.	<1; >5000 91,4<; <197,1	53,3<; <65,6	55<; <64,8					
	T ₁ (GE)	Ecuat.	<3; >5000 150<; <190	78,7<; <80,1	77,4<; <86,8					
		Long.	<10,5	<50; >100	<67; >100			<6,7	=0	

A: área, Xc, Yc: coordenadas del centroide, L: longitud, P: perímetro, C: compactación,
R: rugosidad, #H: número de huecos, Cte: contraste de la imagen RMI

Tabla 5.42. Detección de daños en cítricos afectados por hongos y por heladas en campo obtenida en la fase de validación del algoritmo.

Daño	T ₁		T ₂ (T ₁ GE*)	
	Ecuatorial	Longitudinal	Ecuatorial	Longitudinal
<i>A. citri</i>				
<i>B. cinerea</i>				
<i>D. natalensis</i>	 secuencia no usada			
Helada cat I				
Helada cat II				

* En las imágenes con daño por heladas categorías I y II se usó la secuencia T₁ (GE) en lugar de T₂ (SE)

La detección de los daños en las imágenes exploradas en el plano ecuatorial, sin importar el tipo de secuencia usada, se presentó en forma de manchas localizadas en la región de la columela que se extendieron por los tabiques para el caso de los hongos, y hasta los gajos en el caso de los frutos deteriorados por heladas.

5.4. Evaluación de los algoritmos

5.4.1. Melocotones

En la Tabla 5.43 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los algoritmos desarrollados para la detección de los daños estudiados en melocotón. Se puede observar que los mejores resultados se lograron detectando frutos afectados por el hongo saprofito y por el daño por frío, en los cuales, en promedio, se logró detectar correctamente el 98,5% de fruta con daño y se detectó, erróneamente, un 21,5% de fruta sana como producto con daño con tan solo un 1,5% por encima del umbral máximo de clasificación fijado en este trabajo. Por el contrario, la detección de fruta con picadura de mosca fue del 71%, un 9% por debajo del umbral mínimo fijado y con una alta falsa asignación de fruta sana como fruta con daño (42%), es decir un 22% más por encima del umbral máximo.

Tabla 5.43. Resultados de detección en melocotones de los algoritmos desarrollados según tipo de daño, contraste y plano de exploración.

Daño por	Contraste	Plano	Imágenes con daño		Imágenes sin daño	
			%DAFD	%FDFD	%DAFS	%FDFS
Hongo saprofito	T ₁	Ecuatorial	100	0	65	35
		Longitudinal	100	0	80	20
	T ₂	Ecuatorial	100	0	89	11
Frío	T ₁	Ecuatorial	91	9	65	35
		Longitudinal	100	0	92	8
	T ₂	Ecuatorial	100	0	80	20
Mosca	T ₁	Longitudinal	71	29	58	42

Estas diferencias se explican por las características mismas de los daños estudiados, en los que las regiones con deterioro por hongo y por frío se presentaron en las imágenes de forma más distribuida, con mayor número y tamaño, con lo cual la detección de al menos una mancha era más probable de ocurrir. Mientras en la fruta afectada por picadura, en la cual el número de daños (picaduras) y el tamaño era menor, con un contraste muy variado, que facilitó la confusión con pequeñas zonas sanas en el mesocarpio; fueron

aspectos que afectaron el buen desempeño del algoritmo de detección propuesto en esta tesis.

Para el caso de la detección del daño por hongo saprofito, el mejor desempeño se obtuvo con el algoritmo desarrollado para las imágenes adquiridas con la secuencia eco espín contrastada en T₂ utilizando en la fruta el plano ecuatorial (tan solo un 11% de fruta sana clasificada como dañada). Sin embargo, para los melocotones con daño por frío, el mejor desempeño se logró con el algoritmo desarrollado para las imágenes RMI contrastadas en T₁ adquiridas en el plano longitudinal (solo un 8% de falsa asignación a la fruta sana). Estos resultados fueron debidos, principalmente, a los mayores cambios de contraste entre las regiones sanas y con daño del mesocarpio, que esta secuencia permitió obtener, facilitando de este modo la discriminación de éstas por el algoritmo.

Con relación a la falsa detección de fruto sano como dañado, que realizó cada algoritmo con las imágenes de control de los demás daños, la Tabla 5.44 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 5.44. Porcentajes de falsa detección en frutos sanos de melocotón obtenidos con los algoritmos desarrollados.

Algoritmo para detectar daño por	Subgrupo RMI		%FDFS con imágenes control del experimento de:		
	Contraste	Plano	Hongo	Frío	Mosca
Hongo	T ₁	Ecuat.	35*	35	Sin imágenes**
	T ₁	Long.	20*	44	50
	T ₂	Ecuat.	11*	22	Sin imágenes**
Frío	T ₁	Ecuat.	41	35*	Sin imágenes**
	T ₁	Long.	7	8*	50
	T ₂	Ecuat.	56	20*	Sin imágenes**
Mosca	T ₁	Long.	56	40	42*

* Valores de referencia

** No se obtuvo imágenes en ese contraste y plano

Se puede observar que los algoritmos de mejor desempeño, señalados antes, también permitieron conseguir los menores porcentajes de falsa asignación de la fruta sana (22 y 7% para las secuencias con daño por hongo y

con daño por frío, respectivamente). En el caso de las imágenes de control del daño por hongo, este porcentaje fue incluso menor al obtenido con las propias imágenes de control del daño por frío, con las que se evaluó inicialmente el algoritmo. Para el caso del algoritmo desarrollado para el hongo en T₂-plano ecuatorial, la falsa detección de los controles del daño por frío fue el doble (22%) de la obtenida inicialmente (11%), no obstante este valor está muy cerca del umbral máximo de aceptación establecido del 20%. La falsa asignación de fruta sana que presentaron ambos algoritmos fue igual cuando se ejecutaron con las imágenes de control del daño por mosca (50%). Este porcentaje tan alto podría ser explicado por el origen de las imágenes RMI, que en el caso del daño por mosca provenían de frutos de la variedad Baby Gold, mientras que las imágenes de control de los otros daños estudiados provenían de frutos de melocotón Calanda variedad “Amarillo tardío”.

5.4.1.1. Seguimiento y detección anticipada del daño por frío

Período inicial de almacenamiento de los frutos. En la Tabla 5.45 se presenta la evolución de algunas propiedades registradas en los frutos durante el periodo inicial de almacenamiento de 22 días, comparando los valores medios obtenidos para cada propiedad medida al comienzo, al intermedio y al final de éste período. Se puede observar; en cuanto al peso de los frutos, que en cada día de observación no hubo diferencias entre el tratamiento control (1°C) y el tratamiento de inducción del daño por frío (5°C), y que la pérdida media de peso, al final, fue del 10% (1 g/día). En cuanto al color, entre tratamientos, los frutos, no presentaron cambio en su tonalidad roja (coordenada cromática +a*), ni en la tonalidad amarilla (coordenada +b*) para los mismo días de evaluación. En la luminosidad (coordenada L*) solo se presentaron diferencias entre los dos tratamientos en el día 22. Las pruebas destructivas mostraron que, en cada día de observación, los frutos de ambos tratamientos no presentaron diferencia estadística en la firmeza (valores entre 81 y 95N), y al inicio y final del almacenamiento, presentaron la misma concentración de sólidos solubles (entre 12,1 y 14,4%), datos muy similares a los reportados por Badenes *et al.* (1998), en un estudio de caracterización realizado con esta misma variedad de melocotones.

Tabla 5.45. Evolución de algunas propiedades de los frutos de melocotón durante los tratamientos de almacenamiento.

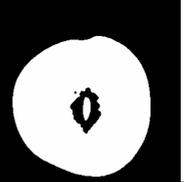
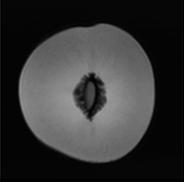
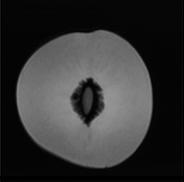
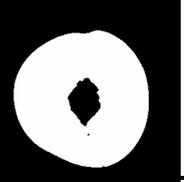
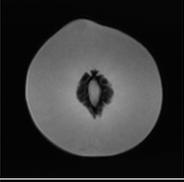
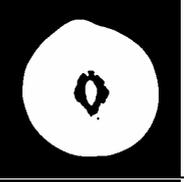
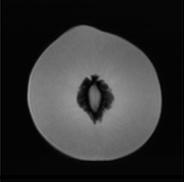
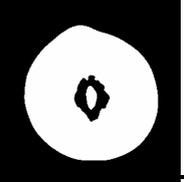
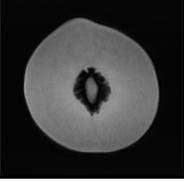
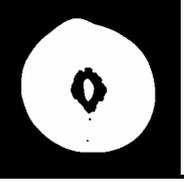
Trat.	Día	Pérdida Peso %	Color epidermis			Firmeza N	CSS %
			L*	a*	b*		
1°C	0	0,0 ^a	61,34 ^{ab}	12,89 ^a	44,79 ^a	81,6 ^{ab}	12,1 ^{ab}
	12	7,1 ^b	61,63 ^{ab}	14,06 ^a	50,84 ^c	83,1 ^{ab}	12,6 ^{cd}
	22	9,9 ^c	61,96 ^{ab}	13,61 ^a	45,81 ^{ab}	73,8 ^{ab}	13,4 ^{cd}
5°C	0	0,0 ^a	60,25 ^a	13,07 ^a	46,11 ^{ab}	81,0 ^{ab}	12,2 ^{ab}
	12	6,0 ^b	64,06 ^{bc}	11,22 ^a	48,45 ^{bc}	65,2 ^a	11,2 ^a
	22	10,0 ^c	66,50 ^c	12,16 ^a	46,51 ^{ab}	95,3 ^b	14,4 ^d

En una columna valores con la misma letra no presentan diferencia estadística según prueba LSD, P= 95%.

Para los dos tratamientos, no se observaron externamente síntomas de daño alguno. En la Tabla 5.46 se presentan dos de los frutos utilizados para el seguimiento, en los que se puede observar, que internamente no se presentó y por tanto no fue detectado, con el procesamiento digital, el daño por frío durante esta fase del experimento.

Adicionalmente, en los frutos usados para el muestreo destructivo tampoco se observó, durante los 22 días de almacenamiento previo, ninguno de los síntomas del daño por frío descritos en el Anexo A4. Por todo lo anterior, fueron tomados como valores de referencia de color, CSS y firmeza, para la siguiente fase el experimento, los promedios alcanzados el día 22, para compararlos con los promedios obtenidos durante el periodo de maduración de los frutos.

Tabla 5.46. Imágenes exteriores e interiores de frutos de melocotón en diferentes días de evaluación según el tratamiento de almacenamiento inicial.

Trat.	Día	Foto	RMI	Detección*
CONTROL 1°C	0			
	12			
	22			
INDUCCIÓN DE DAÑO POR FRÍO 5°C	0			
	12			
	22			

*Imágenes binarias en las que no se detectó daño alguno

Período final de maduración de los frutos. El seguimiento de la pérdida de peso fue realizado hasta el cuarto día de almacenamiento en esta fase (datos no mostrados), momento en el que los frutos de ambos tratamientos perdieron, en promedio, el 3,6% del peso fresco con el que habían llegado de la fase de almacenamiento previa. Esta variable mostró un comportamiento similar y no presentó diferencias estadísticas entre los frutos de ambos tratamientos. Según Ferrer *et al.* (2001), en melocotones a partir de un 5% de pérdida de peso el fruto empieza a denotar encogimiento y marchitamiento y el máximo porcentaje de pérdida de peso se sitúa en el 11% (Carmona, 2001).

La Tabla 5.47 muestra los resultados de las características estudiadas en los frutos durante su maduración (ensayos, en su mayoría destructivos, usados como referencia para confirmar la aparición del daño).

En cuanto a la apariencia externa, la coordenada cromática +a*, indicadora del componente rojo en los frutos, solo mostró diferencias entre tratamientos al final del almacenamiento (día 10). Analizando la variación de esta coordenada cromática en cada tratamiento; se encontró, para los frutos del tratamiento susceptible al daño, una diferencia estadística a partir del segundo día, mientras que la diferencia para los frutos control, se presentó a partir del cuarto día de maduración. El componente amarillo del color (coordenada cromática +b*) también presentó diferencia entre tratamientos solamente al final (día 10), y por tratamiento solo se registró diferencia estadística, el último día de almacenamiento en los frutos de control. Respecto a la luminosidad L*, los frutos susceptibles al daño por frío no presentaron diferencias estadísticas durante la maduración, mientras que en los frutos de control si se presentaron diferencias a partir del día 5. Se presentaron diferencias en L* al inicio y al final. Se puede inferir de todo lo anterior, que la discriminación entre frutos con y sin daño por frío, basada en el color de la epidermis exterior, no fue posible en las condiciones de éste experimento.

Tabla 5.47. Evolución del color de la epidermis, la firmeza y el contenido de azúcares de la pulpa durante el período de maduración a 20°C y 85% de HR.

DÍA	Luminosidad L*		Coordenada a*		Coordenada b*		Firmeza, N		CSS, %	
	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C
Inicio ⁺	* 61,96 ^a	66,08 ^b	13,61 ^{ab}	12,26 ^a	45,81 ^{ab}	45,92 ^{ab}	73,8 ^c	95,4 ^d	13,4 ^d	14,4 ^d
1	64,40 ^{ab}	64,56 ^{ab}	12,49 ^a	13,49 ^{ab}	44,86 ^a	45,62 ^{ab}	66,4 ^c	79,5 ^d	13,0 ^d	13,8 ^{cd}
2	63,74 ^{ab}	64,45 ^{ab}	14,29 ^{bc}	13,88 ^{bc}	45,18 ^a	46,04 ^{ab}	54,2 ^{abc}	44,6 ^{bc}	12,9 ^{bc}	12,9 ^{bc}
3	63,48 ^{ab}	64,26 ^{ab}	15,20 ^{bcd}	14,11 ^{bc}	44,68 ^a	45,44 ^a	53,1 ^{abc}	51,4 ^c	12,4 ^{abc}	13,0 ^{bc}
4	64,16 ^{ab}	64,38 ^{ab}	15,48 ^{cd}	14,30 ^{bc}	46,32 ^{ab}	45,55 ^{ab}	* 68,3 ^c	49,8 ^c	* 11,7 ^a	12,5 ^{bc}
5	65,64 ^{ab}	66,71 ^b	15,45 ^{cd}	14,87 ^b	48,15 ^{ab}	48,95 ^b	* 56,5 ^{bc}	30,7 ^{ab}	12,3 ^{abc}	13,0 ^{ab}
6	66,26 ^{ab}	65,74 ^{ab}	15,53 ^{cd}	14,52 ^{bc}	50,03 ^b	48,66 ^{ab}	* 46,3 ^{ab}	22,0 ^a	12,0 ^{ab}	11,7 ^b
8	64,04 ^{ab}	64,97 ^{ab}	16,56 ^d	15,15 ^b	49,05 ^{ab}	46,51 ^{ab}	38,7 ^a	25,7 ^a	12,0 ^{ab}	12,9 ^{bc}
10	* 67,38 ^b	62,76 ^a	* 16,89 ^d	14,32 ^{bc}	* 50,79 ^b	45,04 ^a	41,4 ^a	34,3 ^{ab}	12,1 ^{ab}	12,3 ^{ab}

⁺ Valores de referencia al inicio del período de maduración

Para cada variable y día de exploración, * denota diferencia estadística entre tratamientos y en una columna valores con la misma letra no presentan diferencia estadística según prueba LSD, P= 95%.

En cuanto a la firmeza de la pulpa, las mediciones revelaron diferencias estadísticas entre tratamientos, en la mitad del período de maduración (días 4, 5 y 6), tiempo durante el cual los frutos del tratamiento susceptible al daño presentaron una firmeza de 18 a 25 N menor a la obtenida por los frutos sin daño. Los frutos susceptibles al daño presentaron diferencia estadística en esta variable a partir del segundo día, cuando la firmeza media se redujo a 44,6 N, mientras que en los frutos control a partir del día 6, cuando la firmeza fue de 46,3 N.

Con relación al contenido de azúcares los tratamientos presentaron una diferencia puntual al tercer día de maduración. Los frutos del tratamiento susceptible al daño presentaron diferencias en la CSS a partir del segundo día mientras que los frutos de control a partir del día 4. La distinción entre frutos, con y sin daño, empleando este ensayo destructivo no resultó evidente.

En la Tabla 5.48 se presentan las características internas estudiadas; color del mesocarpio y los índices del daño, valorados como textura y pardeamiento, y se indica, en las dos últimas columnas, si los frutos evidenciaron para cada día los síntomas internos del deterioro.

Tabla 5.48. Evolución del color del mesocarpio y de los síntomas del daño por frío durante la fase de maduración de los frutos de melocotón según la temperatura previa de almacenamiento.

DÍA	Luminosidad L*		Coordenada a*		Coordenada b*		Índice de textura		Índice de pardeamiento		Presencia del daño	
	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C	1°C	5°C
1	66,07 ^{ab}	64,35 ^{bc}	11,77 ^a	11,80 ^a	48,62 ^a	47,76 ^{bc}	* 1,14 ^{ab}	1,71 ^a	* 1,00 ^a	2,14 ^a	Poca	Si
2	68,15 ^{abc}	65,52 ^c	11,33 ^a	12,08 ^a	51,95 ^{ab}	49,93 ^{bc}	* 1,00 ^a	2,14 ^{ab}	* 1,00 ^a	2,29 ^{ab}	No	Si
3	* 68,33 ^{bc}	60,61 ^{ab}	* 11,29 ^a	12,69 ^a	* 52,20 ^{ab}	45,50 ^{ab}	* 1,00 ^a	2,11 ^{ab}	* 1,29 ^{ab}	3,22 ^c	Poca	Si
4	* 67,79 ^{abc}	63,11 ^{bc}	* 11,23 ^a	12,74 ^a	51,49 ^{ab}	41,88 ^{bc}	* 1,12 ^{ab}	2,00 ^{ab}	* 1,57 ^{abc}	3,57 ^{cd}	Si	Si
5	68,41 ^c	64,65 ^{bc}	11,98 ^a	11,98 ^a	* 55,20 ^b	48,46 ^{bc}	2,12 ^c	2,14 ^{ab}	* 2,14 ^{bc}	3,00 ^{bc}	Si	Si
6	68,03 ^{abc}	66,68 ^a	12,59 ^{ab}	11,66 ^a	54,78 ^b	50,76 ^c	1,71 ^c	1,71 ^a	* 2,00 ^{bc}	3,14 ^c	Si	Si
7	68,39 ^c	65,40 ^c	12,27 ^a	12,45 ^a	53,95 ^b	50,09 ^{bc}	* 1,62 ^{bc}	2,33 ^c	* 1,71 ^{abc}	3,11 ^c	Si	Si
10	* 65,74 ^a	56,93 ^a	* 13,90 ^b	12,28 ^a	* 55,86 ^b	41,76 ^a	* 1,83 ^c	2,17 ^c	* 1,43 ^{bc}	4,00 ^d	Si	Si

Para cada variable y día de exploración, * denota diferencia estadística entre tratamientos y en una columna valores con la misma letra no presentan diferencia estadística según prueba LSD, P= 95%.

Los resultados indican como para los frutos tratados previamente a 5°C, efectivamente se indujo el daño (índice de pardeamiento > 2), mientras en los frutos control, durante los dos primeros días, el daño se evidenció muy poco o nada (día 2), ya que el almacenamiento a 1°C no favoreció su pronta aparición, como era de esperar. Sin embargo, a partir del cuarto día, los frutos control exhibieron también síntomas del daño (índices de firmeza y pardeamiento cercanos a 2).

