

**Universidad Pública de Navarra**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**FENOTIPADO DEL PARDEAMIENTO DE LA CARNE EN VARIEDADES DE MANZANO  
INCLUIDAS EN LA COLECCIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE LA UPNA  
MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN**

presentado por

**JULIA ARELLANO ZAPATERO *(e)k***

*aurkeztua*

**GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS  
*ELIKGAIEN PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAKO GRADUA***

Junio, 2019



# **UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA**

## **ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**“FENOTIPADO DEL PARDEAMIENTO DE LA CARNE EN VARIEDADES DE  
MANZANO INCLUIDAS EN LA COLECCIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE  
LA UPNA MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN”**

Trabajo de Fin de Grado presentado por Dña.  
Julia Arellano Zapatero y dirigido por el Dr.  
Carlos Miranda Jiménez, Profesor Titular del  
Departamento de Agronomía, Biotecnología y  
Alimentación.

Vº Bº El director del trabajo

Presentado por

Carlos Miranda Jiménez

Julia Arellano Zapatero



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría dar las gracias a mi tutor Carlos Miranda por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, por su predisposición y apoyo durante su desarrollo y por todo lo que he aprendido en este tiempo. También quiero expresar mi gratitud a las personas del grupo de Fruticultura y Viticultura Avanzadas.

Quiero agradecer a mi familia por todo su apoyo, su cariño y ánimos durante esta etapa.

## RESUMEN

**Título:** “Fenotipado del pardeamiento de la carne en variedades de manzano incluidas en la colección del banco de germoplasma de la UPNA mediante análisis de imagen”

**Autora:** Julia Arellano Zapatero

El pardeamiento de la carne de manzana es un problema importante en las industrias de procesamiento y corte en fresco. Este trabajo evalúa la viabilidad de la técnica de fenotipado de la pulpa de la manzana utilizando imágenes digitales de toda la superficie de la fruta. Quince cultivares tradicionales de manzana del banco de germoplasma UPNA se recolectaron en 2018. Se seleccionaron sesenta manzanas de cada cultivar con un amplio rango de etapas de madurez, evaluadas por la firmeza de la carne y la degradación del almidón. El pardeamiento se evaluó tomando diez fotografías por fruto a intervalos regulares desde el corte hasta una hora más tarde. Las imágenes se transformaron mediante software de análisis de imagen para obtener los valores promedio de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . La extensión total del pardeamiento se calculó ajustando las curvas de regresión del cambio de color total ( $\Delta E$ ) desde el corte. Además, se evaluó la relación entre el pardeamiento y el nivel de maduración para cada cultivar mediante curvas de regresión con la firmeza y el índice de almidón. La mayor parte (> 90%) del pardeamiento se produjo en los primeros 30 minutos después del corte, y la madurez afectó la intensidad del pardeamiento de manera diferente según la variedad. El análisis de imágenes digitales ha mostrado ser un método adecuado para fenotipar el pardeamiento de la carne de manzana. Se ha desarrollado un protocolo estandarizado para la evaluación del pardeamiento que permite comparar variedades.

**Palabras clave:** análisis de imagen, índice de almidón, firmeza, maduración, pardeamiento.

## **ABSTRACT**

**Title:** "Flesh browning phenotyping in varieties of apple tree from the UPNA germplasm bank through image analysis"

**Author:** Julia Arellano Zapatero

Apple flesh browning is a significant problem in fresh cut and processing industries. Phenotyping flesh browning in a quick and objective manner can assist in breeding and characterizing efforts. This work evaluates the viability of phenotyping apple flesh browning using digital images of the entire surface of the fruit. Fifteen traditional apple cultivars from the UPNA germplasm bank were harvested in 2018. Sixty apples were selected from each cultivar representing a wide range of maturity stages, assessed by flesh firmness and starch-iodine testing. The browning phenotype was assessed taking ten photographs per fruit at regular intervals from immediately after slicing up to an hour later. The raw images were transformed by image analysis software to obtain the average values of  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ . Moreover, the relationship between browning and maturity level for each cultivar was explored by regression curves with firmness and starch-iodine index levels. Most (> 90%) of the browning occurred in the first 30 minutes after slicing, and browning intensity was affected by maturity differently depending on the variety. The analysis of digital images has been shown a suitable method for phenotyping apple flesh browning. A standardized protocol for apple flesh browning has been provided, enabling to comparing varieties.

**Key words:** image analysis, starch-iodine testing, firmness, maturation, browning.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Introducción.....   | 1  |
| 1. Antecedentes.....  | 3  |
| 1.1 La maduración de los frutos.....  | 3  |
| 1.1.1 Estados de madurez.....   | 4  |
| 1.1.2 Índices de madurez.....   | 5  |
| 1.2 Factores responsables del deterioro de los frutos .....   | 8  |
| 1.2.1 Pardeamiento enzimático.....  | 8  |
| 1.2.2 Métodos para cuantificar la evolución del pardeamiento enzimático.....  | 9  |
| 2 Objetivos.....  | 12 |
| 3 Materiales y métodos .....  | 13 |
| 3.1 Material vegetal.....   | 13 |
| 3.2 Métodos.....  | 13 |
| 3.2.1 Toma de muestras .....  | 13 |
| 3.2.2 Determinación del estado de madurez.....  | 14 |
| 3.2.3 Determinación de la oxidación.....  | 15 |
| 3.2.4 Análisis de datos.....  | 16 |
| 4 Resultados y discusión.....   | 19 |
| 4.1 Determinación del momento más adecuado tras el corte.....   | 19 |
| 4.2 determinación de la influencia del estado de maduración sobre el nivel de oxidación .....                         | 20 |
| 4.3 Clasificación de las variedades en función de su nivel de oxidación.....  | 23 |
| 4.3.1 Utilizando diagramas de cajas y bigotes.....  | 23 |
| 4.3.2 Utilizando una clasificación por categorías .....   | 25 |
| 4.4 Propuesta de protocolo y recomendaciones para la determinación de la oxidación de frutos cortados de manzana..... | 25 |
| 5 Conclusiones .....  | 27 |
| 6 Bibliografía.....   | 28 |
| Anejo 1. Tablas de conversión del almidón de Ctifl.....   |    |
| Anejo 2. Perfiles de oxidación de las variedades .....  |    |



## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Información de las variedades de manzano empleadas en el estudio.....  | 13 |
| Tabla 2. Estadísticos de las regresiones lineales entre el nivel de maduración y oxidación de las variedades de manzano clasificadas por su comportamiento oxidativo..... | 22 |
| Tabla 3. Clasificación por categorías según el nivel de oxidación.....  | 25 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Variación de la intensidad respiratoria en frutos climatéricos (Urbina, 2002). ....   | 4  |
| Figura 2. Variación de la intensidad respiratoria en frutos no climatéricos (Urbina, 2002).   | 4  |
| Figura 3. Interpretación de los ejes CIELAB y naturaleza contraria de los ejes a* y b* (Sharma and Bala, 2002). ....  | 6  |
| Figura 4. Instrumentación para el análisis y procesado de imagen (Tárrega, 2011).....   | 11 |
| Figura 5. Instrumentación y momento del análisis de la firmeza.....   | 14 |
| Figura 6. Muestras durante y después de la prueba de almidón. ....  | 15 |
| Figura 7. Momento del análisis de imagen para una de las variedades. ....   | 16 |
| Figura 8. a) Ejemplo de imagen antes de la corrección de blancos y b) la misma imagen tras la unificación del nivel de blancos. ....  | 16 |
| Figura 9. Imágenes obtenidas con Fiji; a) unificada los niveles de blanco, b) coordenada L*, c) coordenada a* y d) coordenada b*.....   | 17 |
| Figura 10. Evolución del pardeamiento de los frutos mediante análisis de imagen para dos variedades de manzano diferente: a) la más oxidativa y b) la menos oxidativa (cada punto representa la media y desviación de 60 frutos)..... | 19 |
| Figura 11. Evolución del pardeamiento de los frutos mediante análisis de imagen y colorímetro para dos variedades de manzano diferente: a) la más oxidativa y b) la menos oxidativa.....  | 19 |
| Figura 12. Nivel de oxidación (Delta E*) de frutos de las variedad 09.04 (a,b), 12.17 (c,d) y 15.15 (e,f) respectivamente según el índice de almidón (a,c,e) y la firmeza (b,d,f) de los frutos (n=60). ....                          | 21 |
| Figura 13. Distribución del nivel de oxidación ( $\Delta E$ ) de las variedades según el índice de almidón y la firmeza. ....   | 24 |

## **INTRODUCCIÓN**

Actualmente existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de frutas y hortalizas, motivado fundamentalmente por una creciente concienciación a cerca de la importancia de la dieta en la salud como consecuencia de los nuevos estilos de vida. Otro aspecto que determina esta tendencia es la preferencia por parte de los consumidores hacia productos que ofrecen comodidad y rapidez en su preparación y consumo, derivados del ritmo de vida actual. Las frutas responden a estos requerimientos de forma natural facilitando una alimentación óptima y rápida. En el pasado, la evolución de la calidad se circunscribía generalmente a los requerimiento mínimos de calidad del fruto sin tener en cuenta otros aspectos como el punto de vista del consumidor final. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un aumento en la demanda hacia una calidad superior que englobara todos los aspectos. Por esta razón, surge la necesidad de considerar un nuevo enfoque de la calidad que tenga en cuenta el producto y a su vez la opinión del consumidor puesto que de él depende la aceptación final de este (Camelo, 2003; Romojaro, Madrid, and Pretel, 2003; Iglesias et al., 2012). De los diferentes atributos que engloban la calidad han adquirido una especial relevancia los relacionados con los aspectos sensoriales y nutricionales, por ser los que han dirigido sus exigencias los consumidores. Estos se encuentran directamente ligados a la composición interna del fruto puesto que determinan los aspectos externos (presentación, apariencia, uniformidad, madurez, frescura) e internos (sabor, aroma, textura, valor nutritivo) del mismo (Camelo, 2003; Romojaro, Madrid, and Pretel, 2003).

Para la obtención de productos de calidad, es necesario tener en cuenta el proceso evolutivo del fruto, que a su vez depende de la interacción de múltiples factores que determinan su disposición en el momento de recolección y el comportamiento poscosecha para su vida comercial útil. Por un lado, se encuentran los factores extrínsecos, aquellos externos al material vegetal que comprenden los aspectos ambientales, entre los que se encuentran; la temperatura, relacionada con el tiempo de vida útil, la humedad relativa, la climatología (viento) que provoca daños mecánicos en el productos, etc. Además están los aspectos agronómicos como el riego, las características del suelo o la disponibilidad de nutrientes. También influyen los factores intrínsecos, es decir, aquellos que dependen de las características propias del fruto como es la genética (especie, variedad, climaterio) y el estado de madurez, que determina el momento de recolección (Baixauli, n.d.; Díaz, 2003; Romojaro, Madrid, and Pretel, 2003).

La etapa más importante y compleja en el desarrollo de la fruta, es el proceso de maduración que puede dividirse, a su vez, en dos fases; la fase de maduración fisiológica y la de maduración organoléptica o comercial. La primera se desarrolla en el árbol iniciándose antes de finalizar el crecimiento celular y finaliza aproximadamente cuando el fruto ha alcanzado su máximo desarrollo. Sin embargo, la evolución de la segunda se puede completar tanto en el árbol como en el periodo poscosecha dependiendo del climaterio de los frutos, de la actividad respiratoria y la producción de etileno (Brezmes 2001). La importancia en el manejo del proceso de maduración de la fruta radica en que estas condiciones determinan características relacionadas con la aceptación por parte del consumidor, así como del tiempo de consumo del producto y por tanto han de ser evaluados de manera precisa y sistemática mediante lo que se llaman índices de madurez (Iguarán and

Alzate n.d.). La velocidad y naturaleza del proceso de maduración difiere significativamente entre las especies frutales, cultivares de las mismas, diferentes grados de madurez del cultivar y también entre zonas de producción (Camelo, 2003).

Debido al interés en la obtención de frutos con unas características de madurez óptimas tanto para el consumo como para su conservación, las industrias agroalimentarias (IAA) se hallan en una búsqueda continua enfocada al desarrollo de nuevos productos que cumplan con las exigencias ya mencionadas. Los alimentos mínimamente procesados en fresco (MPF) surgen como una alternativa interesante y promisorio (Aguayo Giménez et al., 2014). Las frutas como peras o manzanas son las más empleadas para este tipo de procesos pero también son altamente susceptibles y perecederas por lo que presentan cambios fisiológicos que acortan su vida útil como consecuencia de los procesos en las IAA, la acción de microorganismos y la actividad metabólica propia (Piedra, 2017). Esto conlleva a una apariencia poco atractiva y el posible desarrollo de sabores desagradables.

Una de las consecuencias más importantes de los procesos llevados a cabo en productos MPF son los fenómenos de pardeamiento enzimático. Tras la operación de corte, interaccionan los substratos fenólicos con las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación, las polifenoloxidasas (PPO) originando el pardeamiento en la carne que puede desarrollarse en un periodo de tiempo muy corto, hasta en 30 minutos (Laurila, Kervinen, and Ahvenainen, 1998). La velocidad y el grado de pardeamiento depende de diferentes factores como las características varietales, la especie, el estado fisiológico o la disponibilidad de oxígeno. Además, puede verse afectados por el nivel de actividad de la enzima PPO y el contenido fenólico total de la fruta por lo que existen numerosos estudios en los que se han evaluado el grado de correlación. Por otro lado, el color es un atributo de calidad muy importante para la determinación del tiempo de vida útil de este tipo de productos y por ello, diferentes autores han investigado acerca de los cambios de color causados por efectos del pardeamiento (Camacho, Peña, and Guzmán, 2013) mediante distintas técnicas.

Dada la importancia que tiene la oxidación sobre la calidad visual de los productos mínimamente procesados sería de interés disponer de un sistema para caracterizar la tendencia al pardeamiento de la carne de frutales como la manzana una vez cortada mediante un sistema rápido, objetivo y que proporcionase información de toda la superficie. Este método permitiría detectar con fiabilidad y rapidez la aptitud de las variedades para su uso en productos de cuarta gama o mínimamente procesados, así como el estado de madurez más adecuado para manzanas destinadas a este fin. Así mismo, sería interesante estudiar la influencia del grado de maduración sobre el nivel de oxidación en diferentes variedades de manzano en función del cambio de color.

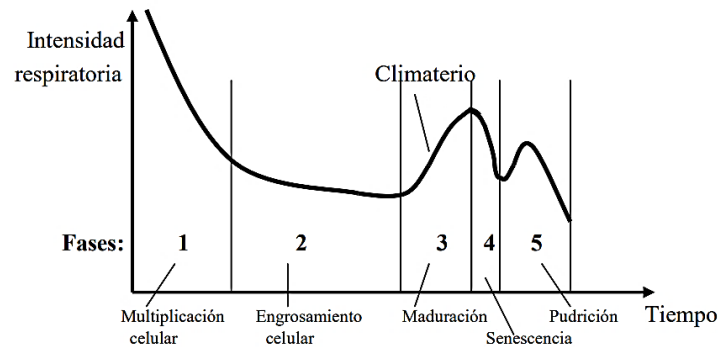
## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 LA MADURACIÓN DE LOS FRUTOS

La maduración es el conjunto de transformaciones bioquímicas que acontecen desde las últimas etapas de crecimiento y desarrollo de una fruta hasta las primeras etapas de la senescencia, que resultan en su calidad estética o alimentaria característica y se manifiestan (principalmente durante el climaterio) por cambios en la composición, color, textura y demás propiedades organolépticas (Kader, 2002).

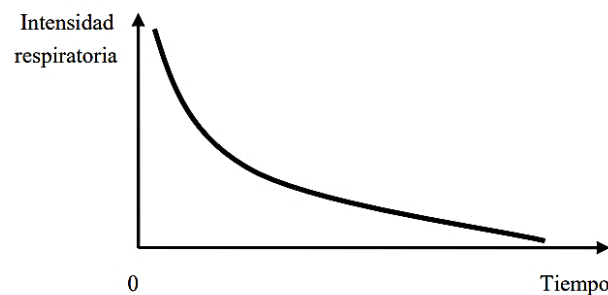
El proceso de maduración abarca gran parte de las transformaciones bioquímicas que se dan a lo largo de la vida de los frutos. Durante esta fase, aumenta ligeramente de tamaño y de peso por acumulación, principalmente, de agua; además de aumentar sus espacios intercelulares (Urbina, 2002). En los primeros estados de madurez, el fruto contiene pequeñas cantidades de azúcar, pero grandes cantidades de almidón, ácidos y fenoles, los cuales no proporcionan los atributos sensoriales óptimos para su consumo. A medida que el fruto alcanza su madurez, se produce una degradación casi total del almidón de manera que hay un aumento del contenido de azúcares dando lugar a alteraciones en el sabor, textura y consistencia del fruto. Los cambios de textura y consistencia se deben a una transformación de las pectinas que componen la pulpa y que como consecuencia originan el ablandamiento del fruto. Por otro lado, los contenidos en ácidos disminuyen para dar lugar a carbohidratos o ser empleados como soporte para la respiración. En general, la composición fenólica en los frutos jóvenes es más elevada que en los maduros, por lo que disminuye conforme a la maduración y por lo cual es una consecuencia de la mayor actividad enzimática que se detecta en los primeros (García, Herrero, and González, 2010). A su vez, tiene lugar el desarrollo de los componentes volátiles que confieren las características del aroma. Así mismo, se produce un cambio de los pigmentos de la piel y la pulpa, cambiando el color de los frutos (Peñuela, 2004).

Además de los parámetros anteriores, esta fase también es controlada mediante la variación de la intensidad respiratoria. Esta permite clasificarlos en dos tipos: frutos climatéricos y no climatéricos. Los primeros son frutos cuya intensidad respiratoria tiene un descenso notorio en la fase de multiplicación celular y durante la maduración aumenta (climaterio) hasta alcanzar su máximo en la denominada crisis climatérica hasta finalmente descender en la senescencia. Esta variación de la intensidad respiratoria se representa en la *Figura 1*. Entre los frutos climatéricos se encuentran los siguientes: pera, manzana, melocotón, albaricoque, ciruela, plátano, aguacate, mango y papaya (Urbina, 2002).



**Figura 1.** Variación de la intensidad respiratoria en frutos climatéricos (Urbina, 2002).

En los frutos no climatéricos, la intensidad respiratoria es progresiva a lo largo de todas las fases de desarrollo como se observa en la *Figura 2* y no presenta el climaterio o aumento durante la maduración. Entre los frutos no climatéricos se encuentran los siguientes: cereza, uva, naranja, limón y piña (Urbina, 2002).



**Figura 2.** Variación de la intensidad respiratoria en frutos no climatéricos (Urbina, 2002).

### 1.1.1 Estados de madurez

La madurez se asocia a un estado del fruto en el que se han producido diferentes cambios. Este concepto puede abarcar distintos enfoques en respuesta de las diferentes necesidades y del uso propuesto (Urbina, 2002). Se pueden distinguir los siguientes estados:

- **Madurez fisiológica.** Considerando la finalidad reproductora de los frutos. Este estado se corresponde con el momento en que la semilla está suficientemente evolucionada como para ser viable y poder germinar. El fruto alcanza su máximo tamaño y el mayor vigor de las semillas que le permiten iniciar los diferentes cambios bioquímicos (Martínez-González et al., 2017).
- **Madurez tecnológica o de recolección.** Es el momento en que el fruto alcanza sus características organolépticas óptimas y es apto para ser extraído del árbol y así continuar su proceso de maduración hasta la madurez de consumo. Normalmente,

en frutales de pepita como por ejemplo la manzana, la madurez de recolección coincide con el principio de la fase climatérica (Urbina, 2002).

- **Madurez de consumo.** Es el estado en el que el fruto ha adquirido sus características propias de apariencia, consistencia, textura, sabor y aroma haciéndolo apto para el consumo. Normalmente, en los frutos climatéricos coincide con el máximo de la "crisis climatérica". Este concepto difiere entre los consumidores atendiendo a sus diferentes gustos (por ejemplo, a algunos les gusta más que las manzanas sean ácidas mientras que otros prefieren las dulces...) (Royo and Miranda, 2019).

### 1.1.2 Índices de madurez

La determinación correcta del momento de recolección es un factor clave que condiciona la capacidad de transporte, de conservación y la calidad que finalmente perciba el consumidor. La evolución de los diferentes parámetros de madurez puede variar de acuerdo con la especie, variedad y a las condiciones ambientales del lugar. Por ejemplo, los frutos climatéricos se pueden recolectar con mayor precocidad conforme antes alcancen su capacidad para madurar fuera del árbol y se prevea un periodo de conservación más largo.

Las manifestaciones de la madurez pueden ser identificadas durante el proceso de recolección y para lo cual se establecen índices de recolección, los cuales pueden ser utilizados en manejos para mitigar o retrasar la senescencia (Melgarejo et al., 2010). Son indicadores que dan una idea del desarrollo del proceso de maduración basándose en las características fisiológicas, físicas y bioquímicas que adquieren los frutos. Sus valores definen un estado de maduración en el proceso y su aplicación es fundamental para establecer la fecha en que debe realizarse la recolección, definiendo el estado de madurez comercial o de recolección mediante uno o, normalmente, varios indicadores (Urbina, 2002). Estos índices son utilizados también para establecer la calidad de los frutos garantizando la fiabilidad de cara al consumidor por lo que deben ser objetivos, simples e indicativos. Se pueden clasificar atendiendo a diferentes parámetros como el uso (destrutivo o no destructivo), la naturaleza del fruto, el método de determinación, etc.

#### a) Índices basados en los aspectos externos del fruto

- **Tamaño y forma.** El tamaño del fruto, al igual que la forma, es una característica varietal que no se puede determinar en el árbol. El método más frecuente es el uso de un calibre que expresa el diámetro máximo del fruto pero también se pueden determinar en base al peso o volumen del fruto (Urbina, 2002).

No en todos los frutos son igual de precisas todas medidas, en el caso de la manzana es más adecuado el uso del calibre o el volumen en vez del peso debido a que en las últimas etapas de crecimiento a pesar de que el fruto no aumenta de peso, puede aumentar su volumen como consecuencia del desarrollo de espacios aéreos intercelulares que hacen disminuir su densidad y lo hacen crujiente (Ginjuan, 2013).

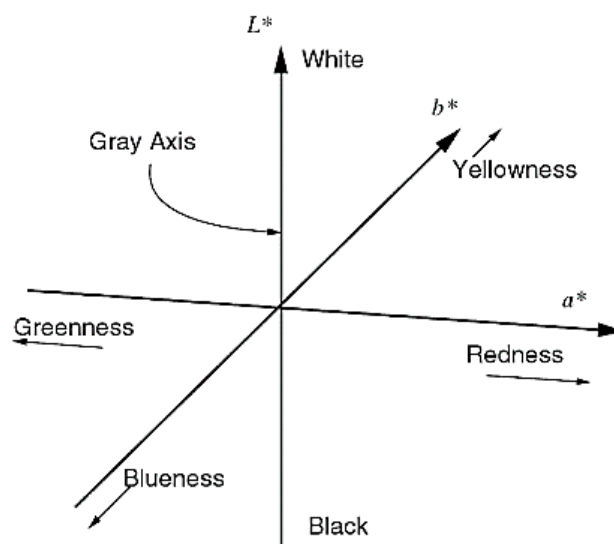
- **Color.** El color es un índice tanto de recolección como de calidad y madurez, y está relacionado con la variedad. Por lo general, en la mayoría de los frutos este parámetro muestra un viraje conforme su maduración debido a la desaparición de la clorofila (verde) y el aumento de otros pigmentos como los antocianinas (rojizos) o xantofilas (amarillos) (Gergoff, 2016) por lo que cabe diferenciar entre el color de superficie, adquirido en algunas variedades debido a la acumulación de antocianinas y el color de fondo, como consecuencia de la evolución de la clorofila a xantofilas y carotinas (Urbina, 2002). Este indicador puede medirse de forma subjetiva mediante cartas de color específicas de cada especie y variedad en las que un color va asociado a un número que lo identifica, o bien se puede determinar de forma más precisa y objetiva con instrumentos de color como el colorímetro, el cual permite expresar un color concreto a través de valores de coordenadas y sus combinaciones.

La Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) ha definido diferentes espacios de color para comunicar y expresar el color objetivamente. Uno de los más utilizados actualmente es el espacio de color  $L^*a^*b^*$ , también referido como CIELAB. Como se muestra a continuación,  $L^*$  indica la luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas cromáticas (Sharma and Bala, 2002):

$L^*$ : luminosidad

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

$b^*$ : coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul)



**Figura 3.** Interpretación de los ejes CIELAB y naturaleza contraria de los ejes  $a^*$  y  $b^*$  (Sharma and Bala, 2002).

## b) Índices basados en aspectos internos del fruto

- **Firmeza.** Se define como la consistencia de los frutos. Tradicionalmente es determinada como la fuerza necesaria para deformar la superficie de un fruto. La firmeza de la pulpa es un atributo textural de gran importancia puesto que está estrechamente relacionado con el momento óptimo de recolección, la evaluación de la calidad durante el almacenamiento, la comercialización en fresco (Barreiro and Ruiz-Altisent, 1996) y por tanto de la maduración, de tal forma que conforme el fruto se desarrolla la firmeza disminuye. Para su medida existen diferentes equipos como el penetrómetro, el durómetro, el texturómetro y equipos de impacto. Comúnmente se mide a través de la presión ejercida con un puntal mediante el empleo de un penetrómetro (Urbina, 2002).

**Acidez titulable total.** El contenido de ácidos varía en el proceso de maduración dando lugar a un incremento de los sólidos solubles. Los ácidos más comunes presentes en frutales son el málico, el cítrico y el tartárico y dependiendo de la especie y la variedad, el perfil de ácidos puede variar (Royo and Miranda, 2019). Estos son determinados mediante una valoración ácido-base en presencia de un indicador como la fenolftaleína. Para una conservación óptima por ejemplo del manzano, se recomienda que la acidez sea como mínimo de 5 g/l de ácido málico (Urbina, 2002).