5.4.1.2. Resultados en la detección automática

La Tabla 5.49 muestra, para cada día de la fase de maduración, en los dos tratamientos de temperatura usados, los índices del daño por frío (porcentaje real de frutos afectados, índice de textura y de pardeamiento de la pulpa) y los porcentajes de aciertos y falsas detecciones de melocotones con daño y sin daño, obtenidos con los algoritmos de procesamiento digital explicados antes. También se indica al final de cada tratamiento los promedios generales obtenidos durante los diez días.

Los resultados obtenidos muestran que los algoritmos detectaron muy bien (más del 98%) la fruta con daño del tratamiento a 5°C desde el mismo día en que este ocurrió y con dos días de antelación a los métodos destructivos, los cuales mostraron indicios del deterioro en las valoraciones realizadas de la firmeza y del color de la pulpa del fruto. Sin embargo, ninguno de los algoritmos detectó con eficiencia los frutos calificados como sanos en el muestreo diario del tratamiento control, a pesar que la detección de frutos levemente afectados, fue también muy exitosa (más del 91%). Se destaca el resultado obtenido con el algoritmo para imágenes RMI en T_1 del plano longitudinal en el día uno, en el cual del 86% de fruta sana, detectó el 67% correctamente y rechazó como mala un 33%, clasificando correctamente todo el 14% de la fruta dañada que carecía de pardeamiento en la pulpa y tan solo evidenciaba una textura ligeramente lanosa. No obstante, este mismo algoritmo con fruta completamente afectada con pardeamiento y lanosidad grado 2, detectó solo el 71% de melocotones dañados.

Tabla 5.49. Porcentajes de aciertos y de falsa detección del daño por frío en melocotones almacenados previamente a 1°C y a 5°C , en diferentes días de maduración según contraste y plano de exploración de las imágenes RMI.

TRATAMIENTO CONTROL: almacenamiento previo a 1°C													
DIA	Índices del daño por frío			RMI en T₁, plano ecuatorial				RMI en T₁, plano longitudinal				RMI en T₂, plano ecuatorial	
	DPFF%	I_TEX	I_PARD	DAFD%	FDFD%	DAFS%	FDFS%	DAFD%	FDFD%	DAFS%	FDFS%	DAFD%	FDFD%
1	14	1,14	1,00	100	0	17	83	100	0	67	33	100	0
2	0	1,00	1,00	Ninguno con daño		43	57	Ninguno con daño		14	86	Ninguno con daño	
3	29	1,00	1,29	100	0	0	100	100	0	0	100	100	0
4	71	1,12	1,57	100	0	0	100	80	20	0	100	100	0
5	100	2,12	2,14	100	0	Ningún fruto sano		71	29	Ningún fruto sano		100	0
6	86	1,71	2,00	100	0	0	100	100	0	0	100	50	50
7	86	1,62	1,71	100	0	0	100	100	0	0	100	100	0
10	43	1,83	1,43	100	0	0	100	100	0	33	67	100	0
Media	54	1,39	1,52	100	0	9	91	94	6	16	84	93	7
TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN DEL DAÑO: almacenamiento previo a 5°C													
DIA	DPFF %	I_TEX	I_PARD	DAFD%	FDFD%	DAFS%	FDFS%	DAFD%	FDFD%	DAFS%	FDFS%	DAFD%	FDFD%
1	100	1,71	2,14	100	0			100	0			100	0
2	100	2,14	2,29	100	0			86	14			100	0
3	100	2,11	3,22	100	0			100	0			100	0
4	100	2,00	3,57	86	14			100	0			100	0
5	100	2,14	3,00	100	0	Ningún fruto sano		100	0	Ningún Fruto sano		100	0
6	100	1,71	3,14	100	0			100	0			100	0
7	100	2,33	3,11	100	0			100	0			100	0
10	100	2,17	4,00	100	0			100	0			100	0
Media	100	2,05	3,05	98	2			98	2			100	0

DPFF: daño por frío real en la fruta, I_TEX: índice de la textura de la pulpa, I_PARD: índice del pardeamiento de la pulpa, DAFD: detección acertada de fruto con daño, FDFD: falsa detección de fruto con daño, DAFS: detección acertada de fruto sano, FDFS: falsa detección de fruto sano.

La baja detección de frutos sanos podría ser explicada al haber utilizado imágenes RMI sin daño, para la fase de entrenamiento del algoritmo, obtenidas al comienzo del experimento (22 días antes); tiempo durante el cual, a pesar que no se presentaron cambios significativos en la apariencia externa, sí pudo haber cambiado la movilidad del agua interior en tejidos como el mesocarpio, afectando esta situación las señales emitidas por los protones y por tanto las imágenes RMI reconstruidas durante la fase de maduración. A pesar de las falsas detecciones de frutos sanos como afectados, se considera que los algoritmos desarrollados presentan un buen desempeño dado que trabajaron con imágenes de frutos con síntomas leves del daño por frío (leve lanosidad y ligero pardeamiento del hueso y del mesocarpio), con lo cual el alto porcentaje de detección de frutos con daño tuvo mayor mérito. No obstante los algoritmos podrían ser mejorados en trabajos futuros para aminorar la falsa asignación de la fruta sana.

En la Tabla 5.50 se muestran algunas de las fotos exteriores e interiores de frutos del tratamiento control y del tratamiento para inducir el daño, con sus respectivas imágenes RMI y la imagen de detección entregada por los diferentes algoritmos. Las imágenes corresponden a diferentes días (inicio, intermedio y final) de la fase de maduración.

Trabajos previos utilizando RMI para estudiar el daño por frío (lanosidad) en frutas de hueso fueron reportados por Sonogo *et al.* (1995) y por Barreiro *et al.* (2000). A diferencia del presente trabajo, en el primero los autores no realizaron ningún procesamiento de imagen en las RMI obtenidas y en el segundo, los autores obtuvieron imágenes, con un equipo de alta intensidad de campo magnético, basadas en mapas en T_2 que fueron analizadas mediante parámetros obtenidos de los respectivos histogramas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, a diferencia de los anteriores y de los reportados en kaki por Clark y MacFall (1996) y en manzanas por Marigheto y Hills (2005), permiten demostrar que la detección automática y anticipada del daño por frío en melocotones, basada en imágenes RMI obtenidas con un equipo de menor resolución y campo magnético, es factible.

Tabla 5.50. Imágenes exteriores e interiores de frutos de melocotón en diferentes días de la fase de maduración según el tratamiento de almacenamiento previo.

Trat.	Día	Foto	Corte	RMI	Detección*
1°C	1				
	4				
	10				
5°C	1				
	4				
	10				

* Las imágenes binarias con manchas etiquetadas en violeta indican detección de daño.

5.4.2. Cítricos

En la Tabla 5.51 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los algoritmos desarrollados para detectar diferentes daños en cítricos.

Tabla 5.51. Resultados de detección en cítricos de los algoritmos desarrollados según tipo de daño, contraste y plano de exploración.

Daño por	Cte	Plano	Imágenes con daño		Imágenes sin daño	
			%DAFD	%FDFD	%DAFS	%FDFS
Tres hongos (ensayo preliminar)	T ₁	Long.	80	20	100	0
		Ecuat.	50	50	79	21
	T ₂	Long.	75	25	81	19
<i>A. citri</i>	T ₁	Ecuat.	81	19	82	18
		Long.	63	37	68	32
	T ₂	Ecuat.	82	18	87	13
		Long.	72	28	82	18
<i>B. cinerea</i>	T ₁	Ecuat.	75	25	77	23
		Long.	86	14	100	0
	T ₂	Ecuat.	92	8	85	15
		Long.	75	25	72	28
Helada Cat I	T ₁	Ecuat.	97	3	80	20
		Long.	92	8	87	13
	T ₂	Ecuat.	88	12	93	7
		Long.	93	7	87	13
Helada Cat II	T ₁	Ecuat.	100	0	100	0
		Long.	93	7	100	0
	T ₁ (GE)	Ecuat.	93	7	100	0
		Long.	93	7	87	13

Cte: contraste, GE: gradiente eco, %DAFD: detección acertada de fruto con daño, %FDFD: falsa detección de fruto con daño, %DAFS: detección acertada de fruto sano, %FDFS: falsa detección de fruto sano.

En el experimento preliminar que se realizó con las imágenes RMI con daño producido por los hongos *A. citri*, *B. cinerea* y *D. natalensis*, el mejor desempeño se obtuvo con el algoritmo desarrollado, para imágenes adquiridas con la secuencia eco espín contrastada en T₁, usando el plano longitudinal de la fruta y cumpliendo con los umbrales de clasificación establecidos. Este resultado es muy interesante, ya que las imágenes con daño de cada hongo fueron mezcladas, con lo cual independiente del hongo que hubiera causado la podredumbre en el interior de la fruta, el algoritmo pudo realizar una exitosa clasificación sin falsa asignación del producto sano.

Para el caso específico de frutos afectados con *A. citri*, se destacan los resultados obtenidos por los algoritmos basados en imágenes reconstruidas en el plano ecuatorial, usando las secuencias eco espín en T_1 y en T_2 . Ambos algoritmos discriminaron exitosamente la fruta dentro de los umbrales establecidos.

Con los frutos afectados por *B. cinerea* los mejores algoritmos resultaron ser los desarrollados para las imágenes contrastadas en T_1 -plano longitudinal y T_2 -plano ecuatorial, los cuales también clasificaron acertadamente dentro de los umbrales fijados. Se destaca que el segundo realizó un 15% de falsa asignación a los frutos sanos y permitió detectar el 92% del producto dañado.

Todos los algoritmos desarrollados para detectar el daño por heladas presentaron un desempeño exitoso, dentro de los umbrales de clasificación establecidos, con porcentajes de detección de fruta dañada superiores al 90%. Para el daño más leve (categoría I), se destacó el algoritmo basado en imágenes eco espín, reconstruidas en T_1 -plano longitudinal, con una discriminación de la fruta dañada del 97%. Para el daño severo (categoría II) se destacó un algoritmo similar basado en el mismo tipo secuencia y plano, con el que se alcanzó la clasificación óptima. Se resalta aquí también, como resultado importante de esta investigación, que otro algoritmo basado en imágenes reconstruidas con la secuencia gradiente eco, usando el plano ecuatorial; permitió discriminar hasta un 93% de fruta dañada, sin falsa asignación de fruta sana, con el menor tiempo de adquisición de la imagen (4 segundos) que permite el equipo RMI usado en esta tesis.

Se deduce del análisis de los resultados obtenidos en la Tabla 5.51 que el daño interno que presentó los porcentajes más altos de detección, con los algoritmos desarrollados, fue el deterioro provocado por heladas. En segundo lugar fueron los daños por podredumbre del hongo *B. cinerea*. Los menores desempeños de los algoritmos se lograron con los daños producidos por *A. citri*.

También se deduce, que los algoritmos basados en imágenes eco espín contrastadas en T_1 y adquiridas en el plano ecuatorial de la fruta permitieron, obtener, en general, los porcentajes más elevados de detección acertada de producto con cualquier clase de daño dentro del umbral máximo permitido de falsa asignación de fruta sana.

La Tabla 5.52 muestra los resultados obtenidos respecto a la falsa detección de fruto sano como dañado que realizó cada algoritmo con las imágenes de control de los demás daños.

Los mejores resultados se lograron en el experimento preliminar de tres hongos con el algoritmo desarrollado para las imágenes eco espín en T₁-plano longitudinal, donde a pesar de haberlo evaluado con imágenes provenientes de frutos de otras tres variedades de cítricos diferentes, la falsa asignación estuvo alrededor del umbral máximo permitido del 20%. En el caso de las dos categorías de daño por heladas, los mejores resultados se presentaron con el algoritmo basado en imágenes eco espín en T₂-plano ecuatorial. Para los casos específicos de daño por *A. citri* y por *B. cinerea* no se lograron resultados consistentes en la falsa asignación de la fruta sana, ya que con unos grupos de imágenes de control se logró discriminación por debajo del umbral máximo establecido, pero en otros la falsa clasificación fue muy alta. En los algoritmos desarrollados para cada hongo, quizás si tuvo algún efecto el origen de las imágenes utilizadas.

Tabla 5.52. Porcentajes de falsa detección en frutos sanos de cítricos obtenidos con los algoritmos desarrollados.

Algoritmo para detectar daño por	Cte	Plano	%FDFS con imágenes control del experimento de:				
			Tres hongos	<i>A. citri</i>	<i>B. cinerea</i>	Helada Cat I	Helada Cat II
Tres hongos (ensayo preliminar)	T ₁	Long.	0*	10	0	24	19
		Ecuat.	21*	82	65	15	Sin imágenes
	T ₂	Long.	19*	63	67	30	
<i>A. citri</i>	T ₁	Ecuat.	Sin imágenes**	18*	32	70	48
		Long.	30	32*	37	38	38
	T ₂	Ecuat.	43	13*	23	10	Sin imágenes
		Long.	81	18*	54	55	
<i>B. cinerea</i>	T ₁	Ecuat.	Sin imágenes	40	23*	70	57
		Long.	15	31	0*	43	43
	T ₂	Ecuat.	93	23	15*	10	Sin imágenes
		Long.	19	43	28*	25	
Helada Cat I	T ₁	Ecuat.	Sin imágenes	87	89	20*	62
		Long.	15	28	37	13*	9
	T ₂	Ecuat.	7	23	18	7*	Sin imágenes
		Long.	12	30	29	13*	
Helada Cat II	T ₂	Ecuat.	Sin imágenes	20	26	20	0*
		Long.	25	55	25	9	0*

* Valores de referencia, ** No se obtuvo imágenes en ese contraste y plano

Considerando los porcentajes de detección acertada en fruta con daño, de falsa asignación de fruta sana, la cantidad de tipos de daño que evaluaron, el número de variedades de cítricos y el total de imágenes RMI con que se probaron; se determinó de este estudio que los algoritmos con mejor desempeño para la clasificación supervisada de cítricos, fueron los desarrollados con imágenes RMI reconstruidas con la secuencia eco espín contrastada en T₁ en el plano longitudinal de la fruta.

5.4.2.1. Seguimiento de la detección del daño por hongos en cítricos

En la Tabla 5.53 se presenta para el ensayo preliminar con tres hongos, el porcentaje de detección en las imágenes con daño y el tiempo, en días, de anticipación de la detección a la manifestación visual exterior del deterioro en la fruta.

Tabla. 5.53. Porcentaje de detección de daño y tiempo de anticipación de la detección en ensayo preliminar de inoculación de tres hongos.

RMI	% Infestación	% Detección	Tiempo de anticipación de la detección (No. de días)		
			<i>A. citri</i> *	<i>B. cinerea</i> **	<i>D. natalensis</i> **
T ₁ -longitudinal	100	82	9	3	2
T ₂ -ecuatorial	100	53	4	2	0
T ₂ -longitudinal	100	62	8	1	0

* con relación al día final del experimento

** con relación a la visualización de síntomas exteriores

Para este ensayo preliminar, con los tres hongos inoculados, el porcentaje de infestación y desarrollo de síntomas internos de podredumbre por los patógenos fue del 100%, mientras los frutos de control no presentaron desarrollo de ningún hongo. El seguimiento se realizó, respectivamente, en *A. citri*, *B. cinerea* y *D. natalensis*, durante 14, 7 y 4 días. Considerando todas las imágenes, agrupadas por contraste y plano, el mayor porcentaje de detección se presentó para las imágenes ponderadas en T₁ adquiridas en plano longitudinal (82%), seguido de las imágenes adquiridas en T₂-plano longitudinal (62%) y la menor detección se alcanzó con las imágenes en T₂-plano ecuatorial (53%). El hongo que fue detectado con mayor antelación fue *A. citri* (entre 4 y 9 días) antes de finalizar las exploraciones, pues este patógeno no desarrolló sintomatología externa durante todo el tiempo que se

prolongó el ensayo. Hongos como *B. cinerea* y *D. natalensis*, con una evolución más acelerada de las podredumbres, pudieron detectarse de manera automática, hasta 3 y 2 días, respectivamente, antes de que se visualizaran los síntomas de daño fuera de la fruta. Para todos los hongos las imágenes que permitieron detectar con mayor antelación el daño interno, fueron las adquiridas en T₁ usando el plano longitudinal. Las imágenes ponderadas en T₂ no permitieron en este ensayo detectar anticipadamente la podredumbre ocasionada por *D. natalensis*.

En la Tabla 5.54 se comparan los resultados obtenidos en el experimento, realizado posteriormente, sólo con los hongos *A. citri* y *B. cinerea*, para analizar la evolución de la detección automática del daño. En este experimento también se logró una infestación muy alta de los hongos, logrando que se desarrollara sintomatología interna de la podredumbre en más del 90% de los frutos tratados, mientras que los frutos de control no exhibieron ninguna afección.

B. cinerea mostró, al cabo de 6 días, evidencia exterior del daño en el 85% de los frutos, mientras que *A. citri* sólo exhibió síntomas en 15% de la fruta tratada. El restante porcentaje de fruta no manifestó, externamente, ningún daño durante todo el ensayo. En el caso de *A. citri* se tomó como referencia el último día del seguimiento (día 11) para el estimar el tiempo de anticipación de la detección del daño en las imágenes RMI.

Utilizando las imágenes RMI con daño obtenidas con las secuencias evaluadas, se elaboró el gráfico de la evolución de la detección del daño en todos los frutos para ambos hongos. Se puede observar que la primera detección de la podredumbre por *B. cinerea* se presentó dos días después de la inoculación en el 42,1% de los frutos y ésta fue aumentando hasta alcanzar el 100% de la fruta al quinto día. En el caso de *A. citri* la primera detección ocurrió el cuarto día en el 22,2% de los frutos y ésta también fue aumentando progresivamente hasta detectarse la podredumbre interna en todos los frutos, 10 días después de la inoculación. Dada las condiciones similares de temperatura y humedad relativa en las que se desarrollaron los dos hongos, el gráfico pone de manifiesto el menor tiempo que tarda *B. cinerea* en colonizar los tejidos de los cítricos antes de llegar a la epidermis exterior.

Tabla. 5.54. Resultados en la evolución de la detección de daños internos ocasionados por hongos en cítricos.