- **Sólidos solubles.** En el proceso de maduración, a medida que el contenido de ácidos disminuye, los azúcares (constituyen la mayor parte de los sólidos solubles) sufren un incremento. Su contenido total depende de las características varietales y se determina mediante un refractómetro digital o analógico y se expresa en porcentaje o a través de una escala graduada en grados Brix (1 grado Brix equivale a 1 gramo de sólido soluble cada 100 gramos de solución a 20 grados) respectivamente (Gergoff, 2016). Los valores mínimos del índice refractométrico recomendables para recolección difieren según la variedad, estando comprendidos, en general, entre 9-12% para peras, 11-13% para manzanas y 9-10% para melocotones, mientras que para variedades de uva de mesa los valores suelen oscilar entre 15-25% (Urbina, 2002).
- **Contenido de almidón.** En frutos como la manzana y la pera, el almidón constituye la reserva de almacenamiento de las sustancias hidrocarbonadas durante el desarrollo de los frutos. Una vez completado su crecimiento el almidón se degrada a azúcares (Ginjuan, 2013). El contenido en almidón puede variar en el proceso de maduración debido a las características varietales o condiciones climáticas de los frutos que pueden hacer variar el patrón de acumulación o degradación del almidón (Gergoff, 2016).

El test de almidón permite observar la evolución fisiológica de los frutos antes de la cosecha. Este fenómeno se manifiesta cuando la solución yodo se aplica sobre el corte ecuatorial de la fruta, las zonas donde el almidón está todavía presente se tiñen de azul oscuro mientras que las zonas maduras no presentan tinción (Ctifl, 2002).



## 1.2 FACTORES RESPONSABLES DEL DETERIORO DE LOS FRUTOS

Como se ha visto en apartados anteriores, las características de calidad de la fruta, representadas por las propiedades bioquímicas y físicas que hacen que una fruta sea comestible y valorada por los consumidores, hoy en día se consideran una prioridad importante (Guardo et al., 2013). Sin embargo, las industrias agroalimentarias pueden encontrar algunos problemas en el manejo de estos productos que deben evitarse para garantizar una alta calidad y al mismo tiempo evitar una pérdida sustancial de la fruta. Uno de los principales problemas que ocurren durante el procesamiento de los frutos (por ejemplo, en fruta mínimamente procesada o IV gama) es el pardeamiento enzimático, el cual se produce en el área de la superficie cortada y tiene un gran impacto puesto que es un factor limitante de la vida útil. Este fenómeno disminuye la calidad comercial, la aceptación organoléptica y el valor nutricional, provocando el rechazo por parte del consumidor (Artés, Castañer, and Gil, 1998).

### 1.2.1 Pardeamiento enzimático

Las operaciones de corte de tejidos vegetales, originan una desestructuración en las membranas celulares y subcelulares liberándose así enzimas y sustratos que reaccionan de manera incontrolable iniciando diferentes reacciones (Parzanese, n.d.)

La alteración del color que ocurre en la superficie dañada de estos productos se define como pardeamiento enzimático, el cual está mayoritariamente asociado a la enzima polifenoloxidasa (PPO), que en presencia de oxígeno (O<sub>2</sub>) cataliza la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en los tejidos para formar o-quinonas. Estas posteriormente se polimerizan desencadenando la generación de pigmentos pardos denominados genéricamente melaninas (Parzanese, n.d.). Como consecuencia, la calidad visual del producto disminuye, y con ello, las propiedades organolépticas ya que se producen cambios indeseables en el sabor y la pérdida de nutrientes (Luo and Barbosa-Cánovas, 1997). La tasa de pardeamiento de la carne varía dependiendo del cultivar debido a la composición genética, la etapa de maduración de la fruta y el nivel de actividad de la enzima polifenoloxidasa, así como el contenido fenólico total de la fruta según han informado diversos estudios (Murata et al., 1995; Burke, 2010; Holderbaum et al., 2010).

Comúnmente, los estudios de pardeamiento enzimático se han llevado a cabo mediante índices bioquímicos, por ejemplo, el contenido fenólico (Burda, Oleszek, and Lee, 1990; Kondo et al., 2002; Renard, Dupont, and Guillermin, 2007) y la actividad de la polifenoloxidasa (Podsędek et al., 2000; Rocha and Morais, 2002) o bien, a través de indicadores físicos, como la superficie de color (Rocha and Morais, 2003; Quevedo, Jaramillo, et al., 2009; Burke, 2010; Holderbaum et al., 2010). Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y representativos de metabolitos secundarios de las plantas y su relevancia radica en su participación en la fisiología y el metabolismo celular (Jurado Teixeira et al., 2016). Las manzanas son una fuente importante de polifenoles y un claro ejemplo de susceptibilidad al pardeamiento enzimático. Tanto la cantidad como calidad de la PPO como los polifenoles se ve influida por diferentes factores como la variedad, el estado de madurez, la temperatura, las condiciones de almacenamiento

de éste y el manejo del cultivo, entre otros (Martínez-Ballesta et al., 2007). Coseteng and Lee (1987) encontraron en algunas variedades (*Classic Delicious*, *RI Greening*, *McIntosh* y *Cortland*), que la actividad de la PPO se relacionaba directamente con el grado de pardeamiento mientras que en otras (*Empire*, *Rome* y *Golden Delicious*), el grado de pardeamiento se relacionaba en mayor medida con la concentración fenólica. También se encontró una correlación de ambos factores en el nivel de pardeamiento según Harel, Mayer, and Shain (1966), citado por Amiot et al. (1992). En relación al estado de maduración se vio que en las etapas tempranas de desarrollo de los frutos la cantidad compuestos fenólicos y la concentraciones de PPO eran elevadas pero, conforme la maduración avanza, los niveles disminuían o se estabilizaban por lo que el potencial oxidativo era menor (Murata et al., 1995; Murata et al., 2001; Alonso-Salces et al., 2005).

En el caso de indicadores físicos basados en color, el espacio CIELab es el más empleado puesto que proporcionan mayor uniformidad en la diferencia de color y se asemejan a la percepción humana del color (Lunadei et al., 2011; Guardo et al., 2013). En este tipo de investigaciones, según León et al., (2006) es precisa una caracterización detallada del color, y así como al evaluación de su calidad con mayor precisión, es necesario conocer el valor del color de cada punto de su superficie.

## 1.2.2 Métodos para cuantificar la evolución del pardeamiento enzimático

### a) Cuantificación del contenido total de fenoles

El contenido fenólico de frutas y hortalizas ha sido ampliamente investigado con el fin de comprobar su influencia en las reacciones de pardeamiento. Por lo general, se realiza una extracción y purificación de los compuestos fenólicos y posteriormente se cuantifican mediante distintas técnicas como la HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) en la que se produce una separación y cuantificación individual de los fenoles (Amiot et al., 1992; Murata, Noda, and Homma, 1995; Holderbaum et al., 2010) o bien, mediante espectrometría de absorción en la que a la muestra se añade agua y un reactivo, principalmente Folin-Ciocalteau y posteriormente se cuantifica espectrofotométricamente empleando el ácido gálico como estándar de referencia para el cálculo de los resultados (Singleton and Rossi, 1965; Rocha and Morais, 2001; Burke, 2010; Schmitz-Eiberger and Matthes, 2011).

A pesar de que estas metodologías son muy empleadas en estudios acerca del pardeamiento enzimático presentan algunas dificultades. Estas técnicas requieren de mucho tiempo y son complejas, por lo que la precisión del contenido total fenólico puede no ser muy alta. Esto se debe a que los métodos de extracción no garantizan la solubilización de todos los compuestos (Nicolas et al., 1994) y además, frutas como las manzanas poseen diferentes clases de fenoles con diferentes susceptibilidades a la oxidación enzimática (Amiot et al., 1992).

## **b) Determinación de la actividad de la polifenoloxidasa (PPO)**

La polifenoloxidasa (PPO) es la enzima responsable que desencadena la generación del pardeamiento por lo que el estudio de su actividad es de gran importancia en la industria alimentaria. El método de determinación que comúnmente se lleva a cabo es el seguimiento espectrofotométrico de la acumulación del producto o-quinona (Murata, Noda, and Homma, 1995; Podsędek et al., 2000; Rocha and Morais, 2001; Rocha and Morais, 2002; Burke, 2010; Schmitz-Eiberger and Matthes, 2011). Para ello, se realiza una extracción y purificación de la muestra y posteriormente se mide la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda determinada (variable para diferentes sustratos) a una temperatura concreta (Rocha and Morais, 2001).

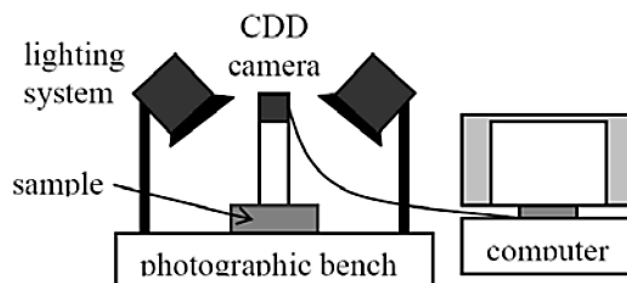
Los ensayos de determinación de la PPO de tejidos vegetales continúan siendo un problema debido a la dificultad para obtener una solubilización completa de la PPO unida a la membrana y evitar la oxidación fenólica durante y después de la extracción, apuntan Rocha and Morais (2001). Además, la eficiencia del proceso se influida tanto por las condiciones durante el proceso como las de almacenamiento del tejido antes de la extracción de la PPO.

## **c) Determinación del cambio de color ( $\Delta E$ )**

Los procedimientos para cuantificar el cambio de color pueden llevarse a cabo mediante la visión humana o instrumentación. El sistema visual tiene gran capacidad de discriminación entre multitud de colores y tonalidades, así como de detección de defectos, pero la precisión y fiabilidad de esta evaluación depende de muchos factores como el observador, la iluminación, el área, fondo, superficie, etc. Tradicionalmente se ha llevado a cabo con la ayuda de patrones de referencia como las cartas de color pero, dicha medida es muy subjetiva (depende de las condiciones de iluminación y de la fiabilidad de la reproducción del color con tinta) por lo que se precisa de un método instrumental que proporcione resultados óptimos (Ginjuan, 2013; Salas, 2015). Los instrumentos comúnmente utilizados para determinar de forma objetiva los cambios de color como el pardeamiento enzimático son los colorímetros. Estos miden la cantidad de luz reflejada por la muestra en función de tres variables conocidas como coordenadas de color o valores triestímulo (rojo, verde y azul). Comúnmente se deriva al cálculo de la variación de color global,  $\Delta E$ , ya que es un parámetro integrador de la variación en los componentes del color según el sistema CIELAB y es de gran utilidad puesto que incorpora los cambios en todas las dimensiones de color refleja mejor el cambio total de color entre el momento oxidado y el momento del corte (Sharma and Bala, 2002). A pesar de que este tipo de instrumentos son relativamente económicos, de manejo simple y cómodo, y ofrecen una medida muy objetiva y precisa, la medición cubre una superficie muy pequeña por lo que puede ser difícil obtener una valoración representativa del conjunto global de la superficie a partir de una sola medida. Si se usaran para la medición punto por punto en varias posiciones para obtener la distribución del color, sería muy laborioso, ya que para tener una medida fiable de

la evolución del color en el fruto haría falta tomar medidas en varios puntos por fruto, y asegurarse que el colorímetro siempre se pone en las mismas posiciones (Yam and Papadakis, 2004). Además, esto aumentaría el tiempo necesario para obtener la información de un solo fruto, reduciendo por tanto el tamaño de muestra que es posible procesar sin que haya cambios apreciables en el nivel de oxidación.

Por otro lado, la industria alimentaria ha desarrollado nuevos métodos no invasivos basados en la visión computacional como el uso de imágenes fotográficas (Yam and Papadakis, 2004; Quevedo, Jaramillo, et al., 2009; Quevedo, Díaz, et al., 2009; Zapata et al. 2019). Para ello se emplea una cámara digital acompañada de una iluminación adecuada (por ejemplo, focos) donde la muestra refleja una intensidad de luz que es capturada por los sensores mediante coordenadas colorimétricas, entre las que se destacan las pertenecientes a los espacios de color RGB, CIE-XYZ y CIELab; permitiendo su interrelación mediante la utilización de matrices de transformación (Cortés and Chiralt, 2008).



**Figura 4.** Instrumentación para el análisis y procesado de imagen (Tárrega, 2011).

Tras el análisis de imagen es necesario el uso de softwares o modelos matemáticos para transformar las coordenadas RGB de las imágenes a un espacio de color cromático como el CIELab para el posterior análisis de los resultados. El inconveniente principal de este método es el control de las condiciones lumínicas que a diferencia del colorímetro pueden variar debido a múltiples factores. Además requiere de una automatización importante y el procesamiento de información es lento (Tárrega, 2011) pero posee numerosas ventajas puesto que su medición es no destructiva y objetiva, permite analizar la superficie global de la muestra y por tanto observar la evolución de color total de forma que se pueden procesar muestras de mayor tamaño siendo así un método más sencillo, versátil y económico (Padrón et al., 2016).

## **2 OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de una metodología que permita detectar con fiabilidad y rapidez la aptitud de las variedades para su uso en productos de cuarta gama o mínimamente procesados en función de su tendencia a la oxidación. Además, como objetivos secundarios se evaluó la influencia del estado de maduración en la tendencia oxidativa, con el objetivo de que sirva de base también en los trabajos de fenotipado orientados a la elucidación de las bases genéticas que regulan esta capacidad (estudios de asociación genética) que se llevan a cabo dentro del grupo de Fruticultura y Viticultura.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

En este trabajo se han utilizado 15 variedades diferentes de manzano del banco de germoplasma de la Universidad Pública de Navarra. El material empleado se muestra en la *Tabla 1*, eran árboles sobre un patrón M111 formados en vaso y con 9 años de edad.

**Tabla 1.** Información de las variedades de manzano empleadas en el estudio.

| Código | Accesión | Nombre            | Origen    |
|--------|----------|-------------------|-----------|
| 02.05  | RFMZ024  | M111              | -         |
| 03.18  | BGM0137  | Errotz-02         | Arakil    |
| 04.03  | BGM0220  | Aranache-11       | Aranache  |
| 08.10  | BGM0015  | Erremedio Sagarra | Baztan    |
| 08.21  | BGM0045  | Botil Sagarra     | Oitz      |
| 09.04  | BGM0024  | Kamutx Gorrilla   | Bera      |
| 09.25  | BGM0087  | Naranjina         | Anue      |
| 10.18  | BGM0116  | Iturmendi-01      | Iturmendi |
| 11.18  | BGM0176  | Agostera          | Izalzu    |
| 12.17  | BGM0212  | Aranache-03       | Aranache  |
| 12.27  | BGM0237  | Narcue-01         | Lana      |
| 14.02  | BGM0006  | Ezti-Beltza       | Baztan    |
| 15.15  | BGM0145  | La Amarilla       | Arakil    |
| 17.21  | BGM0005  | Burdinche         | Baztan    |
| 19.21  | BGM0240  | Viloria-03        | Lana      |

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Toma de muestras

En septiembre de 2018, en torno a la época de madurez de recolección, se tomó una muestra de 60 frutos para cada una de las variedades indicadas en la *Tabla 1*. Se seleccionaron frutos de todas las posiciones y orientaciones de los árboles; interior, exterior, zona alta, baja, más insolada, menos insolada, este, oeste, etc. al objeto de tener una muestra heterogénea en estados de maduración. De esta forma era posible obtener una alta variabilidad en rangos de maduración con el propósito de analizar la influencia de dichos estados sobre el nivel de oxidación.

Los frutos se conservaron hasta el momento de su análisis en una cámara frigorífica a 2 °C para poder procesar las muestras en lotes y, así incrementar aún más el rango de variabilidad ya que el tiempo transcurrido entre análisis permitía el desarrollo de la maduración de los frutos.

### 3.2.2 Determinación del estado de madurez

Entre septiembre y noviembre, con frecuencia semanal, se tomaron de cada variedad muestras heterogéneas de 10 frutos (por tamaño, color, madurez, etc.) con el fin de racionalizar los análisis.

Para evaluar el estado de madurez de los frutos, se utilizó la parte superior de los mismos para realizar las siguientes determinaciones:

#### a) Firmeza

Este parámetro se determinó mediante la presión ejercida con un puntal de 11 mm utilizando un penetrómetro digital Agrostal4Field (Agrosta Instruments, Francia) acompañado de un soporte manual para homogeneizar y agilizar la toma de medidas. Estas se realizaron justo por encima del ecuador para no alterar la zona en la que posteriormente se tomaron las fotos. Se efectuaron en los lados opuestos de la manzana y la firmeza se expresó como la media de las dos medidas.

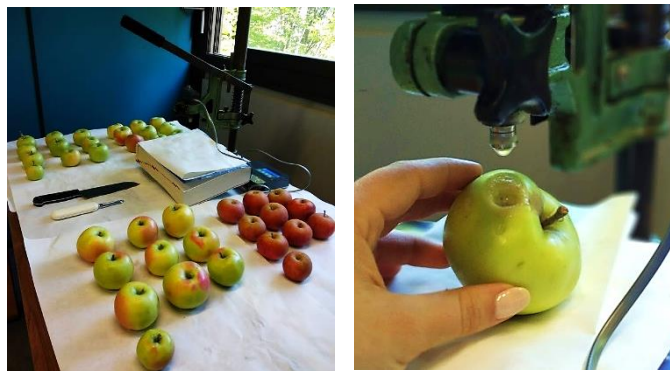


Figura 5. Instrumentación y momento del análisis de la firmeza.

#### b) Índice de almidón

Una vez determinada la firmeza, se realizó un corte transversal por el ecuador a cada manzana. Empleando las mitades superiores, se llevó a cabo la prueba del almidón descrita por (Ctifl, 2002).

En primer lugar, se vertió la solución de Lugol P.Gram al 3% sobre una bandeja llenándola a una altura de 1 cm. A continuación, se sumergieron los frutos durante 1 minuto aproximadamente y después se retiraron y colocaron sobre papel de filtro, con la cara teñida expuesta hacia arriba para su secado. Tras pasar un tiempo de 5-10 minutos, se realizó la lectura de los frutos clasificándolos según el tipo de regresión, radial (R) o circular (C) y su índice de almidón asignando valores numéricos del 1 al 10 dependiendo del grado de madurez que presentaran. Se tomaron como referencia las figuras de Ctifl (2002) mostradas en el Anexo 1.



Figura 6. Muestras durante y después de la prueba de almidón.

### 3.2.3 Determinación de la oxidación

Con las mitades inferiores de los frutos empleados para determinar la madurez se llevaron a cabo distintos análisis para observar la evolución del nivel de oxidación de los frutos. Las medidas se determinaron de las siguientes maneras:

#### a) Colorímetro

Tras el momento del corte realizado para la prueba de almidón, se dispusieron 10 frutos por variedad sobre una barquilla con alveolos para facilitar su transporte. Inmediatamente después se tomaron dos medidas de un fruto representativo de cada variedad con el colorímetro Konica Minolta modelo CR-400 y el iluminante estándar C (luz de día). Se midió una zona con un pardeamiento visiblemente mayor y otra con menor pardeamiento (evitando en ambas zonas pardeamientos por un fallo en el corte, hendiduras o sobremaduración) con el fin de obtener las coordenadas de color  $L^*a^*b^*$  de ambas. Dichas medidas se tomaron en el momento tras el corte y el posterior a la fotografía digital (cada 5 minutos hasta el minuto 30 y cada 10 minutos hasta el 60) procurando colocar el colorímetro en las mismas posiciones.

#### b) Fotografía

La medida principal se realizó mediante un análisis de imagen con una cámara Olympus OM-D MK II y un objetivo de 30 mm 1:3.5 MACRO. El set estaba complementado con una iluminación proporcionada por dos focos Nanguang CN-576 C ajustados para luz blanca y calibrados en la posición central de la escala de potencia.

El análisis se llevó a cabo a partir de los frutos colocados anteriormente en las barquillas, incluyendo un blanco estándar junto a ellos como se observa en la Figura 7. Posteriormente, se tomaron fotografías digitales de alta resolución de cada barquilla en intervalos como se ha mencionado anteriormente de 5 minutos hasta el minuto 30 y de 10 minutos hasta el 60.





Figura 7. Momento del análisis de imagen para una de las variedades.

### 3.2.4 Análisis de datos

#### a) Obtención de color $L^*a^*b^*$ por análisis de imagen

En las fotografías se normalizó el balance de blancos tomando como referencia el blanco estándar colocado junto a las muestras como se observa en la *Figura 8*. Para ello se utilizó el software RawTherapee 5.1 (Horváth and Development Team 2017).

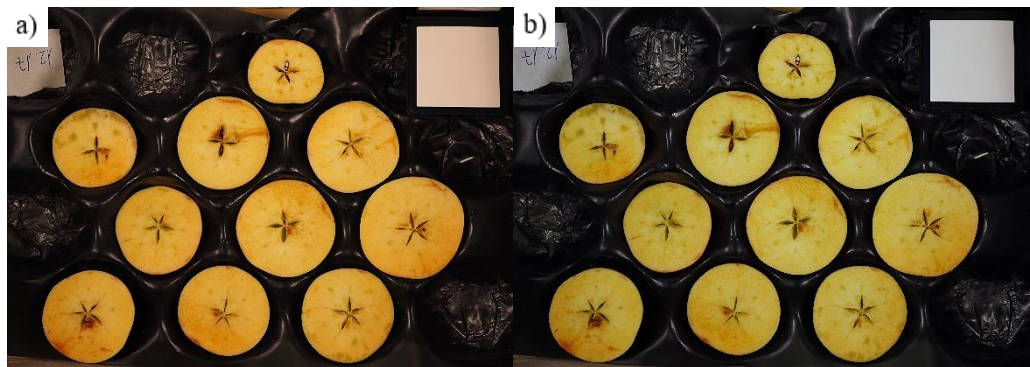
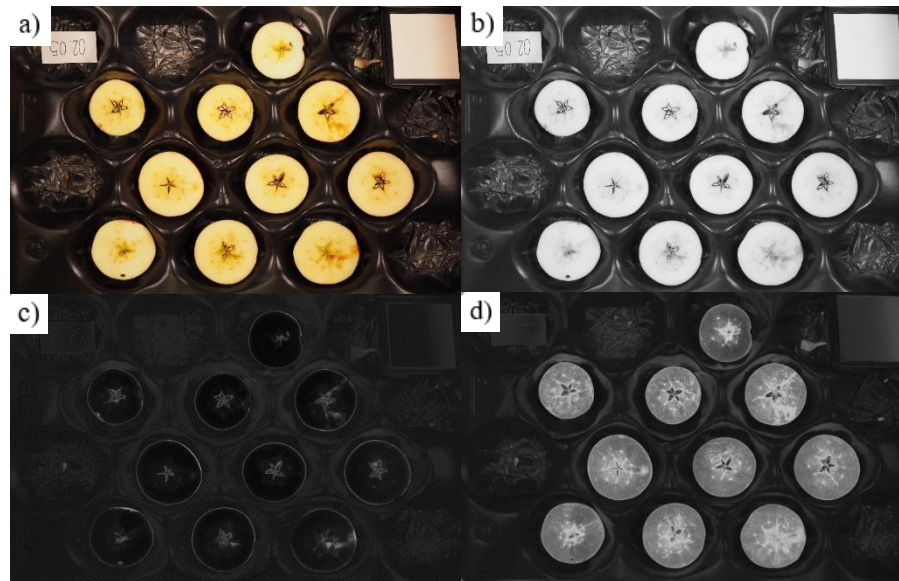


Figura 8. a) Ejemplo de imagen antes de la corrección de blancos y b) la misma imagen tras la unificación del nivel de blancos.

Las imágenes normalizadas se procesaron con la distribución Fiji (Schindelin et al., 2012) de ImageJ permitiendo obtener los valores de las coordenadas de color  $L^*a^*b^*$ . Se utilizó la función *RGB to CIELAB* que permite la transformación de valores numéricos a un espacio de color mediante una escala de grises. De esta forma la imagen (*Figura 9a*) se convierte en otras tres adicionales en escalas de grises en las que la intensidad de gris corresponde al valor de las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de la imagen original (*Figura 9b,c,d*, respectivamente). Posteriormente, en cada una de las imágenes transformadas se obtuvo manualmente para cada uno de los frutos el valor medio de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  utilizando la herramienta de selección circular.



**Figura 9.** Imágenes obtenidas con Fiji; a) unificada los niveles de blanco, b) coordenada L\*, c) coordenada a\* y d) coordenada b\*.

## b) Determinación del pardeamiento

La evolución del nivel de oxidación de los frutos se determinó a partir de la diferencia total de color definida como  $\Delta E$ . Esto quiere decir que la variación de los parámetros de color L\* la luminosidad (0 = negro y 100 = blanco) y a\* y b\* las coordenadas cromáticas (+a = rojo y -a = verde / +b = amarillo y -b = azul) era relativa a dos momentos, uno de ellos siempre el tiempo 0 (inmediatamente después del corte) y el tiempo final. El cálculo de  $\Delta E$  se realizó a partir de la siguiente formulación (Sharma and Bala, 2002; Holderbaum et al., 2010; Valencia, 2011):

$$\Delta E^*_T = \sqrt{(L_T^* - L_0^*)^2 + (a_T^* - a_0^*)^2 + (b_T^* - b_0^*)^2}$$

Donde:

$L_T^*$ : Valor de L\* de la muestra tras el corte (T= 5,10,15,20,25,30,40,50,60).

$L_0^*$ : Valor de L\* inicial de la muestra en el momento de corte (T=0).

$a_T^*$ : Valor de a\* de la muestra tras el corte (T= 5,10,15,20,25,30,40,50,60).

$a_0^*$ : Valor de a\* inicial de la muestra en el momento de corte (T=0).

$b_T^*$ : Valor de b\* de la muestra tras el corte (T= 5,10,15,20,25,30,40,50,60).

$b_0^*$ : Valor de b\* inicial de la muestra en el momento de corte (T=0).