CARACTERÍSTICAS	<i>A. alternata</i> pv. <i>citri</i>	<i>Botrytis cinerea</i>																																							
Tiempo de seguimiento, días	11	6																																							
Número de frutos	20	20																																							
% con síntomas internos	90	95																																							
% con síntomas externos	15	85																																							
Comparación respecto A los frutos sin daño en:	*	*																																							
Peso, g Índice de color (IC) CSS, %	Sin diferencia Día 2, 9,10,11 Día 10, 11	Sin diferencia Día 4,5,6 Día 5, 6																																							
Evolución de la detección del daño interno:	<table border="1"> <caption>Evolución de la detección del daño interno (%)</caption> <thead> <tr> <th>Días después de la inoculación</th> <th><i>A. citri</i> (%)</th> <th><i>B. cinerea</i> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>2</td><td>0</td><td>42</td></tr> <tr><td>3</td><td>0</td><td>45</td></tr> <tr><td>4</td><td>22</td><td>88</td></tr> <tr><td>5</td><td>35</td><td>100</td></tr> <tr><td>6</td><td>52</td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td>58</td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td>75</td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td>95</td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td>100</td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td>100</td><td></td></tr> </tbody> </table>		Días después de la inoculación	<i>A. citri</i> (%)	<i>B. cinerea</i> (%)	0	0	0	1	0	0	2	0	42	3	0	45	4	22	88	5	35	100	6	52		7	58		8	75		9	95		10	100		11	100	
Días después de la inoculación	<i>A. citri</i> (%)	<i>B. cinerea</i> (%)																																							
0	0	0																																							
1	0	0																																							
2	0	42																																							
3	0	45																																							
4	22	88																																							
5	35	100																																							
6	52																																								
7	58																																								
8	75																																								
9	95																																								
10	100																																								
11	100																																								
Tiempo de anticipación y porcentaje de la detección	<table border="1"> <caption>Tiempo de anticipación y porcentaje de la detección (%)</caption> <thead> <tr> <th>Días de anticipación de la detección</th> <th><i>A. citri</i> (%)</th> <th><i>B. cinerea</i> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>100</td><td>95</td></tr> <tr><td>2</td><td>95</td><td>80</td></tr> <tr><td>3</td><td>75</td><td>48</td></tr> <tr><td>4</td><td>68</td><td>25</td></tr> <tr><td>5</td><td>60</td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>35</td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td>25</td><td></td></tr> </tbody> </table>		Días de anticipación de la detección	<i>A. citri</i> (%)	<i>B. cinerea</i> (%)	1	100	95	2	95	80	3	75	48	4	68	25	5	60		6	35		7	25																
Días de anticipación de la detección	<i>A. citri</i> (%)	<i>B. cinerea</i> (%)																																							
1	100	95																																							
2	95	80																																							
3	75	48																																							
4	68	25																																							
5	60																																								
6	35																																								
7	25																																								

*Según Test de LSD con P=95%

Lo más importante es que la reconstrucción de imágenes por resonancia magnética y el procesamiento digital de éstas permitió detectar, con suficiente anticipación a su evidencia externa, la presencia en el interior de la fruta de estos daños. La última gráfica de la Tabla 5.54 muestra el número de días de antelación y el porcentaje de fruta dañada detectada en este tiempo para los dos hongos estudiados. Fue posible detectar hasta un 26% de fruta dañada por *B. cinerea* y por *A. citri*, 4 y 7 días, respectivamente, antes de ser visto exteriormente los daños. El 100% de los frutos con daño, incluso fueron detectados un día antes de la podredumbre aparecer en la epidermis exterior.

Para nuestro conocimiento, estudios de los daños producidos por estos hongos en cítricos, utilizando RMI, no han sido reportados. En el trabajo realizado por Galed *et al.* (2004) se visualizó el daño interior generado por *P. digitatum* en mandarina Fortuna y naranja Valencia, a partir de la primera semana de almacenamiento de la fruta, pero los autores no indicaron con cuanta antelación de tiempo a la aparición de síntomas externos puede verse el daño en las imágenes. Glidewell *et al.* (1997) reportan la visualización con RMI del daño interior producido por *B. cinerea* en uva, tres días después de la inoculación, pero tampoco indicaron el tiempo de anticipación de la visualización. A diferencia del presente trabajo, en ninguno de los anteriores se realizó un procesamiento digital de las imágenes con miras a buscar la detección automática del daño.

Se destaca también en los presentes resultados, que medidas realizadas de la fruta en forma paralela a las exploraciones RMI, tales como el peso, índice de color y concentración de azúcares; no insinuaron alteraciones tempranas en la fruta respecto a los controles, a excepción del índice de color que en el caso de los frutos con *A. citri* mostró una diferencia significativa de 0,6 a favor del control en el segundo día de exploración (Figura 5.31-a). Otras diferencias estadísticas respecto a los frutos sin daño, del IC en los días 9,10 y 11, y de la CSS en los días 10 y 11; atribuibles al crecimiento del hongo *A. citri* en la epidermis y en el mesocarpio del fruto, fueron obtenidas con el colorímetro y el refractómetro cuando las imágenes de RMI ya habían detectado, para el octavo día, el 75% de la fruta afectada por el patógeno (Figuras 5.31-a y 5.31-c).

En el caso de *B. cinerea* las diferencias estadísticas, con relación a los frutos sin daño, en el índice de color y en la CSS, fueron obtenidas a partir del cuarto día, cuando el procesamiento de imágenes RMI había detectado, un día

antes, el 44,4% de los frutos afectados con este hongo (Figura 5.31-b y 5.31-c). Desafortunadamente, no se realizaron mediciones de la CSS en frutos adicionales, inoculados con los hongos y en testigos, en cada día de exploración para establecer en que día, este método destructivo podría haber probablemente o no discriminado, por la concentración de azúcares del zumo, diferencias entre tratamientos.

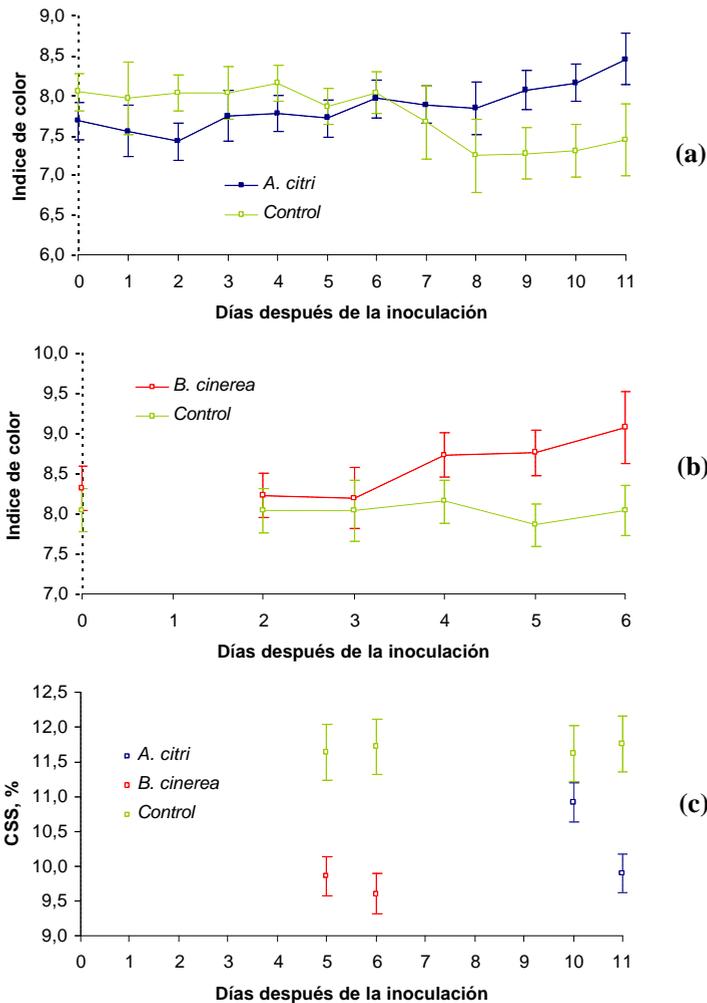
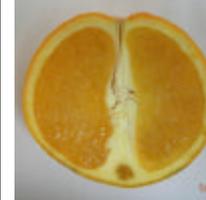


Figura 5.31. Evolución del índice de color de la piel y del contenido de azúcares del zumo en los cítricos inoculados con hongos.

En la Tabla 5.55 se muestra la apariencia externa e interna de algunos de los frutos con daño por los hongos estudiados, obtenidas en diferentes días del experimento.

Tabla. 5.55. Apariencia externa e interna de los frutos con daño por hongos y controles en diferentes días del experimento.

Día	<i>A. citri</i>	Control	<i>B. cinerea</i>	Control
Inicial				
Intermedio				
Final				
Plano ecuatorial				
Plano longitudinal				

En la columna “control” a la derecha de cada hongo se muestran las imágenes de los respectivos frutos testigos, sin daño interno. Las manchas

grises, localizadas en el centro de los frutos, corresponden a la cera empleada para sellar los orificios de inoculación. El lector puede observar que la apariencia externa fue bastante similar en la fruta, con y sin daño, de las imágenes registradas al inicio y en el intermedio del ensayo. Al final del experimento, en algunos frutos, se observó zonas necróticas y ablandamiento de la epidermis próxima al orificio de inoculación, como se muestra en las fotos de los frutos inoculados con *A. citri* y con *B. cinerea*, las cuales explican las diferencias encontradas en los índices de color (Figura 5.31) respecto a los frutos control. Para estos mismos frutos del final del ensayo, se muestran los cortes en los planos ecuatorial y longitudinal, realizados en el centro del fruto para apreciar la apariencia interna y comprobar la presencia de podredumbre causada por el hongo. Los síntomas correspondieron con los descritos en el capítulo 4 de materiales y métodos. Se verificó que la podredumbre interna fue efectivamente ocasionada por los hongos en cuestión, mediante el cultivo de los mismos a partir de muestras del mesocarpio afectado. Estos hongos produjeron las esporas al cabo de unos días pudiendo ser identificados. Las imágenes de estos se presentan en el Anexo A11.

5.4.2.2. Detección del daño por heladas en campo

En la Tabla 5.56 se comparan los valores medios de algunas características físicas medidas en los frutos con daño por heladas categorías I y II y los frutos control sin daño.

Tabla 5.56. Comparación de características físicas de frutos con y sin daño por heladas.

Daño	Variedad	Peso, g	Índice de color	CSS, %
Categoría I	Navel Barnfield	193,3 ^b	8,46 ^a	11,4 ^a
Categoría II	Lane Late	185,1 ^{ab}	8,46 ^a	11,2 ^a
Sin daño	Navelate	163,1 ^a	8,12 ^a	11,2 ^a

En una columna valores con la misma letra no presentan diferencia estadística según prueba LSD, P= 95%.

Las diferencias en los valores medios del peso son atribuidas lógicamente a las tres variedades de cítricos utilizadas. Para el análisis, por tratarse de diferentes variedades, no fue un parámetro que permitió discriminar la apariencia de la fruta.

Respecto al color de la piel, no hubo efecto de las heladas en esta variable, pues el índice de color (IC) de los frutos con daño no presentó diferencias estadísticas respecto al de los frutos sanos. Este índice, de 8,46, fue bastante similar a los valores reportados por Bono *et al.* (2002), indicando

éste un color adecuado de maduración para su comercialización, según la normativa establecida para la producción integrada en cítricos y las normas de calidad de mandarinas y naranjas (Generalitat Valenciana, 2001 y 2003, respectivamente), las cuales exigen un índice mínimo de 6,5 para naranjas de media estación o tardías, como las usadas en este estudio.

El ensayo destructivo para determinar el contenido de azúcares del zumo, tampoco mostró diferencias estadísticas en esta variable entre la fruta con daño y el control. Los valores obtenidos entre el 11,2 y el 11,4% fueron también similares a los reportados por Bono *et al.* (2002) para frutos sanos de las mismas variedades aquí utilizadas. En la Tabla 5.57 se muestran imágenes típicas de la apariencia externa e interna de los frutos con y sin daño por heladas, utilizados en esta investigación.

Tabla 5.57. Apariencia externa e interna de los frutos con daño por helada y del control.

Control	Frutos con daño por helada:	
	Categoría I (leve)	Categoría II (severo)
		
		
		

Se puede apreciar en las fotografías que la apariencia externa de los frutos con daño con relación al control fue muy similar tal como se comprobó con el IC, mientras que la apariencia interna fue muy diferente. Los frutos sanos presentaron los gajos muy lisos y compactos mientras los frutos afectados por heladas presentaban pulpa con presencia de cristales de hesperidina, gajos resecos, desuniformes, con el mesocarpio descolorido y con abundantes oquedades en la fruta con daño severo. A pesar de esta alteración física el contenido de azúcares no fue afectado aunque el sabor de la fruta con daño fue más insípido que el sabor de los frutos testigos, posiblemente debido a diferente redistribución de los azúcares.

De los resultados de detección del daño por heladas, mostrados en la Tabla 5.51, y la ausencia de diferencias estadísticas en propiedades como el color de la epidermis y el contenido de azúcares del zumo, de fruta sana y fruta afectada por heladas (Tabla 5.56), se demuestra con esta investigación el enorme potencial que presenta el uso de la tecnología de RMI de bajo campo magnético y el procesamiento digital aquí propuesto, para detectar en cítricos este tipo de daño, a diferencia de otros trabajos en los que se han empleado equipos de RM más sofisticados.

Los resultados obtenidos en esta tesis corroboran lo planteado por Gambhir *et al.* (2005) quienes sugieren que, usando un equipo RM de baja resolución, las diferencias encontradas en el tiempo de relajación T_2 de la pulpa de naranja congelada y descongelada podrían ser usadas como método de discriminación de fruta afectada por heladas. De hecho otros trabajos en detección de daños por heladas en cítricos, reportados por Hernández *et al.* (2004 y 2005), indican que es posible la detección en línea de este defecto. A diferencia del presente trabajo, ellos utilizaron un equipo RMI de alta resolución que permitió aplicar secuencias de muy corta adquisición para reconstruir imágenes dinámicas de la fruta con daño y sin daño.

CAPÍTULO 6

PROPUESTA DE AUTOMATIZACIÓN

Considerando los objetivos de esta tesis y los resultados obtenidos durante la realización de la misma, se pretende en este capítulo sentar las bases de lo que podría ser un sistema automático de inspección integral de fruta basado en imágenes adquiridas por resonancia magnética, utilizando un equipo de baja intensidad de campo magnético. Los planteamientos que aquí se hacen, en principio, son pensados para la detección de defectos internos de calidad en melocotones y en naranjas, lo cual no imposibilita su aplicabilidad a otro tipo de frutas o incluso a productos hortícolas o a cierto tipo de alimentos procesados, cuyas dimensiones se ajusten a la bobina de RF de la máquina.

En la Figura 6.1 se esquematizan los aspectos técnicos que se deberían considerar para el sistema de inspección automático basado en un equipo RMI, como el usado en este trabajo.

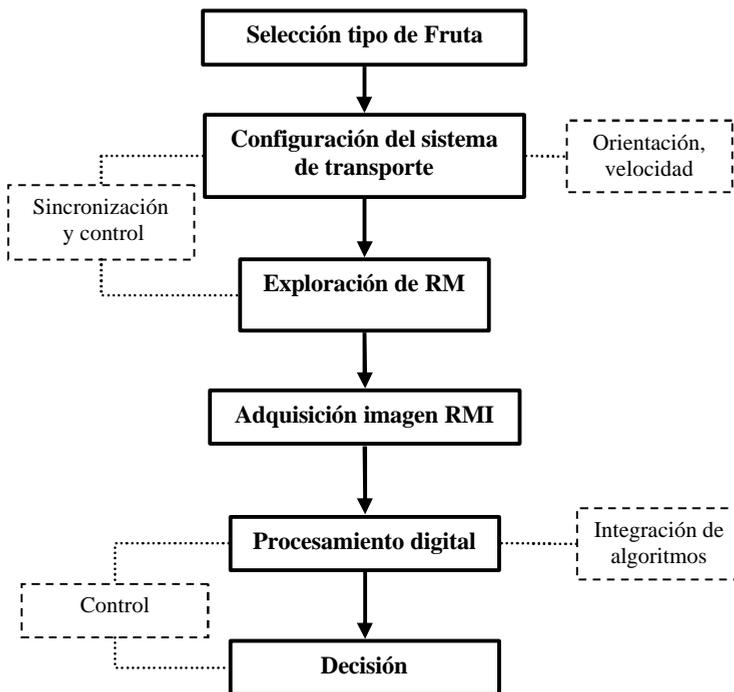


Figura 6.1. Esquema del sistema automático de inspección de fruta basado en RMI.

Selección del tipo de fruta. Para el equipo RMI de baja intensidad de campo con que cuenta actualmente el IVIA, el sistema propuesto podría inspeccionar frutas con las dimensiones máximas indicadas en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Dimensiones máximas de la fruta a explorar según la bobina* utilizada en el equipo RMI del IVIA.

Bobina de Radio Frecuencia #	Diámetro máximo de la fruta, mm	
	Ecuatorial	Longitudinal
1	120	135
2	135	180
3	120	120

* Dejando una holgura de la fruta respecto las paredes de la bobina, de 5 mm en los puntos extremos.

Configuración del sistema de transporte de la fruta al equipo RMI.

En éste se deben tener muy presentes dos aspectos técnicos; facilitar determinada orientación de la fruta y permitir ajustar su velocidad. La orientación de la fruta es un aspecto muy importante para garantizar la similitud en los planos de adquisición de las imágenes por el equipo RMI. La orientación del producto respecto a la bobina de radiofrecuencia (RF) podría hacerse según el tipo de fruta y tamaño, considerando su eje central (entre el pedúnculo y el ombligo); perpendicular o paralelo al eje central de la bobina, como se muestra en la Figura 6.2. De este modo se tienen dos orientaciones, ecuatorial y longitudinal, para realizar las exploraciones por el sistema.

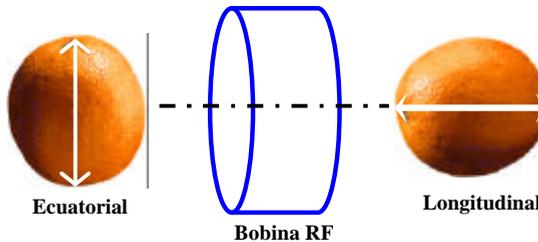


Figura 6.2. Orientaciones de la fruta respecto a la bobina de RF del equipo RMI.

Cualquiera de las dos orientaciones señaladas de la fruta son posibles de lograr, en la practica, empleando un sistema adecuado de transporte; por ejemplo, mediante cintas prefabricadas con materiales plásticos, que no

afecten la homogeneidad del campo magnético del equipo y que además permitan individualizar, alinear y distanciar las frutas unas de otras para facilitar la exploración de las mismas. Sistemas de transporte de fruta de este tipo, compatibles con equipos de RM, han sido desarrollados y publicados por Zion *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 2003; 2004 y 2005a y b, cuya experiencia y resultados podrían aprovecharse para su aplicación al sistema aquí proyectado.

Exploración de RM. Corresponde al lanzamiento de la secuencia de RM previamente programada por el operario del equipo y elegida según el tipo de fruta a examinar y el daño que se quiera inspeccionar. Para el caso particular de melocotones y naranjas, después de analizar los resultados de detección obtenidos en esta tesis, se encontró que la secuencia espín eco (SE), ponderada en T_1 , reconstruida en el plano longitudinal, y cuyos parámetros de programación se detallan en las Tablas 4.6 y 4.7; es la secuencia que se debería utilizar en el sistema propuesto. Es muy importante que el sistema permita ejecutar una correcta sincronización del movimiento de la cinta con la fruta y el lanzamiento de la secuencia de exploración, para que éste pueda determinar la localización de la fruta en la cinta, después de haber adquirido y procesado la imagen de RM. Para lograr esto, podría emplearse, como alternativa, un controlador que sincronice el ordenador del equipo RMI con el motor que regula la velocidad del sistema de transporte de la fruta.

Adquisición de la imagen RMI. Este sistema complejo y propio del equipo RMI permite, en la actualidad, reconstruir las imágenes con un tiempo mínimo de 4 segundos. Sin embargo, es probable que, con la autorización del fabricante del equipo, mediante el acceso a los programas internos de procesamiento de datos y reconstrucción de las imágenes de este sistema, se pueda más adelante disminuir este tiempo para facilitar el acondicionamiento del equipo a la inspección en línea.

Procesamiento digital. Éste es el aspecto de la propuesta de automatización en la que los resultados obtenidos en esta tesis permiten aportar mayor información y conocimiento, pues los algoritmos aquí desarrollados y evaluados exitosamente, podrían implementarse para ayudar al sistema a tomar una decisión respecto a cada fruta que sea examinada. Tanto para los melocotones como para los cítricos, por separado, existen dos alternativas de uso de los algoritmos desarrollados. Una es aplicar un algoritmo en particular para la búsqueda de un determinado daño, del cual se

presuma que podría afectar a una partida de fruta. La otra es la aplicación de un procesamiento digital que integre varios de los algoritmos desarrollados, para buscar, simultáneamente, varios de los defectos aquí estudiados. En esta opción los algoritmos de mejores resultados en detección del daño se ejecutan primero, dejando de último el algoritmo para el daño más difícil de detectar. Esta segunda opción, más completa en la inspección de la calidad integral, podría tener el riesgo de arrojar mayor descarte de fruta sana durante el proceso automático de detección. Claro está que el mejoramiento de los algoritmos aquí propuestos, en trabajos futuros disminuirían, seguramente, las falsas detecciones de fruta sana y harían más eficiente el sistema que se propone. El esquema general del procesamiento digital, que integra los algoritmos, se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 6.3.

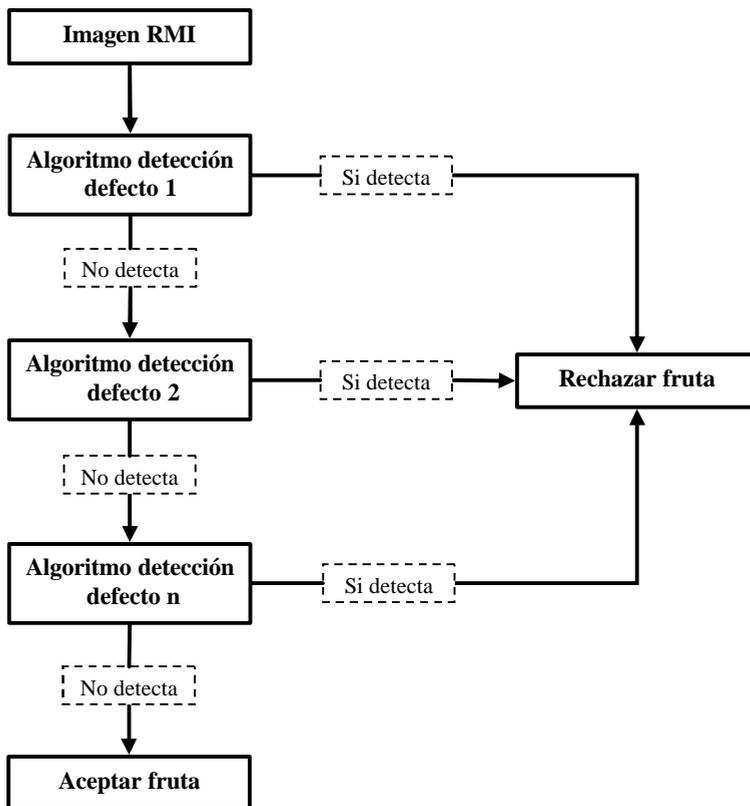


Figura 6.3. Esquema del procesamiento digital del sistema automático de detección.

En la Tabla 6.2 se presenta el orden de ejecución de los algoritmos integrados en el procesamiento digital del sistema automático propuesto, según el tipo de fruta a inspeccionar.

Tabla 6.2. Integración de algoritmos* para el procesamiento digital de las imágenes RMI según el tipo de fruta a inspeccionar.

Orden de ejecución	Tipo de daño a detectar	
	Melocotón	Naranja
Algoritmo 1	Hongo saprofito	Tres hongos**
Algoritmo 2	Daño por frío	<i>Botrytis cinerea</i>
Algoritmo 3	Picadura de mosca	<i>Alternaria citri</i>
Algoritmo 4		Helada severa
Algoritmo 5		Helada leve

*Las sentencias de cada algoritmo se indican en los Anexos A9 (melocotones) y A10 (naranjas), para imágenes RMI obtenidas con la secuencia espín eco (SE) ponderada en T_1 , plano longitudinal.

** *Diplodia natalensis*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria citri*.

Decisión. Después de analizar cada imagen de fruta, el sistema habrá identificado si ésta presenta o no cualquiera de los daños antes explicados y, por tanto, decidirá si la fruta es aceptada como sana y se queda en la cinta de transporte para continuar su procesamiento, o por el contrario la fruta esta deteriorada y debe sacarse de la cinta para dirigirse hacia otro proceso diferente. Por lo tanto y como se indica en la parte final de la Figura 6.1, el sistema que se propone deberá tener control permanente de la posición de cada fruta sobre la cinta, una vez ésta abandona la bobina del equipo. Esto con el fin de que el sistema ordene accionar algún dispositivo electro-mecánico, por ejemplo, para que permita permanecer o retirar de la línea, la fruta que se requiera.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Aunque son numerosas las investigaciones publicadas en la literatura científica sobre la aplicación de la tecnología de resonancia magnética para estudiar la calidad interna de las frutas, son relativamente pocos los trabajos orientados hacia el desarrollo de sistemas que utilicen magnetos de baja intensidad de campo, y es en esta línea de investigación en la que se podrían obtener equipos de RM, más económicos.

Las amplias diferencias en la intensidad de señal que emiten los protones contenidos en pequeños volúmenes (6 mm^3) de los tejidos del mesocarpio, respecto a los tejidos del endocarpio y de la semilla, permitieron diferenciar claramente estas estructuras en las imágenes de melocotón adquiridas por resonancia magnética. Para ello, se aplicó una secuencia espín eco ponderada en el tiempo de relajación T_1 . Este tipo de secuencia también permitió distinguir las diferentes estructuras internas de naranjas, con una resolución de 7 mm^3 .

Así pues, es factible emplear la misma secuencia RM para reconstruir, con alta calidad, una imagen del interior de dos frutas tan diferentes, como el melocotón y la naranja. Sin embargo, considerando la variación de la composición morfológica y química que presentan estos materiales biológicos, éste trabajo demuestra que es preferible la aplicación de secuencias específicas para encontrar distintos tipos de defectos.

En melocotones, la secuencia espín eco en T_1 , con los siguientes parámetros; T_E de 18 ms, T_R de 170 ms, N_{ex} 4, espesor del corte de 5 ó 10 mm, matriz de 192×192 y FOV de $200 \times 200 \text{ mm}^2$, permitió observar durante el almacenamiento la evolución del daño interno ocasionado por *Ceratitis capitata* antes de éste hacerse evidente externamente. Así mismo, sirvió para distinguir, aunque con muy poco contraste, el mesocarpio afectado por el hongo *Penicillium digitatum* después de 20 horas de haber sido inoculado en el interior del fruto y 72 horas antes de poder observar externamente la podredumbre. También permitió determinar, en frutos almacenados a 1°C por más de 2 días, una disminución significativa en el contraste entre la pulpa y la semilla. Finalmente, permitió visualizar, en frutos sometidos a temperatura de congelamiento de -10°C , la cristalización del agua, que ocurre desde el interior del hueso hacia la parte externa de la pulpa.

Las diferencias de contraste obtenidas, mayores de 20 niveles de gris, entre el mesocarpio sano y el mesocarpio afectado por *Ceratitis capitata* y por *Penicillium digitatum*, indican la posibilidad de detectar automáticamente estos defectos a partir de imágenes RMI reconstruidas con un equipo de baja resolución.

El mayor contraste en T_1 entre las regiones de la pulpa y el hueso de melocotones almacenados a temperatura de congelamiento, comparado con el menor contraste obtenido a temperatura normal de almacenamiento, es un resultado muy importante que indica la posibilidad de detectar automáticamente el daño por congelamiento. Igualmente, las diferencias entre niveles de gris que presentaron la pulpa y la semilla, o que presentaron el hueso y la semilla, podrían servir para detectar los daños por congelamiento en melocotones.

Los algoritmos supervisados de procesamiento digital de imágenes RMI desarrollados en esta tesis, basados en la búsqueda de umbrales para la segmentación de contornos, permiten detectar los daños internos, invisibles exteriormente, con diferentes porcentajes de eficacia según el tipo de fruta, la clase de deterioro, el contraste utilizado y el plano de exploración usado para la reconstrucción cada imagen.

En melocotones, el daño producido por la picadura de la mosca *Ceratitis capitata* resultó ser el más difícil de detectar, debido a la generalizada variación de contraste de las regiones picadas con respecto a la pulpa. Para obtener mejores resultados de detección, se requieren herramientas y conocimientos de análisis de imagen más sofisticados.

En melocotones, los algoritmos desarrollados consiguieron el mejor desempeño en la detección de los daños ocasionados por un hongo saprofito y por frío, detectando correctamente el 98,5% de fruta con daño, a costa de considerar erróneamente, un 21,5% de fruta sana como producto con daño.

Durante el seguimiento con RMI del deterioro por frío de los melocotones, el algoritmo desarrollado detectó el 98% de la fruta con daño, desde el mismo día en que éste se presentó y con dos días de antelación a la detección realizada por los métodos destructivos de valoración de la firmeza y el color de la pulpa del fruto.

Respecto a las naranjas, los tejidos internos de la pulpa, de la columela y del albedo, afectados por la acción invasiva de los hongos *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea* y *Diplodia natalensis*, fueron claramente visualizados como manchas de menor intensidad de brillo en imágenes obtenidas con secuencias eco espín ponderadas en T_1 y en T_2 . En las imágenes reconstruidas en el plano ecuatorial, se observó que el daño se localizó en la zona de la columela y se extendió radialmente por los tabiques de los gajos, mientras que en el plano longitudinal, la podredumbre se observó en parte de la columela y en el albedo más próximo al eje estilar del fruto. La detección automática y anticipada del deterioro causado por los hongos se realizó en más del 80% de los frutos afectados y se llevó a cabo entre 2 y 7 días antes de aparecer síntomas exteriores de podredumbre.

Las imágenes ponderadas en T_1 , adquiridas con las secuencias espín eco y gradiente eco permitieron también visualizar dos categorías diferentes de daño por heladas. El daño leve se observó en las imágenes como regiones oscuras correspondientes a gajos secos y deshidratados, y el daño severo se visualizó como regiones más grandes de píxeles oscuros que correspondieron a quemaduras dentro del mesocarpio de la fruta.

Los algoritmos desarrollados para detectar daños por heladas presentaron, en promedio, los desempeños más altos. La sintomatología exhibida por los tejidos de los gajos de pulpa, facilitó particularmente su detección automática, permitiendo incluso aplicar una secuencia de reconstrucción, de pobre calidad, con el menor tiempo de adquisición que el equipo permite. Por tanto, este defecto, invisible exteriormente, podría ser entonces fácilmente detectado por un sistema de inspección basado en imágenes RMI obtenidas con un equipo de bajo campo magnético y de inferior resolución.

Los resultados obtenidos en esta tesis ponen de manifiesto, para el caso específico de los frutales de hueso y para los frutos cítricos, la gran utilidad del análisis de imágenes por resonancia magnética RMI para la realización de estudios no destructivos sobre los cambios de la estructura interna de éstos, cuando se requiera someterlos a diferentes condiciones de almacenamiento, o cuando se requiera investigar el efecto interno que puede producir en los frutos la aplicación de diferentes tratamientos poscosecha o la influencia en la fruta de factores fisiológicos o ambientales en el campo. Las aplicaciones de ésta tecnología pueden servir también a otros investigadores como biólogos,

fisiólogos, fitopatólogos y entomólogos, entre otros, para realizar estudios en vivo, de manera no invasiva y como un complemento a otros métodos convencionales de análisis de muestras.

Un sistema automático de inspección de calidad integral de fruta basado en imágenes RMI, obtenidas con un equipo de baja intensidad de campo magnético, deberá considerar los siguientes aspectos técnicos; selección adecuada del tamaño de la frutas, configuración del transporte de la fruta al equipo RMI considerando orientación y velocidad del producto, elección precisa de la secuencia de exploración y sincronización de la misma con el movimiento de la fruta, adquisición de la imagen RMI, procesamiento digital de cada imagen mediante implementación e integración de los algoritmos aquí desarrollados, y finalmente, decisión por parte del sistema sobre la aceptación o el rechazo de la fruta según la detección realizada durante el análisis de imagen. De este modo, la tecnología de RMI y el procesamiento de imagen aplicados en la inspección de frutas podrían utilizarse para el control de calidad interno no destructivo, evitando la salida y exportación de producto deteriorado con este tipo de daños. Sin embargo, no debemos olvidar que aun quedan muchos interrogantes por resolver y por esto los resultados obtenidos en esta tesis constituyen tan solo un primer paso en ese camino.

CAPÍTULO 8

**SUGERENCIAS PARA FUTUROS
TRABAJOS**

En este capítulo se presentan algunas propuestas de las líneas de trabajo que podrían desarrollarse en el futuro cercano, como continuación de la investigación iniciada en esta tesis, utilizando un equipo RMI de baja intensidad de campo magnético, para el desarrollo del sistema automático de inspección de calidad integral de fruta propuesto anteriormente y basado en esta interesante y muy promisorio tecnología.

Es muy importante realizar un estudio de los tiempos de relajación T_1 y T_2 de los diferentes tejidos internos que aparecen en el plano central de la imagen de resonancia magnética del melocotón y de la naranja, adquirida con un equipo RMI de baja intensidad de campo. Tomando regiones de interés en cada tejido, incluyendo aquellos con algún tipo de daño, es posible determinar, mediante métodos de regresión no lineal, a partir de las ecuaciones de intensidad de señal (2.46 a 2.51), y según el tipo de secuencia de exploración que se aplique; los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2) de cada tejido, con el propósito de ajustar los parámetros de programación de la secuencia para obtener nuevas imágenes RMI con mejores contrastes de los tejidos afectados. Esto facilitaría el posterior procesamiento digital de imagen y la correcta detección del defecto en la fruta.

Resulta muy interesante investigar, incluso, si idénticos tejidos de diferentes variedades de una fruta, tratados bajo las mismas condiciones, presentan tiempos de relajación T_1 y T_2 similares o diferentes. Es muy importante conocer esto con el fin de establecer si, por ejemplo, una naranja Valencia puede ser explorada con la misma secuencia que una naranja Powell, para obtener resultados similares.

Para mejorar los resultados de detección de daño por picadura de *Ceratitis capitata* en melocotón se sugiere desarrollar un algoritmo basado en la aplicación de umbrales automáticos y adaptativos. Este procedimiento permitiría segmentar cada región de píxeles con picadura de mosca con condiciones de contraste particulares dentro de la imagen. Otra alternativa que se recomienda es explorar el análisis de perfiles de intensidad de señal a lo largo de líneas curvas interiores, paralelas a la periferia de la epidermis del melocotón, en busca de contrastes bruscos de señal. También se sugiere abundar en la detección de daños producidos por *Ceratitis capitata* en cítricos.

Con la base de datos de más de 3000 imágenes RMI obtenidas en esta tesis, se recomienda trabajar en el desarrollo y puesta a punto de un algoritmo no supervisado que sea capaz, al analizar cada imagen, de identificar el tipo de fruta, la clasifique por tamaño, determine si esta presenta o no algún tipo de daño y la etiquete según el tipo de daño encontrado. Este trabajo permitiría avanzar más en el camino hacia el desarrollo de un sistema de inspección integral de calidad basado en imágenes RMI.

Se propone investigar en la disminución de los tiempos de adquisición de imagen que el equipo RMI utilizado en esta tesis actualmente permite, mediante el acceso a los programas de adquisición y procesamiento de datos y reconstrucción de las imágenes del sistema, para analizar su viabilidad de operación con reducidos tiempos de reconstrucción que se adapten a una posible inspección en línea. Se recomienda que este trabajo se haga en colaboración con la empresa fabricante del equipo.

Otra importante línea de trabajo sería el desarrollo de un sistema de transporte de la fruta por el interior del equipo RMI, que sea compatible con los requerimientos técnicos del mismo respecto a: dimensiones, empleo de materiales no ferromagnéticos, velocidad, sincronización con la adquisición de la imagen, etc.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. A. Abbott, Technologies for Nondestructive quality evaluation of fruits and vegetables. En: Horticultural Reviews (J. Janick, Editor), vol. 20, pp. 1-120, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1997.
- [2] S. Ablett, "Overview of NMR applications in food science", Trends in Food Science & Technology, vol. 3, pp. 246-248, 1992.
- [3] M. Alcañiz; V. Grau; M. C. Juan; C. Monserrat; J. M. Navarro y E. Moltó, *Procesamiento digital de imagen*. Servicio de publicaciones UPV, 1999.
- [4] A. Allende; M. Desmet; E. Vanstreels; B. E. Verlinden and B. M. Nicolai, "Micromechanical and geometrical properties of tomato skin related to differences in puncture injury susceptibility", Postharvest Biology and Technology, vol. 34, pp. 131-141, 2004.
- [5] J. E. Andaur; A. R. Guesalaga; E. E. Agosin; M. W. Guarini and P. Irarrazaval, "Magnetic resonance imaging for nondestructive analysis of wine grapes", Journal of agricultural and food chemistry, vol. 52, pp. 165-170, 2004.
- [6] M. L. Badenes; D. J. Werner; J. Martínez and G. Llacer, "A description of peach native populations from Spain", Fruit Varieties Journal, vol. 52, pp. 80-86, 1998.
- [7] P. Barreiro; J. Ruiz-Cabello; M. E. Fernández-Valle; C. Ortiz and M. Ruiz-Altisent, "Mealiness assessment in apples using MRI techniques", Magnetic Resonance Imaging, vol. 17, pp. 275-281, 1999.
- [8] P. Barreiro; C. Ortiz; M. Ruiz-Altisent; J. Ruiz-Cabello; M. E. Fernández-Valle; I. Recasens and M. Asensio, "Mealiness assessment in apples and peaches using MRI techniques", Magnetic Resonance Imaging, vol. 18, pp. 1175-1181, 2000.
- [9] P. Barreiro; A. Moya; E. Correa; M. Ruiz-Altisent; M. Fernández and E. Peirs, "Prospects for the rapid detection of mealiness in apples by nondestructive NMR relaxometry", Appl Magn Reson., Vol. 22, pp. 387-400, 2002.
- [10] V. Bellon; S. I. Cho; G. W. Krutz and A. Davenel, "Ripeness sensor development based on Nuclear Magnetic Resonance", Food Control, pp. 45-48, jan 1992.
- [11] J. Blasco; E. Moltó and M. C. Alamar, "Detection of seeds in mandarins using Magnetic Resonance Imaging", in 6th International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science. P-47. INA P-G, Paris, Francia, 4-6 sep 2002.
- [12] R. Bono; J. Soler y A. Buj, "Nuevas variedades de cítricos", Levante Agrícola, número 362, pp. 273-280, 2002.
- [13] G. E. Brown, "Alternaria stem-end rot", Document PP135, Plant Pathology Department, Florida Cooperative extensión service, Intitute of food and agricultural science, University of Florida, june 1994.