### c) Relaciones entre parámetros

- **Determinación del momento más adecuado tras el corte para evaluar el nivel de pardeamiento**

A partir de la información recopilada se evaluó cual podría ser el momento idóneo en el que habría que tomar la medición de oxidación, de forma que ya se hubiera producido la mayor parte del cambio de color. Se consideró ese momento como aquel en el que al menos el 90 % del cambio total de color observado al cabo de una hora se había alcanzado. Debido al nivel de volumen de análisis se realizó únicamente para las dos variedades que mostraron un comportamiento extremo, es decir, la que más se había oxidado al cabo de una hora y la que menos.

- **Determinación de la influencia del estado de maduración sobre el nivel de pardeamiento**

Se evaluó la relación entre el estado de madurez evaluado respectivamente por la firmeza y el índice de almidón sobre la diferencia total de color ( $\Delta E$ ) producida hasta el momento determinado en el apartado anterior. Para ello se realizaron regresiones lineales de cada variedad mediante el programa RStudio versión 1.1.463 (RStudio Team, 2016) y además se representaron gráficamente.

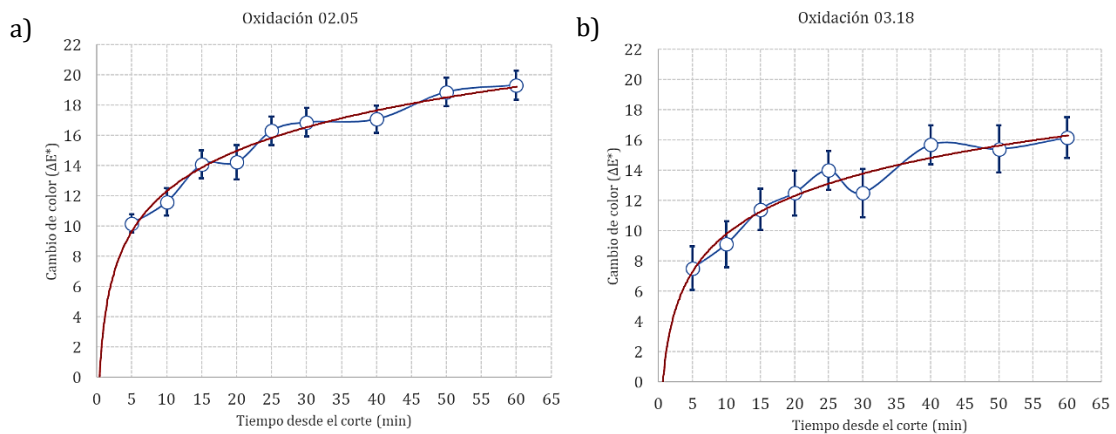
- **Clasificación de las variedades en función de su nivel de pardeamiento**

Para cada variedad, con los frutos que se consideraron de un nivel de maduración adecuado para el análisis, se realizaron gráficos de cajas y bigotes para el nivel de oxidación ( $\Delta E$ ). Se realizó un gráfico empleando los frutos cribados en función cada uno de los índices de maduración. Adicionalmente, se utilizó la metodología descrita por Royo et al. (2017) para determinar el número de clases para cada uno de los índices así como sus respectivos límites. También con esta metodología, se emplearon únicamente aquellos frutos comprendidos en los rangos de madurez establecidos para la firmeza y el índice de almidón independientemente. En cada variedad se depuró la información, prescindiendo de los valores atípicos, de tal manera que la muestra fuera homogénea. Posteriormente para cada factor (firmeza o índice de almidón), se obtuvo el valor de la diferencia mínima que discrimina clases diferentes y se estableció el número de clases que se pueden diferenciar para un determinado carácter, así como los valores que marcan los límites de cada clase.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DEL MOMENTO MÁS ADECUADO TRAS EL CORTE

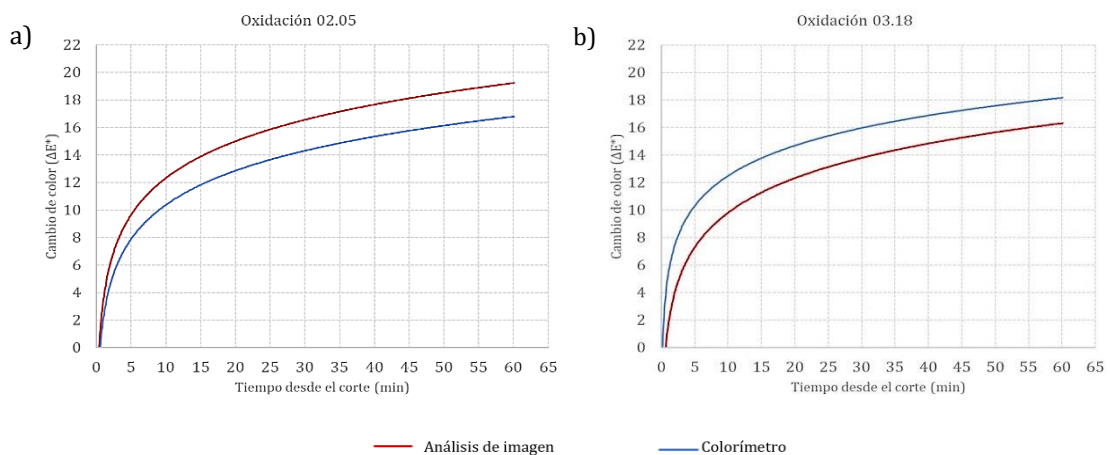
Las curvas de oxidación determinadas mediante análisis de imagen desde el tiempo de corte para la variedad más oxidativa (02.05) y la que menos (03.18) se muestran en la *Figura 10*. En la curva se presentan los valores medios de  $\Delta E$  y las desviaciones.



**Figura 10.** Evolución del pardeamiento de los frutos mediante análisis de imagen para dos variedades de manzano diferente: a) la más oxidativa y b) la menos oxidativa (cada punto representa la media y desviación de 60 frutos).

Tal como se ve en la figura, la oxidación aumenta muy rápido en los primeros minutos y hacia la media hora se estabiliza. En las dos variedades alrededor de los treinta minutos ya se había alcanzado el nivel de oxidación total considerado adecuado (90% en 02.05 y 88% en 03.18).

Las curvas de oxidación determinadas tanto por análisis de imagen como por colorímetro desde el tiempo de corte para las mismas variedades se muestran en la *Figura 11*.



**Figura 11.** Evolución del pardeamiento de los frutos mediante análisis de imagen y colorímetro para dos variedades de manzano diferente: a) la más oxidativa y b) la menos oxidativa.

Como se muestra en la figura, el patrón de oxidación resultante tanto del análisis de imagen como del colorímetro es muy similar para las dos variedades. También se observa que el 90% del nivel de pardeamiento determinado con el colorímetro se alcanzó aproximadamente en el mismo tiempo que utilizando el análisis de imagen. Por ello, se puede considerar que empleando cualquiera de las dos metodologías, el nivel de oxidación total se logra alrededor de la media hora. No obstante, los valores medios del cambio de color total obtenidos mediante ambos métodos no son equiparables ya que en uno de ellos se evalúa la superficie global de la muestra (10 frutos), y en otro se mide la zona más pardeada y la que menos de la superficie de uno de los diez frutos. Sin embargo, aunque con el colorímetro se analizaran todos los frutos en varios puntos de cada uno, las medidas podrían seguir difiriendo de la total por la diferencia de control de las condiciones de luz y porque las medidas de cada fruto no tienen por qué coincidir con la media del todo el fruto (Yam and Papadakis, 2004). Además, el tiempo necesario para tomar tal volumen de datos con el colorímetro es muy alto y dado que ambos métodos muestran un patrón similar de evolución del pardeamiento, es preferible el análisis de imagen ya que la toma es más rápida y permite evaluar una muestra mayor en condiciones similares (tiempo tras el corte) especialmente si se desea hacer evaluaciones de la rapidez de oxidación (como se ve en la figura, la oxidación es muy rápida en los primeros minutos) (Padrón et al., 2016).

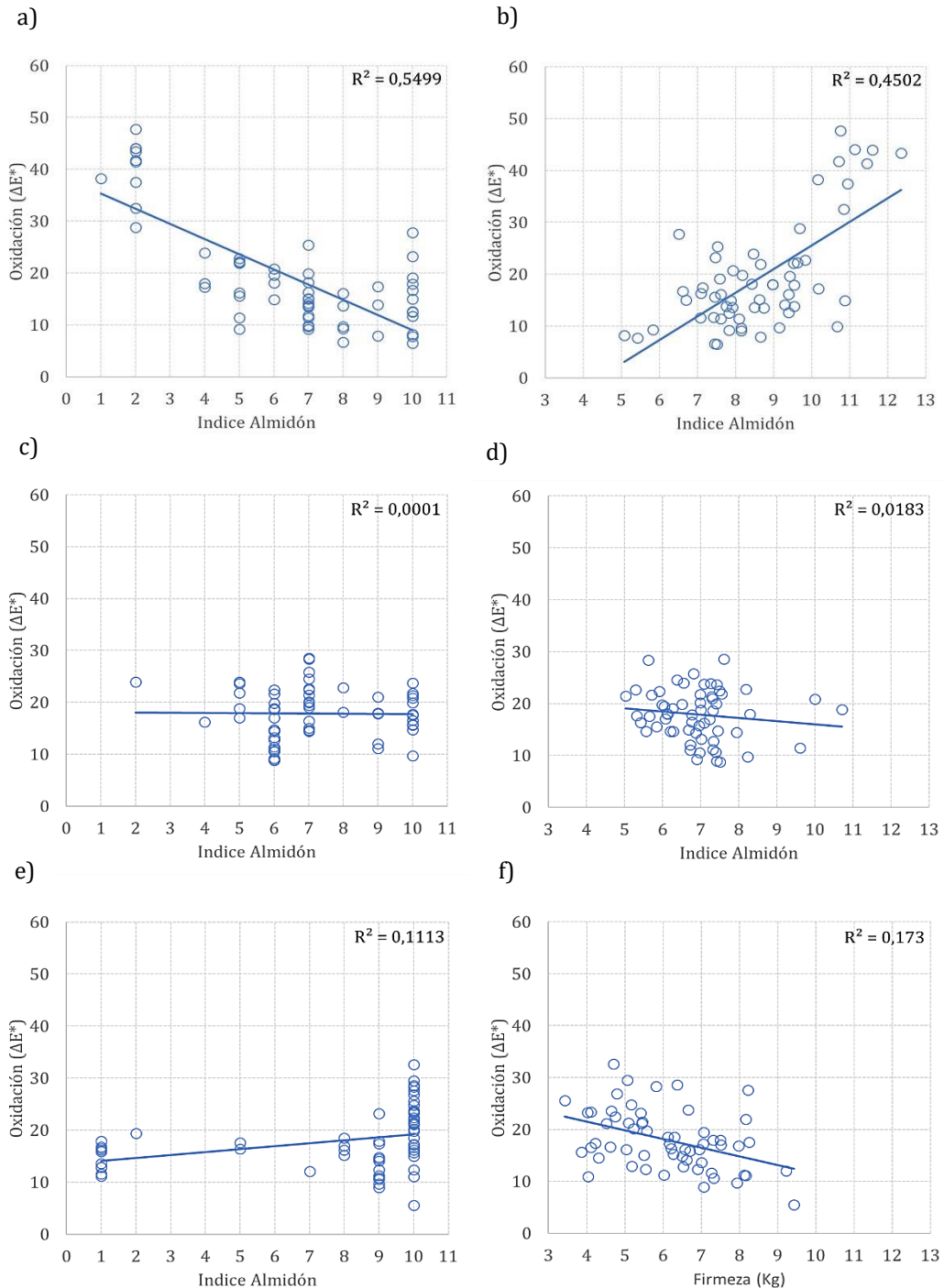
En ambos casos, el resultado es muy similar al que se ha obtenido en estudios anteriores como el de Burke (2010), en él se muestra que en variedades comerciales (*Autumn Crisp*, *Cortlan*, *Gala*, *Golden Delicious*, *Honey Crisp*, *Liberty* o *Zestar*) la mayoría del cambio de color se producía en torno a los 30 minutos. Por lo tanto, en el resto del trabajo se utilizó la variación de color media hora tras el momento de corte.

## 4.2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL ESTADO DE MADURACIÓN SOBRE EL NIVEL DE OXIDACIÓN

Se buscaron las relaciones entre la maduración y el nivel de oxidación y se encontró que las variedades podían clasificarse en tres perfiles de respuesta distintos. En la *Figura 12* se muestran las regresiones para tres de las variedades empleadas, las más representativas dentro de cada uno de los tres tipos de perfil y en el Anexo 1 se presentan todas:

- **Tipo 1, variedades cuya oxidación decrece conforme el nivel de maduración.** Muestran una clara relación entre la oxidación y el nivel de maduración medido tanto por el índice de almidón como por la firmeza. Por lo tanto, cuanto mayor es la maduración en la manzana estimada con cualquiera de los dos parámetros (mayor índice de almidón y menor firmeza) el nivel oxidación decrecía. A este grupo corresponden siete de las variedades estudiadas, que se muestran en la *Tabla 2*.
- **Tipo 2, variedades cuya oxidación se ve poco afectada por el nivel de maduración.** En estas variedades no se evidencia una relación entre los parámetros de maduración y el nivel de oxidación. Cinco de las variedades estudiadas que se presentan en la *Tabla 2* corresponden a este grupo.