- [14] G. E. Brown, "Diplodia stem-end rot", Document PP131, Plant Pathology Department, Florida Cooperative extension service, Intitute of food and agricultural science, University of Florida, june 1994.
- [15] G. E. Brown and J. W. Eckert, *Diplodia stem-end rot, in Compendium of Citrus Disease*, 2nd Edition. L. W. Timmer, S. M. Garnsey and J. H. Graham, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul. 2000.
- [16] M. Budiman; R. L. Stroshine; O. H. Campanella; P. Cornillon and S. S. Nielsen, "Modeling of low-field proton magnetic resonance T₂ decay curves for the purpose of moisture and fat content measurement of cheese analog", in ASAE Annual Meeting, Sacramento-California, USA, July-Aug 2001, Paper 01-6127.
- [17] J. Burdon and C. Clark, "Effect of postharvest water loss on 'Hayward' kiwifruit water status", *Postharvest Biology and Technology*, vol. 22, pp. 215–225, 2001.
- [18] P. T. Callaghan; J. C. Clark and L. C. Forde, "Use of static and dynamic NMR microscopy to investigate the origins of contrast in images of biological tissues", *Biophysical Chemistry*, vol. 50, issues 1-2, pp. 225-235, 1994.
- [19] G. Carmona, "Rol de la temperatura en el almacenamiento de productos frescos", *Guia Técnica Poscosecha N°5*, Area poscosecha, Dirección calidad agrícola, Consejo Nacional de Producción, San José, Costa Rica, Diciembre de 2001.
- [20] M. Castiñeira, "La RMN de pulsos en industrias agroalimentarias. II. Aplicaciones", *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, vol. 29, pp. 449-468, 1989.
- [21] W. Chayaprasert and R. Stroshine, "Rapid sensing of internal browning in whole apples using a low-cost, low-field proton magnetic resonance sensor", *Postharvest Biology and Technology*, vol. 36, pp. 291-301, 2005.
- [22] P. Chen; M. J. McCarthy and R. Kauten, "NMR for internal quality evaluation of fruits and vegetables", *Transactions of the ASAE*, vol 32, pp. 1747-1753, 1989.
- [23] P. Chen and Z. Sun, "A review of non-destructive methods for quality evaluation and sorting of agricultural products," *J. Agric. Engineering Res.*, vol. 49, pp. 85-98, 1991.
- [24] P. Chen; M. J. McCarthy; R. Kauten; Y. Saring and S. Han, "Maturity evaluation of avocados by NMR methods", *Journal of Agricultural Engineering Research*, vol. 55, pp. 177-187, 1993.
- [25] P. Chen; M. J. McCarthy; S. M. Kim and B. Zion, "Development of a high-speed NMR techique for sensing maturity of avocados", *Transactions of the ASAE*, vol. 39, pp. 2205-2209, 1996.

- [26] P. Chen; Y. Tjan and M. Ruiz-Altisent, "A low-mass impact sensor for high-speed firmness sensing of fruits", Department of Biological and Agricultural Engineering, University of California Davis, California, USA, 1999.
- [27] P. Chen, "Application of elastic theory to high-speed impact sensing of fruits", Department of Biological and Agricultural Engineering, University of California Davis, California, USA, 2001.
- [28] Y. R. Chen; K. Chao and M. S. Kim, "Machine vision technology for agricultural applications", Computers and Electronics in Agriculture, vol. 36, pp. 173-191, 2002.
- [29] S. I. Cho; G. W. Krutz; H. G. Gibson and K. Haghighi, "Magnet console design of an NMR-based sensor to detect ripeness of fruit", Transaction of the ASAE, vol. 33, pp. 1043-1050, 1990.
- [30] S. I. Cho; G. W. Krutz; R. L. Stroshine and W. K. Wai, "Expert system for water peak suppression in pulsed proton magnetic resonance", in ASAE International Winter Meeting 1991, Chicago, Illinois-USA, December 17-21, 1991a.
- [31] S. I. Cho; W. K. Wai; G. W. Krutz and R. L. Stroshine, "Prototipe of non-destructive fruit sweetness sensor", in ASAE International winter Meeting 1991, Chicago, Illinois-USA, December 17-21, 1991b.
- [32] S. I. Cho; V. Bellon; T. M. Eads; R. L. Stroshine and G. W. Krutz, "Sugar content measurement in fruit tissue using water peak suppression in high resolution 1-H Magnetic Resonance", Journal of Food Science, vol. 56, pp. 1091-1094, 1991c.
- [33] S. I. Cho; R. L. Stroshine; I. C. Baianu and G. W. Krutz, "Nondestructive sugar content measurements of intact fruit using spin-spin relaxation time (T_2) measurements by pulsed 1-H Magnetic Resonance", Transactions of the ASAE, vol. 36, pp. 1217-1221, 1993.
- [34] C. J. Clark and S. K. Forbes, "Nuclear magnetic resonance imaging of the development of chilling injury in 'Fuyu' permision (*Diospyros kaki*)", New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, vol. 22, pp. 209-215, 1994.
- [35] C. J. Clark and J. S. MacFall, "Magnetic resonance imaging of persimmon fruit (*Diospyros kaki*) during storage at low temperature and under modified atmosphere", Postharvest Biology and Technology, vol. 9, issue 1, pp. 97-108, 1996.
- [36] C. J. Clark; P. D. Hockings; D. C. Joyce and R. A. Mazucco, "Application of magnetic resonance imaging to pre-and post-harvest studies of fruits and vegetables", Postharvest Biology and Technology, vol. 11, pp. 1-21, 1997.
- [37] C. J. Clark and D. M. Burmeister, "Magnetic Resonance Imaging of browning development in 'Braeburn' apple during contolled-atmosphere storage under high CO_2 ", HortScience, vol. 34, pp. 915-919, 1999.

- [38] C. J. Clark; A. C. Richardson and K. B. Marsh, “Quantitative magnetic resonance imaging of satsuma mandarin fruit during growth”, *HortScience* vol. 34, pp. 1071-1075, 1999.
- [39] C. J. Clark and J. S. MacFall, “Quantitative magnetic resonance imaging of ‘Fuyu’ persimmon fruit during development and ripening”, *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 2, pp. 679–685, 2003.
- [40] R. Conlan, *A live-saving window of the mind and body: the development of magnetic resonance imaging MRI. Beyond Discovery™*. National Academy of Sciences, 2001.
- [41] C. H. Crisosto; F. Gordon and Z. Ju, “Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California”, *HortScience*, vol. 34, pp. 1116-1118, 1999.
- [42] C. H. Crisosto; D. Garner and G. M. Crisosto, “Stone fruit internal breakdown evaluation”, Department of Pomology, University of California, Davis, 2003.
- [43] A. Desgrez; J. Bittoun and I. Idy-Peretti, *Cuadernos de IRM. Las Bases físicas de la IRM*. Masson, S.A., 1991.
- [44] S. L. Duce; T. A. Carpenter and L. D. Hall, “Nuclear magnetic resonante imaging of fresh and frozen courgettes, *Journal of Food Engineering*, vol. 16, pp. 165-172, 1992.
- [45] J. C. Edwards, *Principles of NMR*, Process NMR Associates LLC, 87A Sand Pit Rd, Danbury CT 06810, 2003 (electronic book in internet).
- [46] ESAOTEBIOMEDICA MRI Division, ARTOSCAN user manual information nr. 2/96. ESAOTE S.P.A. Genoa, Italy, January, 1996.
- [47] C. A. Eustace and R. B. Jordan, “Sugar content evaluation using earth’s field proton magnetic resonance”, *Transactions of the ASAE*, vol. 38, pp. 1563-1571, 1995.
- [48] M. Faust; P. C. Wang and J. Maas, The use of magnetic resonance imaging in plant science. En: *Horticultural Reviews* (J. Janick, Editor), vol. 20, pp. 225-266, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1997.
- [49] J. P. Fernández; A. Cano and F. Artés, “Physiological changes in peach related to chilling injury and ripening”, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 13, pp. 109-119, 1998.
- [50] A. Ferrer; S. Remón y R. Oria, “Mantenimiento de la calidad del melocotón”, *Fruticultura Profesional*, número 117, pp. 47-52, 2001.
- [51] G. D. Fullerton, “Basic concepts for NMR imaging”, *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 1, pp. 39-53, 1982.

- [52] G. Galed; M.E. Fernández; A. Martínez and A. Heras, “Application of MRI to monitor the process of ripening and decay in citrus treated with chitosan solutions”, *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 22, pp. 127-137, 2004.
- [53] P. N. Gambhir; Y. J. Choi; D. C. Slaughter; J. F. Thompson and M. J. McCarthy, “Proton spin-spin relaxation time of peel and flesh of navel orange varieties exposed to freezing temperature”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 85, pp. 2482-2486, 2005.
- [54] G. R. Gamble, “Non-invasive determination of freezing effects in blueberry fruit tissue by Magnetic Resonance Imaging”, *Journal of Food Science*, vol. 59, pp. 571-610, 1994.
- [55] F. Garcia y F. Ferragut, *Las plagas agrícolas*, Ed. Phytoma, Valencia, 2002.
- [56] Generalitat Valenciana, “Normas de Producción Integrada de Cítricos de la Comunidad Valenciana”, DOGV 3909, 1-3, 2001.
- [57] Generalitat Valenciana, Normas de calidad de mandarinas y naranjas. Reglamento CEE nº1799/2001, y modificaciones 2010/2002 y 2173/2003. 2003.
- [58] M. Glidewell; B. Williamson; B. A. Goodman; J. A. Chudek and G. Hunter, “An NMR microscopic study of grape (*Vitis vinifera* L.)”, *Protoplasma*, vol. 198, pp. 27-35, 1997.
- [59] M. Glidewell; B. Williamson; G. H. Duncan; J. A. Chudek and G. Hunter, “Transparent plants: an NMR case-study of blackcurrants”, *New Phytologist*, vol. 141, pp. 85-91, 1999.
- [60] J. J. Gonzalez; R. C. Valle; S. Bobroff; W. V. Biasi; E. J. Mitcham and M. J. McCarthy, “Detection and monitoring of internal browning development in “Fuji” apples using MRI”, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 22, pp. 179-188, 2001.
- [61] B. A. Goodman; B. Williamson and J. A. Chudek, “Non-invasive observation of the development of fungal infection in fruit”, *Protoplasma*, vol. 166, pp. 107-109, 1992.
- [62] B. A. Goodman; B. Williamson and J. A. Chudek, “Identification of the distribution of sugar in grapes using chemical shift selective NMR microscopy”, *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 11, pp. 1039-1041, 1993.
- [63] B. A. Goodman; B. Williamson; E. J. Simpson; J. A. Chudek; G. Hunter and A. M. Prior, “High field NMR microscopic imaging of cultivated strawberry fruit”, *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 14, issue 2, pp. 187-196, 1996.
- [64] G. Guzmán; A. Escriche; F. Artés; J. G. Marín y J. J. Sanchez, “Estudio de la post-recolección de melocotón”, *Fruticultura Profesional*, número 46, pp. 89-91, 1992.

- [65] B. E. Hammer, "Industrial applications of nuclear magnetic resonance," *Sensor Review*, vol. 18, pp. 245-251, 1998.
- [66] N. Hernández; P. Barreiro; M. Ruiz-Altisent; J. Ruiz and M. E. Fernández, "Detection of freeze injury in oranges by Magnetic Resonance Imaging of moving samples", *Appl. Magn. Reson.*, vol. 26, pp. 431-445, 2004.
- [67] N. Hernández; P. Barreiro; M. Ruiz-Altisent; J. Ruiz and M. E. Fernández, "Detection of seeds in citrus using MRI under motion conditions and improvement with motion correction", *Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering)*, vol. 26B, pp. 81-92, 2005a.
- [68] N. Hernández; P. Barreiro; M. Ruiz-Altisent; J. Ruiz; M. E. Fernández; X. Gimeno y S. Aguilar, "Viabilidad de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear para la determinación en línea de calidad interna de frutas", en *II Congreso Nacional de Agroingeniería*, Universidad de Córdoba, Córdoba, España, 24-27 sep 2003.
- [69] N. Hernández; B. Hills; N. Marigheto and P. Barreiro, "Microscopic and Macroscopic identification of internal breakdown in pears with NMR relaxometry and on-line MRI", in *FRUTIC 05, Information and Technology for Sustainable Fruit and Vegetable Production*, Montpellier, France, 12-16 September 2005b.
- [70] B. Herold; I. Truppel; M. Zude and M. Geyer, "Portable sensor equipment for fruit maturity monitoring in apple orchard", in *FRUTIC 05, Information and Technology for Sustainable Fruit and Vegetable Production*, Montpellier, France, 12-16 September 2005.
- [71] B. Hills and B. Remigereau, "NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing" *Internacional Journal of Food Science and Technology*, vol. 32, pp. 51-61, 1997.
- [72] B. Hills, *Magnetic Resonance Imaging in Food Science*. John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- [73] B. Hills and C. J. Clark, "Quality Assessment of Horticultural Products by NMR" *Annual rep. NMR Spectrosc.*, vol. 50, pp. 75-120, 2003.
- [74] W. S. Hinshaw; P. A. Bottomley; G. N. Holland, "Radiographic thin-section image of the human wrist by nuclear magnetic resonance", *Nature*, vol. 270, pp. 722-723, 1977.
- [75] J. P. Hornak, *The basics of MRI*, Software License © ,1996-2002 J.P. Hornak.
- [76] G. J. Hulbert; J. B. Litchfield and S. J. Schmidt, "Temperature mapping in carrot using T_1 weighted Magnetic Resonance Imaging", *Journal of Food Science*, vol. 60, pp. 780-785, 1995.

- [77] Institut National Agronomique Paris-Grignon, 6th International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science. INA P-G, Paris, Francia, 4-6 september 2002.
- [78] N. Ishida; M. Koizumi and H. Kano, "Ontogenetic changes in water in cherry tomato fruits measured by nuclear magnetic resonance imaging", *Scientia Horticulturae*, vol. 57, pp. 335-346, 1994.
- [79] N. Ishida; H. Ogawa and H. Kano, "Diffusion of cell-associated water in ripening barley seeds", *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 13, issue 5, pp. 745-751, 1995.
- [80] N. Ishida; H. Ogawa; M. Koizumi and H. Kano, "Ontogenetic changes of the water status and accumulated soluble compounds in growing cherry fruits studied by NMR imaging", *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 35, s22-s28, 1997.
- [81] N. Ishida; M. Koizumi; H. Ogawa and H. Kano, "Micro-MRI in food science", *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, vol. 47, pp. 407-423, 2000.
- [82] N. Ishida; M. Koizumi and H. Kano, "The NMR Microscope: a Unique and promising tool for plant science", *Annals of Botany*, vol. 86, pp. 259-278, 2000.
- [83] N. R. Jagannathan; V. Govindaraju and P. Raghunathan, "In vivo magnetic resonance study of the histochemistry of coconut (*Cocos nucifera*)", *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 13, issue 6, pp. 885-892, 1995.
- [84] K. H. Jung; R. Stroshine; P. Cornillon and P. M. Hirts, "Low field proton magnetic resonante sensing of water core and internal browning in whole apples", *American Society of Agricultural Engineering*, Paper 98-6020, 1998.
- [85] B. Kastter; D. Vetter and A Gangi, *Principios de RMN, manual de autoaprendizaje*. Masson S. A., 1997.
- [86] K.M. Keener; R. L. Stroshine; J.A. Nyenhuis and M. T. Morgan, "Proton magnetic resonante measurement of self-diffusion coefficient of water in sucrose solutions, citric acid solutions, fruit jueces, and apple tissue", *American Society of Agricultural Engineering*, Paper 96-6063, 1996.
- [87] K.M. Keener; R. L. Stroshine and J.A. Nyenhuis, "Evaluation of low field (5.40-MHz) proton magnetic resonance measurements of D_w and T_2 as methods of nondestructive quality evaluation of apples", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 124, pp. 289-295, 1999.
- [88] W. L. Kerr; C. J. Clark; M. J. McCarthy and J. S. De Ropp, "Freezing effects in fruit tissue of kiwifruit observed by Magnetic Resonance Imaging", *Scientia Horticulturae*, vol. 69, pp. 169-179, 1997.

- [89] S. M. Kim; M. J. McCarthy and P. Chen, "Feasibility of tomato quality grading and sorting using magnetic resonance", American Society of Agricultural Engineering, Paper 94-6519, 1994.
- [90] S. M. Kim; M. J. McCarthy and P. Chen, "Development of real-time on-line Magnetic Resonance Sensor", AGENG Oslo 98 International Conference on Agricultural Engineering, Oslo, Norway, August 24-27, 1998.
- [91] S. M. Kim; P. Chen; M. J. McCarthy and B. Zion, "Fruit internal quality evaluation using on-line nuclear magnetic resonance sensor", J. Agric. Engng Res., vol. 74, pp. 293-301, 1999.
- [92] L. J. Knapp, *The Mediterranean Fruit Fly*. University of Florida. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. 1999.
- [93] W. Köckenberger, "Nuclear magnetic resonante micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism", Journal of Experimental Botany, vol. 56, pp. 641-652, 2001.
- [94] N. Kondo; M. Monta; V. K. Chong and K. Namba, "Defect detection on eggplant fruit by NIR-Color TV Camera", in AGENG-2004: Engineering The Future. Leuven, Belgium, 12-16 september, 2004.
- [95] G. W. Krutz *et al.*, Sensor development for food processing and control, 1992 Research Activities Report, Agricultural & Biological Engineering, Purdue University West Lafayette, 1992.
- [96] E. Kuchenbrod; A. Haase; R. Benkert; H. Schneider and U. Zimmermann, "Quantitative NMR microscopy on intact plants", Magnetic Resonance Imaging, vol. 13, issue 3, pp. 447-455, 1995.
- [97] J. Lammertyn; T. Dresselaers; P. Van Hecke; P. Jancsó; M. Wevers and B. M. Nicolai, "Analysis of the time course of core breakdown in 'Conference' pears by means of MRI and X-ray CT", Postharvest Biology and Technology, vol. 29, pp. 19-28, 2003a.
- [98] J. Lammertyn; T. Dresselaers; P. Van Hecke; P. Jancsó; M. Wevers and B. M. Nicolai, "MRI and X-ray CT study of spatial distribution of core breakdown in 'Conference' pears", Magnetic Resonance Imaging, vol. 21, pp. 805-815, 2003b.
- [99] J. Letal; D. Jirak; L. Suderlova and M. Hajek, "MRI 'texture' analysis of MR images of apples during ripening and storage", Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie-food science and technology, vol. 36, pp. 719-727, 2003.
- [100] Y. Li; R. L. Strohshine and G. W. Krutz, "Design of permanent magnet housing for a nondestructive fruit ripeness sensor", in ASAE International Winter Meeting 1992, Nashville, Tennessee-USA, dec 15-18, 1992.

- [101] Y. Li; W. K. Wai; R. L. Stroshine and G. W. Krutz, “Nondestructive sugar content sensing of intact fruit using low field and low resolution pulsed magnetic resonance”, in ASAE International Winter Meeting 1992, Nashville, Tennessee-USA, dec 15-18, 1992.
- [102] J. B. Litchfield and S. J. Schmidt, *Mapping food temperature with Magnetic Resonance Imaging*, Department of University of Illinois at Urbana-Champaign, Cooperative State Research, Education, and Extension Service, March 1998.
- [103] B. Lizar; A. Benito y A. Santos, “Decálogo para la calidad del melocotón de industria”, *Fruticultura Profesional*, número 58, pp. 36-39, 1993.
- [104] S. Lurie and C. H. Crisosto, “Chilling injury in peach and nectarine”, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 37, pp. 195-208, 2005.
- [105] G. A. Manganaris; M. Vasilakakis; G. Diamantidis and I. Mignani, “Cell wall physicochemical aspects of peach fruit related to internal breakdown symptoms”, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 39, pp. 69-74, 2006.
- [106] N. Marigheto and B. Hills, “MRI as a potencial on-line sensor of apple quality”, in *FRUTIC 05, Information and Technology for Sustainable Fruit and Vegetable Production*, Montpellier, France, 12-16 September 2005.
- [107] B. H. Mattiuz; C. I. Biscegli; José Fernando Durigan, “Aplicações da tomografia de ressonância magnética nuclear como método não-destrutivo para avaliar os efeitos de injúrias mecânicas em goiabas ‘Paluma’ e ‘Pedro sato’ ”, *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal*, vol. 24, pp. 641-643, 2002.
- [108] M.J. McCarthy, *Magnetic Resonance Imaging in Foods*. Chapman & Hall, New Cork, 1994.
- [109] M. J. McCarthy; B. Zion; P. Chen; S. Ablett; A. H. Darke and P.J. Lillford, “Diamagnetic susceptibility change in apple tissue after bruising”, *J. Sci. Food Agric.*, vol. 67, pp. 13-20, 1995.
- [110] M. J. McCarthy and K. L. McCarthy, “Applications of Magnetic Fields for Industrial Process Control With NMR,” in *International Workshop on Superconductivity and High Magnetic Fields*, Haifa, Israel, Dec 2002. <http://www.magniel.com/hmtj/conferences/highmag2000/presentations/McCarthy/ppframe.htm>
- [111] E. Moltó y J. Blasco, “Detección automática y no destructiva de semillas de mandarinas mediante resonancia magnética”, *Levante Agrícola, Especial de postcosecha*, pp. 229-235, septiembre 2003.
- [112] L. L. Morris, “Chilling injury of horticultural crops: An overview”, *HortScience*, vol. 17, pp. 161-165, 1982.

- [113] G. Morrow, *Progress In MRI Magnets*. Intermagnetics General Corporation, Latham, New York, USA, 1999.
- [114] M.T. Muñoz-Barrio and C. Merodio, "Magnetic resonance imaging: a non-destructive approach to ripening state in fruits", in *Acta Horticulturae 463: VIII International Symposium on Plant Bioregulation in Fruit Production*, 1995.
- [115] R. Nestby; I. Gribbestad and R. Bjorgum, "Magnetic resonance imaging (MRI) as a method for determination of freezing injury in strawberry crowns", *Acta-Physiologiae-Plantarum*, vol. 19, pp. 517-520, 1997.
- [116] Q. X. Ni and T. M. Eads, "Analysis by proton NMR of changes in liquid-phase and solid-phase components during ripening of banana", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, pp. 1035-1040, 1993.
- [117] J. A. Offers, *Citrus, Diseases and defects found in the marketplace*, licensed Citrus Survey & consulting Bureau, 1987.
- [118] R. S. Pearce, "Plant freezing and damage", *Annals of Botany*, vol. 87, pp. 417-424, 2001.
- [119] R. Pérez de Alejo; J. Ruiz-Cabello; M. Cortijo; I. Rodríguez; I. Echave; J. Regadera; J. Araújo; P. Avilés; P. Barreiro; D. Gargallo and M. Graña, "Computer assisted enhanced volumetric segmentation magnetic imaging data using a mixture of artificial neural networks", *Magnetic Resonance Imaging* vol. 21, pp. 901-912, 2003.
- [120] PCT - Process Control Technique, "PCT-NMR Analyzer Description", Commercial Catalogue, 2003. <http://www.pctnmr.com>.
- [121] J. A. Ray; Strohshine R. L.; G. W. Krutz and W. K. Wai, "Quality sorting of sweet cherries using magnetic resonance", in *International Summer Meeting 1993*, Spokane, Washington-USA, 20-23 June, 1993.
- [122] A. S. Robinson and G. Hooper, *Fruit flies their biology, natural enemies and control*. Elsevier, 1989.
- [123] S. Roger, *Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización*. Comité de gestión para la exportación de frutos cítricos. Valencia, 1991.
- [124] R. R. Ruan and P. L. Chen, *Water in food and biological materials, a nuclear magnetic Resonance approach*. Technomic publishing Co., Inc., 1998.
- [125] M. E. Saltveit, "Determining tomato fruit maturity with nondestructive in vivo nuclear magnetic resonante imaging", *Postharvest Biology and Technology* vol. 1, pp. 153-159, 1991.

- [126] T. Scheenen; D. Van Dusschoten; A. De Pater and H. Van As, Quantification of water transport in plants with NMR imaging, *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, pp. 1751-1759, 2000.
- [127] T. Scheenen; A. Heemskerck; A. De Pater; F. Vergeldt and H. Van As, "Functional imaging of plants: A nuclear magnetic resonance study of a cucumber plant", *Biophysical Journal*, vol. 82, pp. 481-492, 2002.
- [128] G. W. Schrader; J. B. Litchfield and S. J. Schmidt, "Magnetic Resonance Imaging applications in the food industry", *Food Technology*, december-92, pp. 77-83, 1992.
- [129] SINCLAR, catalogo comercial, Euroagro, Valencia, 2003.
- [130] O. Sipahioglu and S.A. Barringer, "Dielectric properties of vegetables and fruits as a function of temperature, ash, and moisture content", *Journal of Food Science*, vol. 68, pp. 234-239, 2003.
- [131] L. J. Skog, "Chilling injury of horticultural crops", Ministry of Agriculture and Food, Factsheet, Ontario, Canada. June 6, 1998. www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/facts/98-021.htm
- [132] L. Sonego; R. Ben-Arie; J. Raynal and J. C. Pech, "Biochemical and physical evaluation of textural characteristics of nectarines exhibiting woolly breakdown: NMR imaging, X-ray computed tomography and pectin composition", *Postharvest Biology and Technology*, vol. 5, issue 3, pp. 187-198, 1995.
- [133] H. P. Song; J. B. Litchfield and H. D. Morris, "Three-dimensional Microscopic MRI of maize kernels during drying," *J. Agric. Engineering Res.*, vol. 53, pp. 51-69, 1992.
- [134] R. L. Stroshine; S. I. Cho; W. Wai; G. W. Krutz and I. C. Baianu, "Magnetic resonance sensing of fruit firmness and ripeness", in *ASAE winter Meeting 1991*, paper 91-6565, 1991.
- [135] R. L. Stroshine; G. W. Krutz and Y. Li, "Prototype of non-destructive fruit sweetness sensor", in *AGENG'92 International Conference on Agricultural Engineering*, Uppsala, Sweden, June 3, 1992.
- [136] R. L. Stroshine; W. K. Wai; K. M. Keener and G. W. Krutz, "New developments in fruit ripeness sensing using magnetic resonance", *American Society of Agricultural Engineering*, Paper 94-6539, 1994.
- [137] R. L. Stroshine, "Non destructive measurement of fruit, vegetable, and food quality", in *1994 Research Activities Report, Agricultural & Biological Engineering*, Purdue University West Lafayette, 1999. <http://abe.www.ecn.purdue.edu>

- [138] R. L. Stroshine, "Non destructive measurement of fruit, vegetable, and food quality", in 1998-99 Research Activities Report (C. S. Dennis, Editor), Agricultural & Biological Engineering, Purdue University West Lafayette, 1999.
- [139] K. Susuki; T. Tajima; S. Takano; T. Asano and T. Hasegawa, "Nondestructive methods for identifying injury to vapor heat-treated papaya", *Journal of Food Science*, vol. 59, pp. 855-857, 875. 1994.
- [140] L. A. Terry, "Biosensors: Current state of the art", in AGENG-2004: Engineering The Future. Leuven, Belgium, 12-16 september, 2004.
- [141] The Royal Veterinary and Agricultural University, 7th International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science, The multivariate challenge. The Royal Society of Chemistry (UK), Copenhagen, Denmark, 13-15 sep 2004. <http://www.models.kvl.dk/NMRinFOOD>
- [142] A. K. Thybo; S. N. Jespersen; P. E. Lærke and H. J. Stødkilde, "Nondestructive detection of internal bruise and spraing disease symptoms in potatoes using magnetic resonance imaging" *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 22, pp. 1311-1317, 2004.
- [143] A. K Thybo; H. J. Andersen; A. H. Karlsson; S. Donstrup and H. J. Stodkilde. "Low-field NMR relaxation and NMR-imaging as tools in differentiation between potato sample and determination of dry matter content in potatoes", *Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie-food science and technology*, vol. 36, pp. 315-322, 2003.
- [144] L. W. Timmer; S. M. Garnsey and J. H. Graham, *Plagas y enfermedades de los cítricos*. Ed. Mundi prensa, 2002.
- [145] S. A. Toledo y O. Jorquera, "Corazón acuoso en manzanos", *Asesoría y proyectos agrícolas*, ECOPLAN, Chile, 2003. <http://www.ecoplant.cl>
- [146] J. J. Tuset, *Podredumbres de los frutos cítricos*. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca, 1987.
- [147] D. Unay and B. Gosselin, "A quality sorting method for 'Jonagold' apples", in AGENG-2004: Engineering The Future. Leuven, Belgium, 12-16 september, 2004.
- [148] H. Van As, *Advanced MRI*, Chapter 10: MRI and Plants. 2003.
- [149] M. G. Van Kilsdonk; K. Nicolay; J. M. Franssen and C. Köllöffel, "Bud abortion in tulip bulbs studied by magnetic resonante imaging", *Journal of experimental botany* vol. 53, pp. 1603-1611, 2002.
- [150] L. J. Von Mollendorff; O. T. De Villiers and G. Jacobs, "Effect of time of examination and ripening temperature on the degree of woolliness in nectarines", *Journal of Horticultural Science*, vol. 64, pp. 443-447, 1989.

- [151] L. J. Von Mollendorff; G. Jacobs and O. T. De Villiers, "Cold storage influences internal characteristics of nectarines during ripening", *HortScience*, vol. 27, pp. 1295-1297, 1992.
- [152] J. A. Vozzo; R. Patel and A. Terrel., "Determinación de la viabilidad de las semillas de *Juglans nigra* a través de imágenes obtenidas usando tomografía computarizada y resonancia magnética", en *II Simposio sobre avances en la producción de semillas forestales en América Latina* (R. Salazar, Editor), pp. 163-167, CATIE, Santo Domingo, Republica Dominicana; Turrialba, Costa Rica, Octubre 18-22, 1999.
- [153] W. K. Wai; R. L. Stroshine; G. W. Krutz and K. Haghighi, "FEM solenoid probe coil for a magnetic resonance fruit sweetness sensor", in *ASAE International Winter Meeting 1991*, Chicago, Illinois-USA, December 17-21, 1991.
- [154] W. K. Wai; Y. Li; R. L. Stroshine and G. W. Krutz, "Sugar content estimation in fresh vegetables and fruits using an ^1H -MR sensor", in *4th International Symposium on Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering*, Valencia-Spain, 21-27 march, 1993.
- [155] W. K. Wai; R. L. Stroshine and G. W. Krutz, "A modified Hahn echo pulse sequence for proton magnetic resonance (^1H -MR) measurement of percent soluble solids of fruits", *Transactions of the ASAE*, vol. 38, pp. 849-855, 1995.
- [156] C. Y. Wang; P. C. Wang and M. Faust, "Non-destructive detection of watercore in apple with nuclear magnetic resonance imaging", *Scientia Horticulturae*, vol. 35, pp. 227-234, 1988.
- [157] C. Y. Wang and P. C. Wang, "Nondestructive detection of core breakdown in 'Bartlett' Pears with nuclear magnetic resonance imaging", *Hortscience*, vol. 24, pp. 106-109, 1989.
- [158] C. Y. Wang and P. C. Wang, "Differences in nuclear magnetic resonance images between chilled and non-chilled zucchini squash", *Environmental and Experimental Botany*, vol. 32, issue 3, pp. 213-219, 1992.
- [159] C. Y. Wang, "Chilling and Freezing Injury", *Produce Quality and Safety Laboratory*, USDA, ARS. Henry A. Wallace Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD, 1997.
- [160] S. Wang; J. Tang; J. A. Johnson; E. Mitcham; J. D. Hansen; G. Hallman; S. R. Drake and Y. Wang, "Dielectric properties of fruits and insect pests as related to radio frequency and microwave treatments", *Biosystems Engineering*, vol. 85, pp. 201 – 212, 2003.
- [161] I. M. White and M. M. Elson-Harris, *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB, Wallingford, UK, 1992.

- [162] B. Williamson; B. A. Goodman and J. A. Chudek, "The structure of mature gooseberry (*Ribes grossularia*) fruits revealed non-invasively by NMR microscopy", *Micron*, vol. 24, issue 4, pp. 377-383, 1993.
- [163] T. Yantarasri; J. Sornsrivichai and P. Chen, "X-ray and NMR for nondestructive internal quality evaluation of durian and mangosteen fruits", in *Acta Horticulturae* 464: International Postharvest Science Conference Postharvest, 1996.
- [164] J. Zhang and M. A. Ritenour, "Biology and Control of Diplodia Stem-End Rot and Anthracnose on Early Harvested Florida Citrus", *Packinghouse Newsletter* No. 196, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, September 2002.
- [165] B. Zion; P. Chen and M. J. McCarthy, "Detection of bruises in magnetic resonance images of apples", *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 13, issue 4, pp. 289-299, 1995.
- [166] B. Zion; P. Chen and J. McCarthy, "Non destructive quality evaluation of fresh prunes by NMR spectroscopy", *J. Sci. Food Agric*, vol. 67, pp. 423-429, 1995.
- [167] B. Zion; S. M. Kim; M. J. McCarthy and P. Chen, "Detection of pit in olives under motion by Nuclear Magnetic Resonance", *J Sci. Food Agric*. Vol. 75, pp. 496-502, 1997.

ANEXOS

ANEXO A1. Reseña histórica del desarrollo de la tecnología de RM y RMI.

El camino hacia el descubrimiento de la resonancia magnética (RM) comenzó con las primeras investigaciones sobre la naturaleza del átomo. En 1897, el físico J. J. Thompson, de la Universidad de Cambridge-Inglaterra, descubrió el electrón. Durante las dos décadas siguientes, una serie de destacados físicos, entre los que se incluyen Max Planck, Ernest Rutherford, Niels Bohr, Erwin Schrodinger y Werner Heisenberg, se basaron en los trabajos de unos y otros para avanzar en el estudio de la estructura y propiedades del átomo y las partículas atómicas. Con ello, revolucionaron la física y elaboraron una teoría y un lenguaje nuevos conocidos como mecánica cuántica (Conlan, 2001).

El magnetismo del núcleo fue sugerido en la década de los años 20 por Wolfgang Pauli para explicar las estructuras hiperfinas halladas con espectrometría óptica. Gracias a los adelantos obtenidos en las técnicas radioeléctricas desde esa época hasta la segunda guerra mundial, este campo de investigación también ha sido objeto de numerosos trabajos (Desgrez *et al.*, 1991; Schrader *et al.*, 1992).

Durante la década 1930, Isidor Isaac Rabi en la Universidad de Columbia, mediante experimentación desarrolla la RM de haces moleculares, al hacer pasar un haz de moléculas de cloruro de litio a través de un campo magnético y, a continuación, someterlo a ondas de radio. Ésto permitió el descubrimiento de una propiedad denominada momento angular de espín. El desarrollo de la RM de haces moleculares como técnica de estudio de las propiedades magnéticas y la estructura interna de moléculas, átomos y núcleos le valieron a Rabi el premio Nobel de física en 1944 (Conlan, 2001).

Después de la segunda guerra mundial en Estados Unidos, dos grupos de investigación en física, uno en la Universidad de Harvard, dirigido por el Edward Purcell, y otro en la Universidad de Standford, dirigido por Felix Bloch, de forma independiente, se propusieron desarrollar un método simple para observar la RM de los núcleos de moléculas de líquidos y sólidos. En 1945, ambos grupos lograron crear, con tres semanas de diferencia, a través de experimentos con parafina y con gotas de agua contenidas en una esfera de cristal, las condiciones necesarias para observar el fenómeno en materia condensada conocido hoy día como Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esos experimentos les permitieron también compartir el premio Nóbel de física en 1952 (Desgrez *et al.*, 1991; Conlan, 2001).

A finales de la década de 1940, Henry Torrey de la Universidad de Rutgers y, de manera independiente, Erwin Hahn de la Universidad de Illinois, lograron un nuevo avance en la técnica de RMN al aplicar potentes impulsos de ondas de radio, encontrando que las señales transitorias emitidas podían medirse después de la aplicación de impulsos cortos. Luego, Hahn descubriría el fenómeno conocido como eco de espín que posteriormente resultó de gran importancia para la medición de los tiempos de relajación.

Según Conlan (2001), Nicolaas Bloembergen fue el primer investigador en medir de forma precisa los tiempos de relajación que tardan los núcleos de las muestras experimentales en volver a su alineación original (T_1) y la duración de la señal magnética obtenida de la muestra (T_2).

Bloembergen, Purcell y Pound, encontraron que la manipulación de los tiempos de relajación proporcionaría un método de gran eficacia en química y en biología para analizar la estructura de las moléculas, esto les permitió comenzar a utilizar la espectrometría de RM para investigar la composición química y la estructura física de la materia. A finales de la década de 1950, Russell Varian propuso un nuevo método de impulsos denominado RMN con transformada de Fourier. Posteriormente a finales de los 60, estudiando los espectros de RMN, Irving Lowe y Richard Norberg, descubrieron que emitiendo de forma simultánea un intervalo de radiofrecuencias a los átomos de la muestra y, a continuación, realizando el análisis de Fourier a la señal de impulso resultante, podían obtener todos los resultados del método de onda continua.

Durante el período transcurrido entre 1950 y 1970 la RM fue el método elegido por los investigadores químicos para el estudio de las estructuras moleculares. En ese tiempo las limitaciones de los equipos informáticos no permitía realizar con rapidez los análisis de los espectros. Hoy en día es posible emplear la RM para analizar muestras muy pequeñas de un material o identificar átomos poco comunes.

Ya en 1959, J. R. Singer, de la Universidad de California, había propuesto la utilización de la RMN como herramienta de diagnóstico en medicina. Pero es 1971 cuando, con el desarrollo de equipos informáticos de alta velocidad de procesamiento, con la construcción por parte de Godfrey Hounsfield del primer escáner de tomografía computerizada (instrumento que combinaba una máquina de rayos X y un ordenador), y con el empleo de algunos principios de reconstrucción algebraica para explorar organismos; ocurre el nacimiento de la técnica de obtención de imágenes por Resonancia Magnética (RMI).

En 1973, y de manera independiente, Paul Lauterbur en Estados Unidos y Peter Mansfield en Inglaterra, proponen la utilización de gradientes lineales de campo magnético para la obtención de una imagen mediante la localización espacial de la señal de RMN. Lauterbur combinó la idea del gradiente con la idea del escáner de tomografía computerizada para realizar varias proyecciones y reconstruirlas para obtener la primera imagen RMI, y Mansfield desarrolló una técnica ultrarrápida para obtener imágenes con RM conocida como ecoplanar. Para 1976, Lauterbur ya había obtenido imágenes de una serie de tallos vegetales, del muslo del cadáver de un pavo, y de un dedo humano en el cual se podían diferenciar el hueso, la medula, los nervios y las arterias (Desgrez *et al.*, 1991; Conlan, 2001). Los trabajos realizados por Lauterbur y Mansfield recibieron, en el año 2003, el premio Nóbel de medicina por su importante aporte en el desarrollo de los escáneres de cuerpo para el análisis de imágenes RMI.