- **Tipo 3, variedades en las que el nivel de oxidación es más alto en frutos maduros.** Existe una ligera tendencia a que los frutos maduros se oxiden más que los inmaduros, pero la influencia no es tan clara ya que la pendiente de la relación no es tan pronunciada como en el Tipo 1. Este grupo está formado por tres de las variedades estudiadas.



**Figura 12.** Nivel de oxidación ( $\Delta E^*$ ) de frutos de las variedad 09.04 (a,b), 12.17 (c,d) y 15.15 (e,f) respectivamente según el índice de almidón (a,c,e) y la firmeza (b,d,f) de los frutos (n=60).

En la *Tabla 2* se presentan los coeficientes de determinación y los valores de significación de las rectas de ajuste de cada una de las variedades.

**Tabla 2.** Estadísticos de las regresiones lineales entre el nivel de maduración y oxidación de las variedades de manzano clasificadas por su comportamiento oxidativo.

| Comportamiento | Variedad | Firmeza |                | Almidón |                |
|----------------|----------|---------|----------------|---------|----------------|
|                |          | p-value | R <sup>2</sup> | p-value | R <sup>2</sup> |
| <b>Tipo 1</b>  | 03.18    | 0,008   | 0,117          | 0,022   | 0,088          |
|                | 04.03    | 0,002   | 0,159          | 0,813   | 0,001          |
|                | 09.04    | < 0,001 | 0,451          | < 0,001 | 0,551          |
|                | 09.25    | < 0,001 | 0,445          | 0,004   | 0,163          |
|                | 10.18    | 0,002   | 0,153          | 0,136   | 0,038          |
|                | 11.18    | 0,003   | 0,141          | < 0,001 | 0,222          |
|                | 19.21    | < 0,001 | 0,428          | 0,008   | 0,114          |
| <b>Tipo 2</b>  | 08.10    | 0,013   | 0,102          | 0,921   | 0,005          |
|                | 08.21    | < 0,001 | 0,209          | 0,587   | 0,005          |
|                | 12.17    | 0,303   | 0,018          | 0,936   | < 0,001        |
|                | 12.27    | 0,169   | 0,034          | 0,368   | 0,017          |
|                | 14.02    | 0,694   | 0,002          | 0,240   | 0,024          |
| <b>Tipo 3</b>  | 02.05    | 0,002   | 0,155          | 0,464   | 0,009          |
|                | 17.21    | 0,001   | 0,171          | 0,213   | 0,027          |
|                | 15.15    | 0,001   | 0,173          | 0,009   | 0,111          |

En las variedades de Tipo 1, la maduración tiene una influencia generalmente significativa o muy significativa ( $p < 0,01$ ) sobre el nivel de oxidación medida tanto por el índice de almidón como por la firmeza. No obstante, esta relación tiende a ser mejor cuando se evalúa a partir de la firmeza. Debido a la alta variabilidad entre frutos, los índices de determinación ( $R^2$ ) son relativamente bajos (0,1 – 0,55). Además, observando tanto la *Figura 11* como el *Anexo 1*, se vio que a partir de un nivel de maduración superior a 7 para el índice de almidón e igual o inferior a 6 para la firmeza, el nivel de oxidación evolucionaba poco.

Para las variedades Tipo 2, el nivel de oxidación no se veía influido por el estado de maduración porque o bien la significación era nula ( $p > 0,05$ ) o bien cuando la significación existía el grado de ajuste ( $R^2$ ) era muy bajo ( $< 0,2$ ).

Finalmente, en las variedades pertenecientes al Tipo 3 las relaciones eran generalmente significativas para la firmeza, pero no para el almidón y además el grado de ajuste ( $R^2$ ) era muy bajo ( $< 0,175$ ). Se puede observar (*Figura 12, Anexo 1*), que, a partir de un nivel de maduración superior a 6 para el índice de almidón e igual o inferior a 7 para la firmeza, la variación del nivel de oxidación es pequeña.

Aunque no ha sido objeto de este trabajo estudiar los contenidos en polifenoles ni la actividad de la polifenoloxidasas, los motivos por los que se encuentran diferentes perfiles de oxidación podrían residir en diferencias en la composición de las manzanas en estos parámetros. Los resultados presentados en la literatura acerca de las relaciones entre el pardeamiento y la actividad de la PPO y / o el contenido fenólico son controvertidos. Vámos-Vigyázó et al. (1985), citado por Murata, Noda, and Homma (1995), encontraron que el

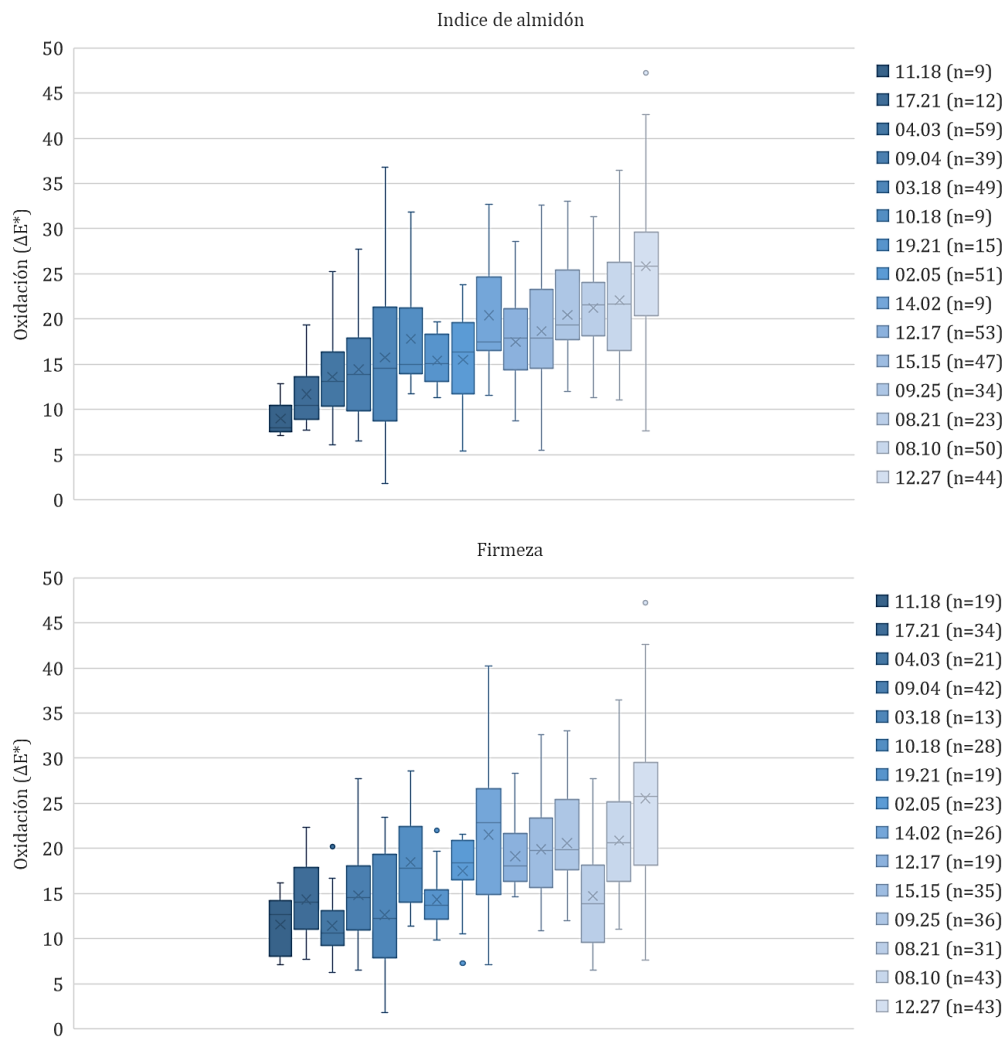
pardeamiento dependía de la PPO mientras que Harel, Mayer, and Shain (1966), citado por Murata, Noda, and Homma (1995), informaron que ambos factores eran determinantes en la oxidación. Posteriormente Coseteng y Lee (1987), citado por Rocha and Morais (2002), obtuvieron una correlación directa entre la actividad de la PPO y el nivel de oxidación ( $R^2 = 0,83$ ) y, por otro lado, encontraron una alta correlación entre el contenido fenólico total y el grado de pardeamiento ( $R^2 = 0,99$ ) lo cual dependía de los cultivares.

### **4.3 CLASIFICACIÓN DE LAS VARIEDADES EN FUNCIÓN DE SU NIVEL DE OXIDACIÓN**

#### **4.3.1 Utilizando diagramas de cajas y bigotes**

Como se ha indicado en el apartado anterior, en algunas variedades el estado de maduración influye notablemente sobre la capacidad oxidativa en otras lo hace poco o muy poco. Cuando se trata de conocer el potencial de una nueva variedad se desconoce como se ve influida por el estado de maduración, por lo tanto, si se emplean siempre frutos con el estado de maduración adecuado para las variedades en las que influya, se obtendrá un valor comparable en todo tipo de variedades. Por ello, en este apartado se han empleado únicamente los frutos de cada variedad que poseían un estado de maduración lo suficientemente homogéneo y apropiado para clasificarlos y poder comparar las variedades entre sí. Se llevo a cabo, de forma independiente con frutos con un nivel de maduración superior a 6 para el índice de almidón e igual o inferior a 7 para la firmeza, ya que no había un tamaño de muestra suficiente para hacer esta evaluación con frutos que cumplieran los dos requisitos al mismo tiempo. En la *Figura 13* se indica de manera gráfica por orden creciente de la mediana el número de frutos de la muestra ( $n=60$ ) empleados en cada variedad, así como la variabilidad en cada conjunto de datos.





**Figura 13.** Distribución del nivel de oxidación ( $\Delta E$ ) de las variedades según el índice de almidón y la firmeza.

Como se puede observar en la figura, gran parte de las variedades presentan una dispersión alta que podría deberse a que el tamaño de la muestra es relativamente reducido. No obstante, las diferencias sobre todo entre las variedades extremas son lo suficientemente grandes como para que se puedan considerar diferentes. Además, observando el percentil 75 de la variedad menos oxidativa y el percentil 25 de la que más tanto para el índice de almidón como para la firmeza, no se cruzan por lo que se puede considerar distintas y que por lo tanto existen diferencias varietales. Si se sigue el método empleando sólo el índice de almidón se obtiene un rango de oxidación muy amplio ya que desde la variedad menos oxidativa (11.18) y la que más (12.27) la mediana se incrementa de 7 a 25, es decir, hay una diferencia del triple entre la que más y la que menos se oxida. Si se utiliza la firmeza como único criterio de maduración, la situación y la ordenación de variedades es similar para la mayoría de las variedades y la diferencia entre la que más y menos se oxida es en este caso del doble. Como se ve en la *Figura 13*, las variedades no toman una ordenación exactamente igual si se considera el índice del almidón y la firmeza por separado como criterio para determinar la maduración más adecuada. Por tanto, lo más conveniente sería tener en cuenta ambos. Como ya se ha indicado, en este trabajo, dicho

análisis no se ha llevado a cabo puesto que el tamaño de muestra resultante era muy pequeño (< 10 frutos por variedad).

#### 4.3.2 Utilizando una clasificación por categorías

Aplicando el método de Royo et al. (2017) en frutos con un nivel de maduración tal y como se ha descrito previamente, en función del índice del almidón o de la firmeza se han obtenido la siguientes clases para cada parámetro:

**Tabla 3.** Clasificación por categorías según el nivel de oxidación.

|                          | Baja    | Media         | Alta    |
|--------------------------|---------|---------------|---------|
|                          | 1       | 2             | 3       |
| <b>Índice de almidón</b> | < 12,14 | 12,24 – 19,56 | > 19,56 |
| <b>Firmeza</b>           | < 13,77 | 13,77 – 21,40 | > 21,40 |

Los límites de las categorías son amplios, en torno a 7 según el índice de madurez considerado, lo que refleja de nuevo una alta variabilidad en el nivel de oxidación de los frutos de cada variedad. Sin embargo, el método ha permitido establecer tres categorías claramente diferenciables en ambos casos, que corresponden a una oxidación alta, baja y media. Por lo tanto, aunque estas categorías son provisionales, se comprueba la viabilidad del método. Si se estandariza la toma de muestras empleando frutos en cantidad suficiente y con el nivel de maduración adecuado, se podría afinar una clasificación precisa de variedades de manzano según el nivel de oxidación que presenten.

#### 4.4 PROPUESTA DE PROTOCOLO Y RECOMENDACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE FRUTOS CORTADOS DE MANZANA

Con los resultados obtenidos en este trabajo se propone que el protocolo con el que deberían realizarse las determinaciones es el siguiente:

- 1. Recogida de muestras.** Los frutos deberían ser recolectados atendiendo a su nivel de maduración, que deberá ser superior a 6 para el índice de almidón e igual o inferior a 7 para la firmeza. De esta forma se obtiene una muestra más homogénea que facilita la comparación de variedades.
- 2. Determinación de la firmeza.** La altura de bajada del penetrómetro puede estar limitada por el tamaño de las manzanas por lo que en el caso de tener frutos de tamaño reducido es necesario un soporte/plataforma rígida para alcanzar la altura de penetración del puntal. También es importante la inmovilización de la muestra para obtener resultados más precisos y óptimos.