A partir de la década de los años 80, las numerosas investigaciones realizadas en RM permitieron la expansión comercial de esta tecnología, contribuyendo de esta forma al desarrollo de importantes avances científicos en diversas áreas del conocimiento tales como; la física, el diagnóstico médico, los hidrocarburos, la ciencia de los materiales, la biotecnología, la bioquímica, y la industria agroalimentaria entre muchas otras. (Castiñeira, 1989; Chen y Sun, 1991; Ablett, 1992; Schrader *et al.*, 1992; McCarthy, 1994; Clark *et al.*, 1997; Hammer, 1998; Hills, 1998; Ruan y Chen, 1998; McCarthy y McCarthy, 2000; Ishida *et al.*, 2000; Van As, 2003; Hills y Clark, 2003).

ANEXO A2. Composición química y morfología del fruto maduro, en estado fresco.

Compuesto	Melocotón*	Naranja**
	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.
Agua, %	86,6	86,0
Proteínas, %	0,6	0,7
Lípidos, %	0,1	0,2
Carbohidratos, %	11,8	12,2
Ácidos y vitaminas, %	0,9	0,9

* **Drupa** de gran tamaño deriva de un ovario unicarpelar con una epidermis delgada y pilosa, un mesocarpo carnoso o fibroso y un endocarpo, vulgarmente llamado hueso o carozo, constituido por tejido esclerenquimático cuyo interior contiene la semilla (Figura A2-a).

** **Hesperidio** o baya modificada característica del género *Citrus*, consta de exocarpo o epicarpo (flavedo), que es la porción coloreada y glandulosa que presenta vesículas que contienen aceites esenciales, un mesocarpo corchoso (albedo) de color blanco, y un endocarpo (pulpa o gajo) que presenta tricomas (pelos o emergencias pluricelulares) que contienen jugo. Los tabiques que separan los lóculos están formados por el endocarpo y el mesocarpo (Figura A2-b).



Figura. A2-a. Drupa de melocotón, *Prunus persica*



Figura. A2-b. Hesperidio de naranja, *Citrus sinensis*

FUENTES: <http://www.infoagro.com/frutas/frutas.asp>
http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema6/6_5cla-carnosos.htm

ANEXO A3. Caracterización de melocotones Calanda, variedad “Amarillo tardío” clon “Jesca”, utilizados en experimentos de daño por hongo saprofito y daño por frío.

Fruto #	Calibre (mm)	Peso (g)	Firmeza (kg)		CSS (%)		COLOR CIE L*a*b*		
			Cara 1	Cara 2	Cara 1	Cara 2	L*	a*	b*
1	84	304	4,5	7,0	13,1	14,7	70,22	-5,71	44,71
2	77	229	4,5	5,8	11,2	9,3	63,62	4,08	45,08
3	76	239	5,1	7,5	9,8	9,6	65,03	1,43	44,50
4	85	309	6,9	7,1	12,8	11,2	71,12	-7,89	46,56
5	75	226	4,3	4,5	14,5	12,8	69,20	1,97	49,85
6	77	248	4,4	4,2	12,4	12,2	69,55	0,88	49,11
7	81	290	5,5	4,8	12,2	12,7	68,62	-0,96	47,30
8	87	245	6,7	5,0	10,0	11,5	68,96	-3,77	44,50
9	82	255	8,6	6,0	11,8	12,0	69,02	-1,88	49,78
10	81	274	5,8	7,6	10,5	12,2	66,36	5,91	46,75
11	83	296	8,1	4,3	12,4	11,4	67,10	-3,48	48,07
12	75	225	4,1	3,9	13,4	11,8	69,97	-1,73	50,26
13	73	217	5,0	3,6	12,5	12,2	67,36	4,28	42,91
14	75	238	4,6	4,5	10,5	9,8	69,29	-5,78	43,99
15	75	223	4,4	5,7	11,3	11,6	71,47	0,86	47,72
16	76	213	5,9	6,2	12,8	12,6	70,27	-4,90	43,40
17	71	200	4,8	5,1	13,5	12,4	70,96	-1,58	50,07
18	76	267	5,1	7,0	14,6	12,8	70,59	-4,90	49,25
19	75	227	4,0	4,5	11,1	10,4	69,28	-3,83	44,44
20	77	255	6,1	4,5	14,2	12,2	70,77	-0,08	51,12
21	76	245	3,7	5,4	13,5	10,7	69,95	1,47	45,70
22	74	227	6,0	6,5	12,8	10,1	69,24	-6,68	45,15
23	70	194	5,6	6,8	10,3	9,8	69,20	-2,08	45,54
24	69	194	9,0	7,0	13,4	12,1	69,78	-4,40	43,52
25	76	245	4,2	5,8	10,5	9,8	70,92	-6,40	45,51
26	74	218	5,8	11,5	5,9	10,5	69,57	-7,23	46,06
27	78	255	5,7	7,0	13,5	12,6	70,49	-4,45	42,71
28	73	218	5,8	14,2	6,5	13,8	70,12	-3,46	49,25
29	76	249	5,8	7,8	15,7	15,0	69,73	-2,19	51,97
30	75	228	4,6	4,2	14,2	14,1	67,82	-0,91	46,93
Promedio	76,7	241,8	5,5	6,2	12,0	11,8	69,19	-2,11	46,72
Mediana	76,0	238,5	5,3	5,8	12,5	12,1	69,56	-2,14	46,31
Varianza	18,41	915,70	1,75	4,94	4,78	2,23	3,20	12,82	6,88
Desviación típica	4,3	30,3	1,3	2,2	2,2	1,5	1,79	3,58	2,62
Mínimo	69,0	194	3,7	3,6	5,9	9,3	63,62	-7,89	42,71
Máximo	87,0	309	9	14,2	15,7	15	71,47	5,91	51,97

ANEXO A4. Método cualitativo-destructivo de evaluación del daño por frío en frutos de hueso[&].

Los síntomas del daño por frío incluyen el pardeamiento de la pulpa, el desarrollo de textura harinosa o lanosa en la pulpa, la acumulación de pigmentos rojos en la misma y el desarrollo de un mal sabor. Estos síntomas pueden medirse de la siguiente manera:

1. Pardeamiento de la pulpa. Se mide cualitativamente en una escala de 1 a 6, así: 1-sin pardeamiento, 2-muy ligero pardeamiento en la cavidad del hueso, 3-ligero pardeamiento en la cavidad del hueso y tejidos cercanos, 4-moderado pardeamiento sobre menos del 50% de la pulpa, 5-severo pardeamiento sobre el 50 al 75% de la pulpa, y 6-pardeamiento extremo cubriendo la mayoría de la pulpa (Ver Figura A4-a).

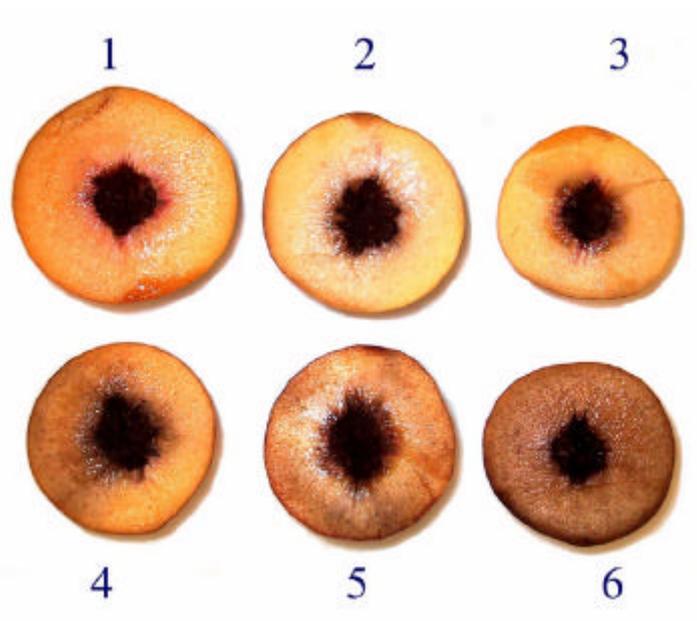


Figura A4-a Escala o índice de pardeamiento de la pulpa del melocotón afectado por daño por frío. (Fuente: Crisosto *et al.*, 2003)

[&] Propuesto por Crisosto C. H.; Garner D. y Crisosto G. M., 2003.

2. Textura de la pulpa. Se mide cualitativamente en una escala de 1 a 3, así: 1-fruto jugoso, 2- fruto moderadamente lanoso o harinoso (una pequeña cantidad de zumo se libera al exprimir la pulpa, y 3-severamente lanoso o harinoso (casi no es posible obtener zumo al exprimir la pulpa).

3. Enrojecimiento de la pulpa. Se mide cualitativamente en la escala de 1 a 3, así: 1-no hay enrojecimiento, 2-hay un moderado enrojecimiento con pigmentos rojos cubriendo menos del 50% de la pulpa, y 3-hay un severo enrojecimiento con pigmentos rojos cubriendo más del 50% de la pulpa (ver Figura A4-b).

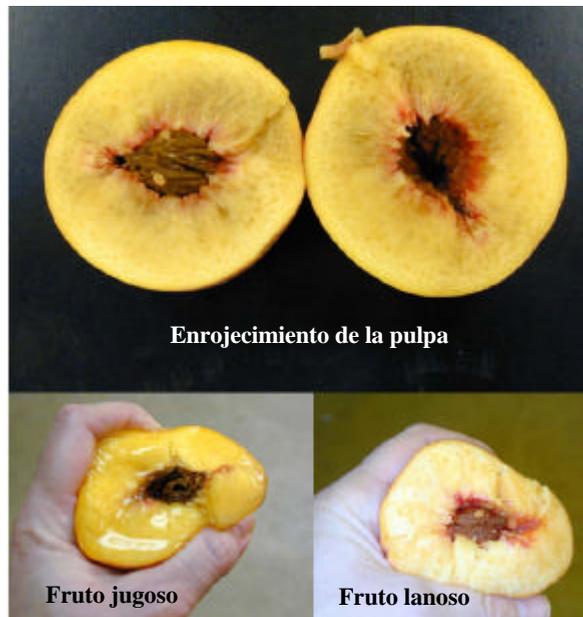


Figura A4-b. Enrojecimiento de la pulpa y medida de la textura.
(Fuente: Crisosto *et al.*, 2003)

ANEXO A5. Macro MediaROI.scr

```
//Description: calculate the mean pixel values in the current rectangular ROI (or bounding box of an irregular ROI)
// Displays result in message box.
// Returns value of mean.
```

```
Def MeanValueInROI()
{
    dMean = BlobMeanROI(1, 1);
    return (dMean);
}
```

```
//Description: calculate the mean pixel values in the current non-rectangular ROI (Object of Interest - OOI).
// Works with rectangles too - but is slower than the one above
// Displays result in message box.
// Returns value of mean
```

```
Def MeanValueInOOI()
{
    dMean = BlobMeanROI(0, 1);
    return (dMean);
}
```

```
//Description: find mean and max pixel value
// bRect - if regular rectangular ROI set to 1, else set to 0
// bMsg - to show result set to 1, else set to 0
Def BlobMeanROI(bRect, bMsg)
```

```
{
    MiscDispDlgPlayBack(0);
    DispSetUpdate(0, 0);

    B_BLOBSET=BlobNew();
    BlobSetCurDocument(B_BLOBSET);
    BlobSetRemEdge(FALSE, FALSE, FALSE, FALSE);
    BlobFeatSelect(BLOB_MAX_PIXEL, TRUE);
    BlobFeatSelect(BLOB_MEAN_PIXEL, TRUE);
    BlobResInLogWin(0);

    if (bRect)
    {
        // Tell it that all the pixels in the ROI are to be considered
        BlobSetThreshEx(0, 0);
    }
    else
    {
        // Create a mask image in the shape of the ROI
        IWidth = ROIGetSize(IMG_WIDTH);
        IHeight = ROIGetSize(IMG_HEIGHT);
        I_IMAGE15=ImgNewDisp(IWidth, IHeight, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0,
IMG_AUTOSCALE, 8);
        ImgFillROI(255);
        ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
        BlobMaskChange(BLOB_MASK_LAST_IMAGE);
    }

    BlobCount();
    dMean = BlobGetResultEx(BLOB_MEAN_PIXEL, 0, "");
}
```

```

// Report the result if desired
if (bMsg)
{
    UtilMsgBox("Mean pixel value is " + dMean);
}

// Cleanup temporary mask
if (!bRect)
    ImgClose();

BlobCloseAllRes();
BlobClose();
MiscDispDlgPlayBack(1);
DispSetUpdate(1, 0);

return (dMean);
}

Def DemoMeanValue(bShowMsg)
{
    I_BOLTS_MIM=ImgLoad(G_strPathImages + "Bolts.mim");
    ImgSetCurrent(I_BOLTS_MIM, R_Def, ALL_BANDS);
    R_BOLTS_MIM_0=ImgNewROI(87, 109, 94, 82);
    dMean = BlobMeanROI(1, bShowMsg);

    // With an elliptic ROI
    ImgSetCurrent(I_BOLTS_MIM, R_Def, ALL_BANDS);
    R_BOLTS_MIM_1=ImgNewROIEllipse(121, 332, 70, 69);
    dMean = BlobMeanROI(0, bShowMsg);

    // With an ROI based on pixel values in the image
    // using a MagicWand
    ImgSetCurrent(I_BOLTS_MIM, R_Def, ALL_BANDS);
    R_BOLTS_MIM_2=ImgNewROIMagicWand(382, 307, 1, 1, 1, 32, 32, 32);
    ImgSetCurrent(I_BOLTS_MIM, R_BOLTS_MIM_2, ALL_BANDS);
    SetMagicWandParams(1, 1, 1, 68, 68, 68);
    dMean = BlobMeanROI(0, bShowMsg);

    // Cleanup
    delete R_BOLTS_MIM_0, R_BOLTS_MIM_1, R_BOLTS_MIM_2;
}

```

ANEXO A6. Macro DesviacionROI.scr

//Description: Calcula la media y la desviación típica de los píxeles de una región ROI del
//fondo de la imagen

Def desviacionROI()

{

```
DispSetUpdate(0, 0);  
B_BLOBSET1=BlobNew();  
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET1);  
BlobSetForeground(0);  
BlobSetRemEdge(FALSE, FALSE, FALSE, FALSE);  
BlobEnableMinArea(FALSE);  
BlobFeatSelect(BLOB_SIGMA_PIXEL, TRUE);  
BlobFeatSelect(BLOB_MEAN_PIXEL, TRUE);  
BlobFeatSelect(BLOB_AREA, FALSE);  
BlobCount();
```

}

ANEXO A7. Macros para la calibración de los píxeles de las imágenes RMI a unidades reales de la fruta.

Macro: Calibracionunidadesreales1.scr

```
//Description: calibra los pixeles de imagen con FOV 160x160 matriz 192x192 a unidades reales de la fruta
//
//          En la dirección x : 1pixel=0.3125 mm
//          En la dirección y : 1pixel=0.3125 mm
// Con esta calibración no aparece la reticula en la imagen
Def calibracionunidadesreales1()
{
    // Load the image
    I_6463=ImgLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\maduros en
laboratorio\6463.tif");
    ImgSetCurrent(I_6463, R_Def, ALL_BANDS);

    // Calibrate the image
    CalSetRatio(1, 1, 0.3125, 0.3125, CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetGrid(CAL_GRID_GRID, 25, 25, 65535, CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetUnits("mm", CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetNumDecimals(1, CAL_NEW_IMAGES);

    //close the image
    ImgSetCurrent(I_6463, R_Def, ALL_BANDS);
    ImgClose();
    delete I_6463;
}
```

Macro: calibracionunidadesreales2.src

```
//Description: calibra los pixeles de imagen con FOV 200x200 matriz 192x192 a unidades reales de la fruta
//
//          En la dirección x : 1pixel=0.4000 mm
//          En la dirección y : 1pixel=0.4000 mm
Def calibracionunidadesreales2()
{
    // Load the image
    I_6463=ImgLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\maduros en
laboratorio\6463.tif");
    ImgSetCurrent(I_6463, R_Def, ALL_BANDS);

    // Calibrate the image
    CalSetRatio(1, 1, 0.4, 0.4, CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetGrid(CAL_GRID_GRID+CAL_GRID_VISIBLE, 25, 25, 65535, CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetUnits("mm", CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetNumDecimals(1, CAL_NEW_IMAGES);

    //close the image
    ImgSetCurrent(I_6463, R_Def, ALL_BANDS);
    ImgClose();
    delete I_6463;
}
```

Macro: calibracionunidadesreales3.src

```
//Description: calibra los pixeles de imagen con FOV 200x100 matriz 192x128 a unidades reales de la fruta
//
// En la direccción x : 1pixel=0.4000 mm
// En la dirección y : 1pixel=0.4000 mm
Def calibracionunidadesreales3()
{
    // Load the image
    I_6463=ImgLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\maduros en
laboratorio\6463.tif");
    ImgSetCurrent(I_6463, R_Def, ALL_BANDS);

    // Calibrate the image
    CalSetRatio(1, 1, 0.4, 0.4, CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetGrid(CAL_GRID_GRID+CAL_GRID_VISIBLE, 25, 25, 65535, CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetUnits("mm", CAL_NEW_IMAGES);
    CalSetNumDecimals(1, CAL_NEW_IMAGES);

    //close the image
    ImgSetCurrent(I_6463, R_Def, ALL_BANDS);
    ImgClose();
    delete I_6463;
}
```

ANEXO A8. Macro de auto-segmentación de imagen.

//Description: Autothreshold the current image using a function in a user DLL.

```
Def autoumbra()
{
    if (UtilGetType(UtilSI) != SI_VARTYPE_LIB)
        UtilLoadLib("UtilSI32.lbf", "UtilSI");

    IMilId=ImgGetMilID();
    if ( IMilId > 0 )
    {
        IThresh=UtilSI.GetAutoThreshold(IMilId);

        // Retrieve the image type
        nRetVal=ImgGetDepth();
        nSigned=nRetVal&SIGNED; // signed if different of 0
        nDepth=nRetVal&~SIGNED;
        if (nSigned!=0)
        {
            // Signed
            if (nDepth==8)
            {
                IMinIntensity=-128;
                IMaxIntensity=127;
            }
            else if (nDepth==16)
            {
                IMinIntensity=-32768;
                IMaxIntensity=32767;
            }
        }
        else
        {
            // Unsigned
            if ((nDepth==8) || (nDepth==24))
            {
                IMinIntensity=0;
                IMaxIntensity=255;
            }
            else if (nDepth==16)
            {
                IMinIntensity=0;
                IMaxIntensity=65535;
            }
        }
        MapClipGeneral(IThresh, NOT_USED, IMinIntensity, IMaxIntensity, NOT_USED,
LEVEL_BUFFER);
        delete IThresh;

        delete nSigned;
        delete nDepth;
        delete nRetVal;
        delete IMinIntensity;
        delete IMaxIntensity;
    }
    delete IMilId;
}
}
```

ANEXO A9. Macros de procesamiento digital de imágenes RMI de melocotones.