3. **Corte de los frutos.** Es recomendable el empleo de material afilado o herramientas que permitan realizar un corte limpio. Además, es conveniente un soporte de sujeción del fruto para evitar cortes irregulares ya que puede existir una diferencia de pardeamiento en la carne de los frutos referidas al momento del corte por diferentes razones:
  - a. El corte no es adecuado, por ejemplo, si se realiza a la altura del orificio donde se midió la firmeza.
  - b. En el corte se alcanza el endocarpio, tejido que rodea a las semillas, por lo que dependiendo si los opérculos están más o menos cerrados (puede ser una característica varietal), estas podrían ser arrastradas del corte creando un rasgamiento de la superficie y originando el ennegrecimiento de la carne.
  - c. La diferencia de maduración en distintas zonas de una misma manzana o por daños mecánicos son otro motivo de la diferencia de color en la superficie.
  
4. **Preparación de la muestra para el análisis de imagen.** Es recomendable colocar los frutos en soportes que garanticen la comodidad y seguridad en el transporte de la muestra como las barquillas con alveolos (comúnmente empleadas en el transporte industrial de fruta) ya que dependiendo del tipo de soporte puede suponer el movimiento de los frutos, incluso la pérdida de su lugar (por ejemplos si se sitúan sobre un papel o bandejas de plástico). Además, esta colocación puede dar lugar a la creación de sombras originando diferencias de luz en la fotografía También es conveniente secar la superficie con anterioridad y asegurarse previamente que el ajuste de luz es óptimo dado que se ha visto que influye la humedad de la muestra ya que refleja la luz. De igual manera se ha de tener en cuenta la iluminación a la hora de fotografiar ya que un nivel elevado de luz puede saturar las fotografías y distorsionar los resultados.
  
5. **Momento de toma de imágenes.** Si se desea caracterizar el nivel de oxidación máximo habría que tomar fotos en el momento de corte y a la media hora. Si se desea ver la rapidez de pardeamiento, sería recomendable tomar fotos cada cinco minutos durante la primera hora tras el corte.
  
6. **Procesado de imágenes.** En este tipo de investigaciones existe una gran cantidad de datos a procesar por lo que se considera un trabajo laborioso. Previamente es recomendable valorar la relación tiempo/costes o automatizar el proceso.

## **5 CONCLUSIONES**

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

- Se puede caracterizar adecuadamente el nivel de pardeamiento de manzanas a partir de análisis de imagen con fotografías tomadas en el momento de corte y media hora después de este.
- Se ha encontrado que el nivel de maduración influye sobre el nivel de oxidación de forma distinta según la variedad. Hay algunas que se ven muy influidas y otras poco o muy poco. Por lo tanto, en ausencia de información previa, todas las variedades deberían recolectarse en un estado de maduración suficiente que en este trabajo se ha encontrado que corresponde a una firmeza inferior o igual a 7 y un índice de almidón superior a 6.
- Se ha descrito un protocolo para la caracterización de forma estandarizada del potencial oxidativo de variedades de manzana.
- Se han podido clasificar las 15 variedades del estudio en tres categorías por su potencial oxidativo. Las clases encontradas son preliminares pero la aplicación del protocolo propuesto con un tamaño de muestra por variedad suficiente permitiría obtener una clasificación objetiva y precisa de las variedades.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo Giménez, Encarna, Simó Alegre Castellví, Francisco Artés Calero, et al. (2014). Evaluación no destructiva de la calidad e implementación en la industria frutícola, vol.III. Víctor Hugo Escalona Contreras, Andrea Hinojosa Moreno, Eva Cristina Correa Hernando, and Margarita Ruiz Altisent, eds. Madrid: E.T.S.I. Agrónomos (UPM). <http://oa.upm.es/23292/>.
- Alonso-Salces, Rosa M., Carlos Herrero, Alejandro Barranco, et al. (2005). Classification of Apple Fruits According to Their Maturity State by the Pattern Recognition Analysis of Their Polyphenolic Compositions. *Food Chemistry* 93(1): 113–123.
- Amiot, M. J., M. Tacchini, S. Aubert, and J. Nicolas. (1992). Phenolic Composition and Browning Susceptibility of Various Apple Cultivars at Maturity. *Journal of Food Science* 57(4): 958–962.
- Artés, F., M. Castañer, and M.I. Gil. (1998). Revisión: Pardeamiento Enzimático En Frutas y Hortalizas Mínimamente Procesadas. Revisión: Enzimático Pardo En Frutas y Vegetales Mínimamente Procesados. *Food Science and Technology International* 4(6): 377–389.
- Baixauli, Helena. (N.d.). Factores precosecha que afectan a la calidad de frutas y hortalizas. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/189-mayo-2007/factores-precosecha-que-afectan-a-la-calidad-de-frutas-y-hortalizas>.
- Barreiro, Pilar, and Margarita Ruiz-Altisent. (1996). Propiedades Mecánicas y Calidad de Frutos. Definiciones y Medidas Instrumentales., 77. [http://oa.upm.es/5379/1/Barreiro\\_17.pdf](http://oa.upm.es/5379/1/Barreiro_17.pdf).
- Brezmes, Jesús. (2001). Diseño de una nariz electrónica para la determinación no destructiva del grado de la maduración de la fruta. Ph.D. Thesis, Universitat Politècnica de Catalunya. <http://www.tdx.cat/handle/10803/6877>.
- Burda, Stanislaw, Wieslaw Oleszek, and Chang Y. Lee. (1990). Phenolic Compounds and Their Changes in Apples during Maturation and Cold Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(4): 945–948.
- Burke, Andrea Elaine. (2010). Quantifying Flesh Browning, Polyphenoloxidase, Total Phenolic Content and Vitamin C in Select Apple Varieties and Progeny. Cornell University.

- Camacho, Jennifer Katusca Castro, Néstor Enrique Cerquera Peña, and Nelson Gutiérrez Guzmán. (2013). Determinación del color del exocarpio como indicador de desarrollo fisiológico y madurez en la guayaba pera (*Psidium guajava* cv. Guayaba pera), utilizando técnicas de procesamiento digital de imágenes. *Revista EIA* 10(19): 79–89.
- Camelo, Andrés F. López. (2003). Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas del campo al mercado. Food & Agriculture Org. <http://www.fao.org/3/y4893s/y4893s00.htm>.
- Cortés, Misael, and Amparo Chiralt. (2008). Cinética de los cambios de color en manzana deshidratada por aire fortificada con vitamina E. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica* 15(1): 8–16.
- Coseteng, M. Y., and C. Y. Lee. (1987). Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning. *Journal of Food Science* 52(4): 985–989.
- Ctifl. (2002). Ctifl - Code Amidon Pomme.
- Díaz, Oscar Alejandro Bohórquez. (2003). Guía para post cosecha y mercadeo de productos agrícolas, vol.118. Convenio Andres Bello.
- García, Luis, Mónica Herrero, and Álvaro González. (2010). Tecnología de La Elaboración de Sidra. Equipamiento Industrial. *In* Pp. 197–221.
- Gergoff, Gustavo E. (2016). Maduración e índices de cosecha. Aspectos Fisiológicos y Determinación de Estados de Madurez de Frutos.
- Ginjuan, Maria Inmaculada Viñas Almenar, Josep Usall Rodie, Gemma Echeverria Cortada, Jordi Graell Sarle, Isabel Lara Ayala, Divina Inmaculada Recasens. (2013). Poscosecha de pera, manzana y melocotón. Mundi-Prensa Libros.
- Guardo, Mario Di, Alice Tadiello, Brian Farneti, et al. (2013). A Multidisciplinary Approach Providing New Insight into Fruit Flesh Browning Physiology in Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *PLOS ONE* 8(10): e78004.
- Harel, E., A. M. Mayer, and Y. Shain. (1966). Catechol Oxidases, Endogenous Substrates and Browning in Developing Apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17(9): 389–392.

- Holderbaum, Daniel Ferreira, Tomoyuki Kon, Tsuyoshi Kudo, and Miguel Pedro Guerra. (2010). Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development. *HortScience* 45(8): 1150–1154.
- Horváth, Gábor, and Development Team. (2017). RawTherapee. Linux/FreeBSD/Windows/OS XPlurilingüe. <http://rawpedia.pixls.us/RawPedia.pdf>.
- Iglesias, Rocío Bardón, Susana Belmonte Cortés, Fernando Fúster Lorán, et al. (2012). El sector de frutas y hortalizas en la comunidad de Madrid características de calidad actitudes y percepción del consumidor: 100.
- Iguarán, Eduardo Javid Corpas, and Omar Alberto Tapasco Alzate. (N.d.). Hallazgos de la biosíntesis del etileno en frutas climatéricas y de los factores que afectan la ruta metabólica: 18.
- Jurado Teixeira, Bertha, Isabel Mercedes Aparcana Ataurima, Leydi Steffani Villarreal Inca, et al. (2016). Evaluación Del Contenido de Polifenoles Totales y La Capacidad Antioxidante de Los Extractos Etanólicos de Los Frutos de Aguaymanto (*Physalis Peruviana* L.) de Diferentes Lugares Del Perú. *Revista de La Sociedad Química Del Perú* 82(3): 272–279.
- Kader, Adel A. (2002). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 3rd edition. Oakland, Calif: University of California Agriculture and Natural Resources.
- Kondo, Satoru, Kazuhiko Tsuda, Norio Muto, and Jin-etsu Ueda. (2002). Antioxidative Activity of Apple Skin or Flesh Extracts Associated with Fruit Development on Selected Apple Cultivars. *Scientia Horticulturae* 96(1): 177–185.
- Laurila, Eira, Riitta Kervinen, and Raija Ahvenainen. (1998). The Inhibition of Enzymatic Browning in Minimally Processed Vegetables and Fruits: Review. *Postharvest News and Information* 9(4): 53N–66N.
- León, Katherine, Domingo Mery, Franco Pedreschi, and Jorge León. (2006). Color Measurement in L\*a\*b\* Units from RGB Digital Images. *Food Research International* 39(10). Physical Properties VI: 1084–1091.
- Lunadei, Loredana, Pamela Galleguillos, Belén Diezma, Lourdes Lleó, and Luis Ruiz-García. (2011). A Multispectral Vision System to Evaluate Enzymatic Browning in Fresh-Cut Apple Slices. *Postharvest Biology and Technology* 60(3): 225–234.

- Luo, Y., and G.V. Barbosa-Cánovas. (1997). Enzymatic Browning and Its Inhibition in New Apple Cultivars Slices Using 4-Hexylresorcinol in Combination with Ascorbic Acid / Pardeamiento Enzimático y Su Inhibición En Rodajas de Manzanas de Nuevas Variedades Utilizando 4-Hexilresorcinol En Combinación Con Ácido Ascórbico. *Food Science and Technology International* 3(3): 195–201.
- Martínez-Ballesta, M Carmen, Luis López-Pérez, Maria Mercedes, et al. (2007). *Agricultural Practices for Enhanced Human Health*, vol.7.
- Martínez-González, Mónica Elizabeth, Rosendo Balois-Morales, Irán Alia-Tejagal, et al. (2017). Poscosecha de frutos: maduración, ablandamiento y control transcripcional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (19): 4089–4101.
- Melgarejo, Luz Marina, Mauricio Romero, Soledad Hernández, et al. (2010). Experimentos en fisiología vegetal. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/content/laboratorios/fisiologiavegetal/documentos/Libro\\_experimentos\\_en\\_fisiologia\\_y\\_bioquimica\\_vegetal\\_Reparado.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/content/laboratorios/fisiologiavegetal/documentos/Libro_experimentos_en_fisiologia_y_bioquimica_vegetal_Reparado.pdf),
- Murata, Masatsune, Makiyo Nishimura, Nanae Murai, et al. (2001). A Transgenic Apple Callus Showing Reduced Polyphenol Oxidase Activity and Lower Browning Potential. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65(2): 383–388.
- Murata, Masatsune, Ikuko Noda, and Seiichi Homma. (1995). Enzymatic Browning of Apples on the Market: Relationship between Browning, Polyphenol Content, and Polyphenol Oxidase. *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI* 42(10): 820–826.
- Murata, Masatsune, Mie Tsurutani, Masami Tomita, Seiichi Homma, and Katsuyoshi Kaneko. (1995). Relationship between Apple Ripening and Browning: Changes in Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(5): 1115–1121.
- Nicolas, J. J., F. C. Richard-Forget, P. M. Goupy, M. J. Amiot, and S. Y. Aubert. (1994). Enzymatic Browning Reactions in Apple and Apple Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34(2): 109–157.
- Padrón, Carlos Alberto, Gisel Marié Padrón, Adriana Isabel Montes, and Rafael Antonio Oropeza. (2016). *Determinación del color en muestras de alimentos*. 1st edition. Venezuela.
- Parzanese, Téc Magali. (N.d.). *Vegetales Mínimamente Procesados*: 10.