Macro: Daño por hongo saprofito y daño por frío, contraste en T₁, plano ecuatorial.

```
//Description:
Def hongoencampoT1corultimo()
{
DispSetUpdate(0,0);
R_9163_0=ImgNewROI(91, 65, 315, 295);
ClipCopy();
I_IMAGE1=ClipPaste();
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
FiltAverage();
I_IMAGE2=ImgDupEx(0);
autoumbral();
I_IMAGE3=ImgDupEx(0);
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
MorphErodeEx(5, 1);
ImgLockSrc1(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE4=ImgNewDisp(315, 295, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithAnd();
ImgSetCurrent(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE5=ImgNewDisp(315, 295, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltPrewitt();
MapClipGeneral(10, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
ImgLockSrc1(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE6=ImgNewDisp(315, 295, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithAnd();
ImgLockSrc1(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE7=ImgNewDisp(315, 295, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgSetCurrent(I_IMAGE7, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE8=ImgNewDisp(315, 295, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
B_BLOBSET1=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET1);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMinArea(FALSE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Hongo en campo\T1 coronal
entrenamiento\filtro1.cls");
BlobCount();
ImgSetCurrent(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
```

```

delete I_IMAGE6;
ImgSetCurrent(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE5;
ImgSetCurrent(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE4;
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE3;
ImgSetCurrent(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE2;
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE1;
}

```

Macro: Daño por hongo saprofito y daño por frío, contraste en T₁, plano sagital.

```

//Description:
Def hongoencampoT1sag()
{
DispSetUpdate(0,0);
R_9951_0=ImgNewROI(89, 64, 312, 324);
ClipCopy();
I_IMAGE141=ClipPaste();
ImgSetCurrent(I_IMAGE141, R_Def, ALL_BANDS);
FiltAverage();
I_IMAGE142=ImgDupEx(0);
autoumbra();
ImgSetCurrent(I_IMAGE141, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE143=ImgNewDisp(312, 324, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltPrewitt();
ImgSetCurrent(I_IMAGE143, R_Def, ALL_BANDS);
MapClipGeneral(73, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
ImgLockSrc1(I_IMAGE142, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE143, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE144=ImgNewDisp(312, 324, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgLockSrc1(I_IMAGE144, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE141, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE145=ImgNewDisp(312, 324, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithAnd();
ImgSetCurrent(I_IMAGE145, R_Def, ALL_BANDS);
FiltPrewitt();
MapClipGeneral(13, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
ImgSetCurrent(I_IMAGE142, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE146=ImgNewDisp(312, 324, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
MorphErodeEx(5, 0);
ImgLockSrc1(I_IMAGE146, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE145, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE151=ImgNewDisp(312, 324, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgSetCurrent(I_IMAGE151, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE158=ImgNewDisp(312, 324, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltMedian();
FiltMedian();
}

```

```

B_BLOBSET1=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET1);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMinArea(FALSE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Hongo en campo(T1
sagital\filtro1.cls");
BlobCount();
ImgSetCurrent(I_IMAGE146, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE146;
ImgSetCurrent(I_IMAGE145, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE145;
ImgSetCurrent(I_IMAGE144, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE144;
ImgSetCurrent(I_IMAGE143, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE143;
ImgSetCurrent(I_IMAGE142, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE142;
ImgSetCurrent(I_IMAGE141, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE141;
}

```

Macro: Daño por hongo saprofito y daño por frío, contraste en T₂, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def hongoencampoT2cor()
{
DispSetUpdate(0,0);
R_9452_0=ImgNewROI(104, 84, 284, 292);
ClipCopy();
I_IMAGE1=ClipPaste();
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
FiltAverage();
I_IMAGE2=ImgDupEx(0);
autoumbral();
I_IMAGE3=ImgDupEx(0);
autoumbral();
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
MorphErodeEx(5, 1);
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
FiltPrewitt();
MapClipGeneral(19, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
FiltMedian();
ImgLockSrc1(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE4=ImgNewDisp(284, 292, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithAnd();

```

```

ImgLockSrc1(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE5=ImgNewDisp(284, 292, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgSetCurrent(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
FiltMedian();
B_BLOBSET1=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET1);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMinArea(FALSE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Hongo en campo\T2
coronal\filtro1.cls");
BlobCount();
ImgSetCurrent(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE4;
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE3;
ImgSetCurrent(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE2;
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE1;
}

```

Macro: Obtención del contorno del mesocarpio con picadura de *Ceratitis capitata* Wied

```

//Description:
Def MOSCA2()
{
DispSetUpdate(0,0);
//I_6787=ImgLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\maduros en
laboratorio\entrenamiento\6787.tif");
//ImgSetCurrent(I_6787, R_Def, ALL_BANDS);
R_6787_0=ImgNewROIEllipse(65, 84, 294, 313);
ClipCopy();
I_IMAGE188=ClipPaste();
ImgSetCurrent(I_IMAGE188, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE189=ImgNewDisp(294, 313, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE189, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE190=ImgNewDisp(294, 313, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltPrewitt();
ImgSetCurrent(I_IMAGE190, R_Def, ALL_BANDS);

```

```

I_IMAGE191=ImgNewDisp(294, 313, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
MapClipGeneral(16, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
ImgLockSrc1(I_IMAGE189, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE191, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE192=ImgNewDisp(294, 313, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
I_IMAGE193=ImgNewDisp(294, 313, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
autoumbra1();
I_IMAGE194=ImgNewDisp(294, 313, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltMedian();
B_BLOBSET17=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET17);
BlobEnableMinArea(FALSE);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(14.9414);
BlobSetMinAreaEx(14.8437);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_NUMBER_OF_HOLES, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_ROUGHNESS, TRUE);
BlobCount();
}

```

Macro: Obtención del contorno del mesocarpio sin epidermis con picadura de *Ceratitís capitata* Wied.

```

//Description:
Def MOSCA4()
{
DispSetUpdate(0,0);
R_6787_1=ImgNewROIEllipse(50, 18, 422, 386);
ClipCopy();
I_IMAGE1=ClipPaste();
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE2=ImgNewDisp(422, 386, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE3=ImgDupEx(0);
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE4=ImgNewDisp(422, 386, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltPrewitt();
ImgSetCurrent(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
MapClipGeneral(16, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
ImgSetCurrent(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE5=ImgNewDisp(422, 386, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltPrewitt();
ImgSetCurrent(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE6=ImgNewDisp(400, 380, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
autoumbra1();
ImgLockSrc1(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE7=ImgNewDisp(422, 386, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgLockSrc1(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE7, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE8=ImgNewDisp(422, 386, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);

```

```

ArithSubSat();
ImgSetCurrent(I_IMAGE7, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE7;
ImgSetCurrent(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE6;
ImgSetCurrent(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE5;
ImgSetCurrent(I_IMAGE4, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE4;
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE3;
ImgSetCurrent(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE2;
}

```

Macro: Detección del daño por picadura de *Ceratitis capitata* Wied en melocotón.

```

//Description:
Def MOSCA6()
{
DispSetUpdate(0,0);
R_6395_0=ImgNewROIEllipse(68, 50, 353, 346);
ClipCopy();
I_IMAGE1=ClipPaste();
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
FiltAverage();
I_IMAGE2=ImgDupEx(0);
I_IMAGE2A=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
autoumbral();
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE3=ImgDupEx(0);
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
FiltPrewitt();
MapClipGeneral(21, NOT_USED, 0, 255, NOT_USED, LEVEL_BUFFER);
MorphDilateEx(3, 1);
ImgLockSrc1(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE5=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithAnd();
ImgSetCurrent(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE4A=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
autoumbral();
ImgLockSrc1(I_IMAGE2A, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE4A, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE6=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgSetCurrent(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE6A=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltMedian();
MorphDilateEx(3, 1);
ImgSetCurrent(I_IMAGE2A, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE7=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);

```

```

MorphErodeEx(5, 1);
ImgLockSrc1(I_IMAGE7, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE6A, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE10=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgLockSrc1(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
ImgLockSrc2(I_IMAGE10, R_Def, ALL_BANDS);
I_IMAGE11=ImgNewDisp(353, 346, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
ArithSubSat();
ImgSetCurrent(I_IMAGE11, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET1=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET1);
BlobSetForeground(0);
BlobSetMinAreaEx(0);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_FERET_MEAN_DIAMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 10);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\maduros en
laboratorio\entrenamiento\filtro1.cls");
BlobCount();
ImgSetCurrent(I_IMAGE6, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE6;
ImgSetCurrent(I_IMAGE5, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE5;
ImgSetCurrent(I_IMAGE3, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE3;
ImgSetCurrent(I_IMAGE7, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE7;
ImgSetCurrent(I_IMAGE2, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE2;
ImgSetCurrent(I_IMAGE2A, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE2A;
ImgSetCurrent(I_IMAGE4A, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE4A;
ImgSetCurrent(I_IMAGE1, R_Def, ALL_BANDS);
ImgClose();
delete I_IMAGE1;
}

```

ANEXO A10. Macros de procesamiento digital de imágenes RMI de cítricos.

Macro: Daño por hongos *A. citri*, *B. cinerea*, *D. natalensis*, contraste en T₁, plano longitudinal.

```
//Description:
Def hongoscitricosT1sagfiltro()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4815=ImgNewROIEllipse(75, 76, 299, 300);
B_BLOBSET19=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET19);
BlobSetForeground(0);
BlobSetMinAreaEx(16);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(1000);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(TRUE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\T1 sag entrenamiento\centroide x
mayor de 49.cls");
BlobSetThreshEx(0, 66);
BlobCount();
}
```

Macro: Daño por hongos *A. citri*, *B. cinerea*, *D. natalensis*, contraste en T₂, plano ecuatorial.

```
//Description:
Def T2corpulpa()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_5181=ImgNewROIEllipse(75, 76, 299, 300);
autoumbra();
B_BLOBSET3=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET3);
BlobEnableMinArea(FALSE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobCount();
}
```

Macro: Daño por hongos *A. citri*, *B. cinerea*, *D. natalensis*, contraste en T₂, plano longitudinal.

```
//Description:
Def hongoscitricosT2sagfiltro()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4664=ImgNewROIEllipse(75, 76, 299, 300);
B_BLOBSET15=BlobNew();
```

```

BlobSetCurDocument(B_BLOBSET15);
BlobSetMinAreaEx(8.65);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_ROUGHNESS, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(TRUE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\T2 sag deteccion\filtro4.cls");
BlobSetThreshEx(0, 92);
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *A. citri*, contraste en T₁, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def citricosT1coralternaria()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIellipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(500);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(3.15);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 100);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\alternaria\T1 cor entrenamiento\filtro
1.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *A. citri*, contraste en T₁, plano longitudinal.

```

//Description:
Def citricosT1sagalalternaria()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIellipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);

```

```

BlobEnableMaxArea(FALSE);
//BlobSetMaxAreaEx(627);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(3.5);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 86);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\alternaria\T1 sag
entrenamiento\filtro3.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *A. citri*, contraste en T₂, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def citricosT2coralternaria()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIellipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(FALSE);
//BlobSetMaxAreaEx(500);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(1.00);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 91);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\alternaria\T2 cor
entrenamiento\filtro1.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *A. citri*, contraste en T₂, plano longitudinal.

```

//Description:
Def citricosT2sagalternaria()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4664=ImgNewROIellipse(75, 76, 299, 300);
B_BLOBSET15=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET15);
//BlobSetMinAreaEx(8.65);

```

```

BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_ROUGHNESS, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Alternaria\T2 sag
entrenamiento\filtro2.cls");
BlobSetThreshEx(0, 93);
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *B. cinerea*, contraste en T₁, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def citricosT1corbotritis()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(300);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(1.1);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 91);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Botritis\T1 Coronal\filtro3.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *B. cinerea*, contraste en T₁, plano longitudinal

```

//Description:
Def citricosT1sagbotritis()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(FALSE);

```

```

//BlobSetMaxAreaEx(627);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(7.5);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 74);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\botritis\T1 Sagital\filtro2.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *B. cinerea*, contraste en T₂, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def citricosT2corbotritis()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(FALSE);
//BlobSetMaxAreaEx(300);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(1.9);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 80);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Botritis\T2 Coronal\filtro1.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño por hongo *B. cinerea*, contraste en T₂, plano longitudinal

```

//Description:
Def citricosT2sagbotritis()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4664=ImgNewROIEllipse(75, 76, 299, 300);
B_BLOBSET15=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET15);
//BlobSetMinAreaEx(8.65);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_GRAY, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);

```

```

BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_ROUGHNESS, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\Botritis\T2 sag
entrenamiento\filtro2.cls");
BlobSetThreshEx(0, 86);
BlobCount();
}

```

Macro: Daño leve por helada (categoría I), contraste en T₁, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def citricosheladaT1corbarfield()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(5000);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(1.0);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 87);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\heladas barfield\T1 cor
entrenamiento\filtro 2.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño leve por helada (categoría I), contraste en T₁, plano longitudinal

```

//Description:
Def citricosheladaT1sagbarfield()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(5000);
BlobEnableMinArea(TRUE);

```

```

BlobSetMinAreaEx(1.0);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobSetThreshEx(0, 87);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\heladas barfield\T1 sag
entrenamiento\filtro 3.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño leve por helada (categoría I), contraste en T₂, plano ecuatorial.

```

//Description:
Def citricosheladaT2corbarfield()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_5181=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
autoumbral();
//I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
//FiltAverage();
B_BLOBSET3=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET3);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMinArea(FALSE);
//BlobSetMinAreaEx(1.0);
BlobEnableMaxArea(FALSE);
//BlobSetMaxAreaEx(1000);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\heladas barfield\T2 cor
entrenamiento\filtro 2.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño leve por helada (categoría I), contraste en T₂, plano longitudinal

```

//Description:
Def citricosheladaT2sagbarfield()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_5181=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
autoumbral();
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
B_BLOBSET3=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET3);
BlobSetForeground(1);
BlobEnableMinArea(FALSE);
//BlobSetMinAreaEx(2.2);

```

```

BlobEnableMaxArea(FALSE);
//BlobSetMaxAreaEx(1000);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_NUMBER_OF_HOLES, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\heladas barfield\T2 sag
entrenamiento\filtro 2.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño severo por helada (categoría II), contraste en T₁, plano ecuatorial

```

//Description:
Def citricosheladaT1cor()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
autoumbral();
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(5000);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(3.0);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\imagenes RMI\Citricos helada en
campo\SE T1 coronal\area 97 a 205 xc 77 a 81 yc 84 a 87.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño severo por helada (categoría II), contraste en T₁, plano longitudinal.

```

//Description:
Def citricosheladaT1sag()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
autoumbral();
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);

```

```

BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(5000);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(1.0);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\imagenes RMI\Citricos helada en
campo\SE T1 sagital\area 150 a 323 xc 68 a 84 yc 70 a 83.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño severo por helada (categoría II), contraste en T₁ (GE), plano ecuatorial

```

//Description:
Def citricosheladaGEcor()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
autoumbra1();
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(0);
BlobEnableMaxArea(TRUE);
BlobSetMaxAreaEx(5000);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(3.0);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\imagenes RMI\Citricos helada en
campo\GE coronal\filtro 3.cls");
BlobCount();
}

```

Macro: Daño severo por helada (categoría II), contraste en T₁ (GE), plano longitudinal

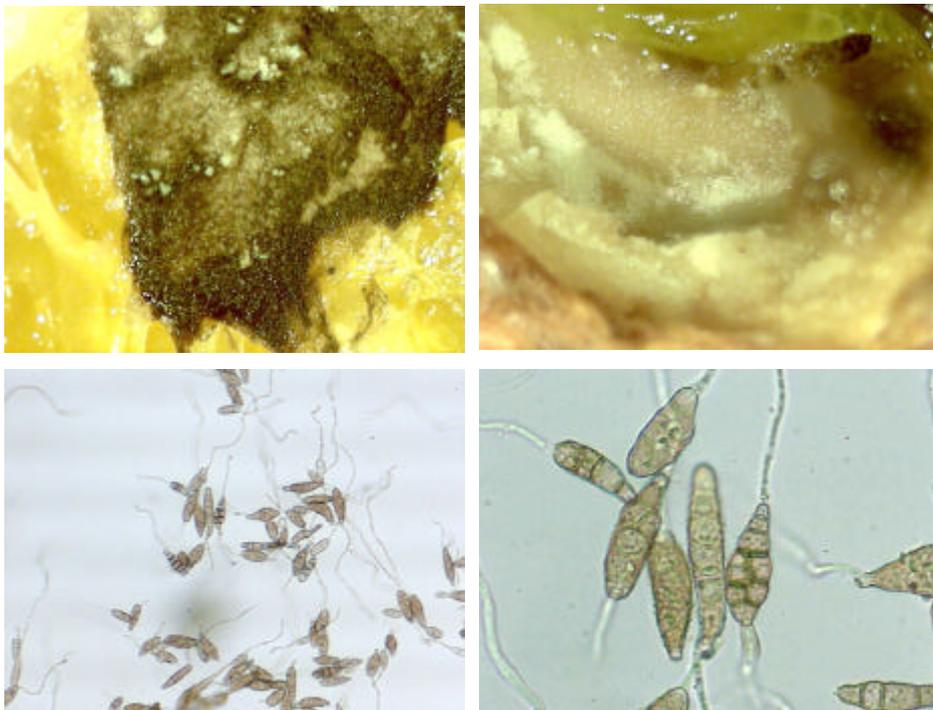
```

//Description:
Def citricosheladaGESag()
{
DispSetUpdate(0, 0);
I_4386=ImgNewROIEllipse(55, 18, 399, 377);
I_IMAGE15=ImgNewDisp(399, 377, 1, IMG_MONO, IMG_8U, PAL_SOURCE, 0, IMG_AUTOSCALE, 8);
FiltAverage();
ImgSetCurrent(I_IMAGE15, R_Def, ALL_BANDS);
autoumbra1();
}

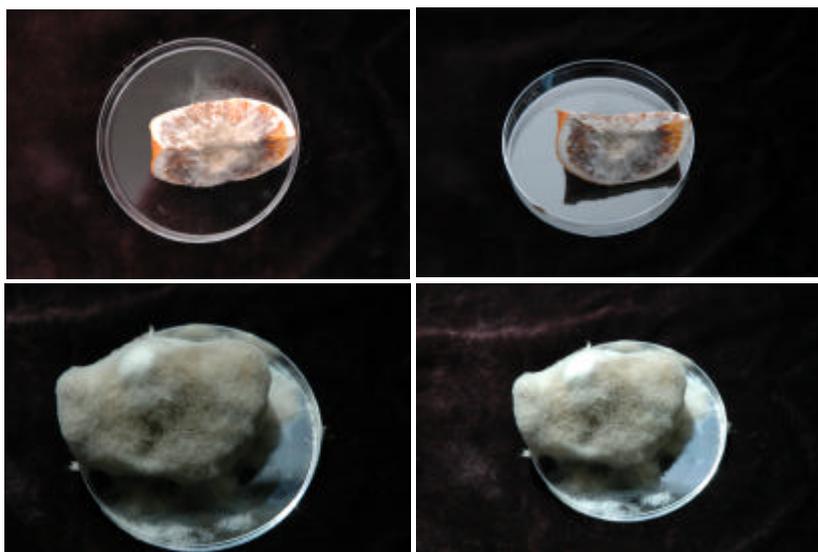
```

```
B_BLOBSET6=BlobNew();
BlobSetCurDocument(B_BLOBSET6);
BlobSetForeground(1);
BlobEnableMaxArea(FALSE);
BlobEnableMinArea(TRUE);
BlobSetMinAreaEx(10.5);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_X_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CENTER_OF_GRAVITY_Y_BIN, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_COMPACTNESS, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_CONVEX_PERIMETER, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_LENGTH, TRUE);
BlobFeatSelect(BLOB_NUMBER_OF_HOLES, TRUE);
BlobFilterApplyAfterCount(FALSE);
BlobFilterLoad("C:\Documents and Settings\Ivan Aristizabal\Mis documentos\imagenes RMI\Citricos helada en
campo\GE sagital\filtro 2.cls");
BlobCount();
}
```

ANEXO A11. Imágenes de hongos inoculados en cítricos.



Esporas germinadas de *Alternaria citri*



Esporas germinadas de *Botrytis cinerea*