- Peñuela, Aída Esther. (2004). Cambios físicos y químicos que ocurren durante crecimiento y maduración de los productos hortofrutícolas y su relación con la calidad: 26–31.
- Piedra, Felipe Jadán. (2017). Control Del Pardeamiento Enzimático En Manzanas Cortadas (Red Delicious) Mediante Un Sistema de Envasado Activo. *Enfoque UTE* 8(2): 66–77.
- Podsędek, A., J. Wilska-Jeszka, B. Anders, and J. Markowski. (2000). Compositional Characterisation of Some Apple Varieties. *European Food Research and Technology* 210(4): 268–272.
- Quevedo, Roberto, Oscar Díaz, Arnaldo Caqueo, Betty Ronceros, and J. M. Aguilera. (2009). Quantification of Enzymatic Browning Kinetics in Pear Slices Using Non-Homogenous L\* Color Information from Digital Images. *LWT - Food Science and Technology* 42(8): 1367–1373.
- Quevedo, Roberto, Marcela Jaramillo, Oscar Díaz, Franco Pedreschi, and José Miguel Aguilera. (2009). Quantification of Enzymatic Browning in Apple Slices Applying the Fractal Texture Fourier Image. *Journal of Food Engineering* 95(2): 285–290.
- Renard, Catherine M. G. C., Nathalie Dupont, and Pascale Guillermin. (2007). Concentrations and Characteristics of Procyanidins and Other Phenolics in Apples during Fruit Growth. *Phytochemistry* 68(8): 1128–1138.
- Rocha, A. M. C. N, and A. M. M. B Morais. (2001). Characterization of Polyphenoloxidase (PPO) Extracted from 'Jonagored' Apple. *Food Control* 12(2): 85–90. (2003). Shelf Life of Minimally Processed Apple (Cv. Jonagored) Determined by Colour Changes. *Food Control* 14(1): 13–20.
- Rocha, Ada M. C. N., and Alcina M. M. B. Morais. (2002). Polyphenoloxidase Activity and Total Phenolic Content as Related to Browning of Minimally Processed 'Jonagored' Apple. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(1): 120–126.
- Romero, F, M C Martínez Madrid, and M T Pretel. (2003). Factores Precosecha Determinantes de La Calidad y Conservación En Poscosecha de Productos Agrarios: 6.
- Royo, José Bernardo, and Carlos Miranda. (2019). La Maduración de Los Frutos.

- Royo, José Bernardo, Carlos Miranda, L. Gonzaga Santesteban, et al. (2017). Método armonizado para la caracterización pomológica del manzano (*Malus x domestica* Borkh) = Harmonized methodology for the pomological characterization of apple (*Malus x domestica* Borkh). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Monografías INIA. Agrícola, 29. Madrid: INIA.
- RStudio Team. (2016). RStudio: Integrated Development Environment for R. English. Boston, MA: RStudio, Inc. <http://www.rstudio.com/>.
- Salas, Carlos. (2015). Nuevo test para la detección y evaluación de anomalías en la visión del color. Universidad de Granada. <http://hdl.handle.net/10481/43552>.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, et al. (2012). Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods* 9(7): 676–682.
- Schmitz-Eiberger, Michaela, and Anne Matthes. (2011). Effect of Harvest Maturity, Duration of Storage and Shelf Life of Apples on the Allergen Mal d 1, Polyphenoloxidase Activity and Polyphenol Content. *Food Chemistry* 127(4): 1459–1464.
- Sharma, Gaurav, and Raja Bala. (2002). *Digital Color Imaging Handbook*. CRC Press.
- Singleton, V. L., and Joseph A. Rossi. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144–158.
- Tárrega, Amparo. (2011). *Técnicas Instrumentales Avanzadas En El Estudio y Control de Las Características Sensoriales de Alimentos*. Uruguay: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. <http://www.innova-uy.info/docs/presentaciones/20111013/AmparoTarrega.pdf>.
- Urbina, Valero. (2002). *La fructificación de los frutales*. 1st edition. Monografías de Fruticultura, 6. Lleida: Paperkite Editorial. <https://repositori.udl.cat/handle/10459.1/47020>.
- Valencia, Sandra. (2011). Cinética de la deshidratación y control de la oxidación en manzana Granny smith, mediante la aplicación de diferentes métodos de secado. *Revista Tumbaga* 1(6).

Vámos-Vigyázó, L, I Schuster-Gajzágó, V Nádudvari-Márkus, J Hámori-Szabó, and P Sass. (1985). Changes in the Polyphenol–polyphenol Oxidase Complex of Apples during Ripening and Storage. Part I: Variations Related to Cultivar, Year and Date of Picking. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm* 9: 37–47.

Yam, Kit L., and Spyridon E. Papadakis. (2004). A Simple Digital Imaging Method for Measuring and Analyzing Color of Food Surfaces. *Journal of Food Engineering* 61(1). *Applications of Computer Vision in the Food Industry*: 137–142.

Zapata, P.J., A Martínez-Esplá, D Valero, et al. (2019). Influencia del contenido fenólico y la actividad enzimática en el pardeamiento y aptitud comercial de 12 variedades de alcachofa. *Interempresas*. <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/234280-Influencia-contenido-fenolico-actividad-enzimatica-pardeamiento-aptitud-comercial-12.html>.



**ANEJO 1. TABLAS DE CONVERSIÓN DEL ALMIDÓN DE CTIFL**



## Pomme

### Code de régression de l'amidon

#### Starch conversion chart for apples

### type Circulaire (C) Circular type (C)

1C : légère décoloration centrale  
*Slight central discolouration*



2C - 3C - 4C : décoloration centrale, de la pièce de monnaie au "trèfle à 5 feuilles"  
*central discolouration, from "coin" to "5-leaved clover"*



5C - 6C - 7C : décoloration centrale croissante et taches dans la périphérie  
*increasing central discolouration with peripheral spots*



8C - 9C - 10C : décoloration croissante de la périphérie  
*increasing peripheral discolouration*





## Pomme

### Code de régression de l'amidon

#### Starch conversion chart for apples

### type Radial (R) Radial type (R)

1 R : légère décoloration centrale  
*Slight central discolouration*



2 R - 3R - 4R : décolorations radiales croissantes  
*Increasing radial discolourations*



5R - 6R - 7R : décoloration centrale croissante et fissuration de la périphérie  
*Increasing central discolouration with peripheral cracks*



8R - 9R - 10R : décoloration croissante de la périphérie  
*Increasing peripheral discolouration*

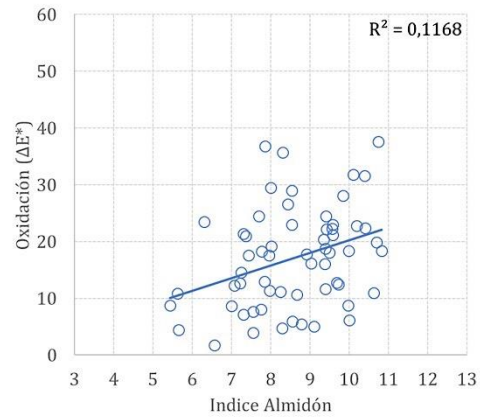
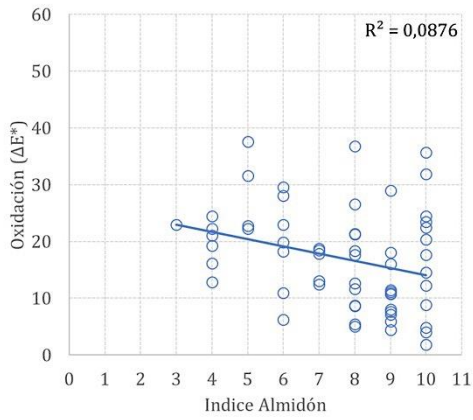


## **ANEJO 2. PERFILES DE OXIDACIÓN DE LAS VARIEDADES**

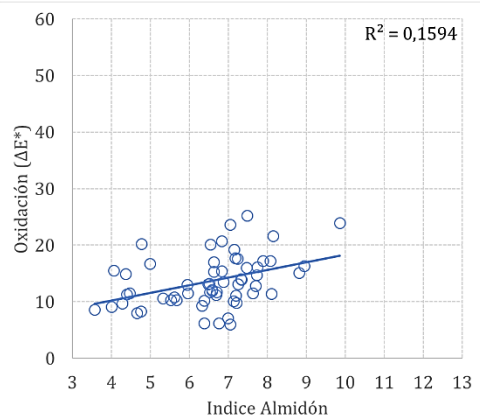
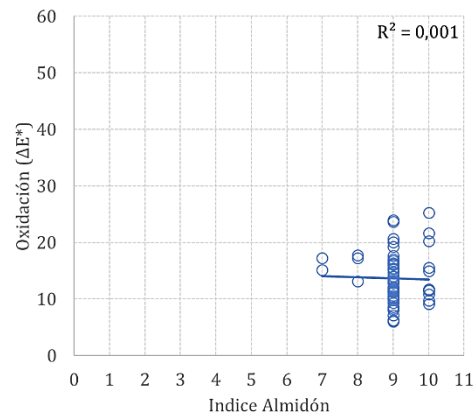


**TIPO 1. VARIEDADES CUYA OXIDACIÓN DECRECE CONFORME EL NIVEL DE MADURACIÓN**

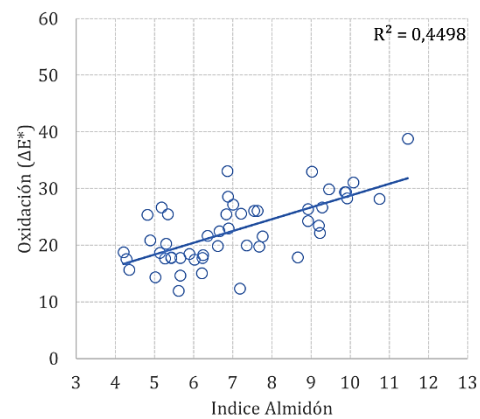
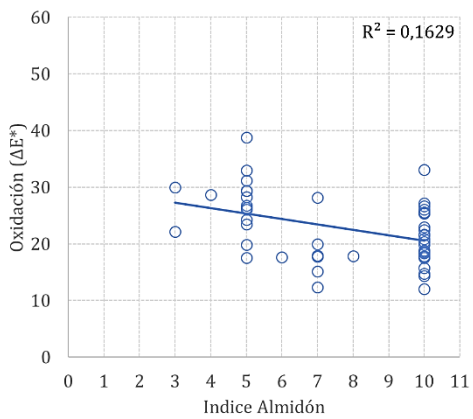
**03.18**



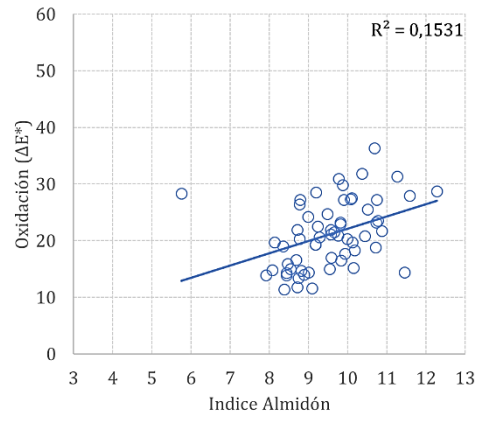
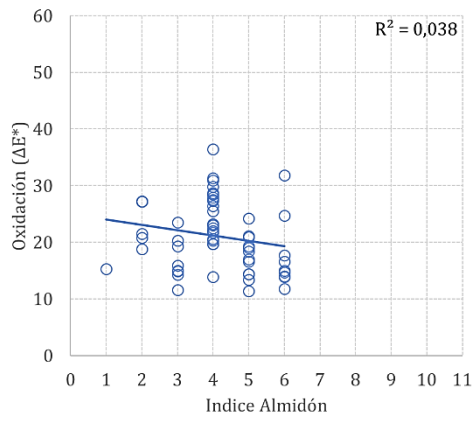
**04.03**



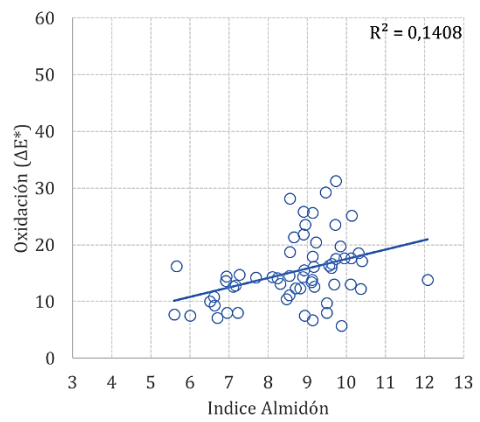
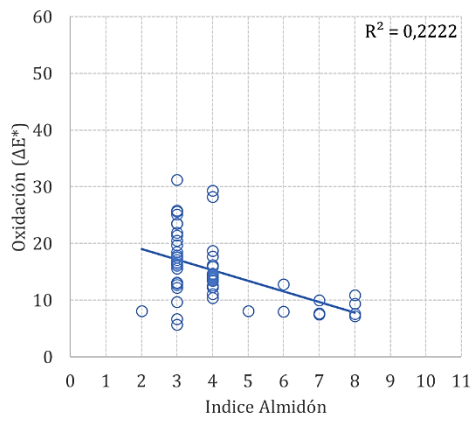
**09.25**



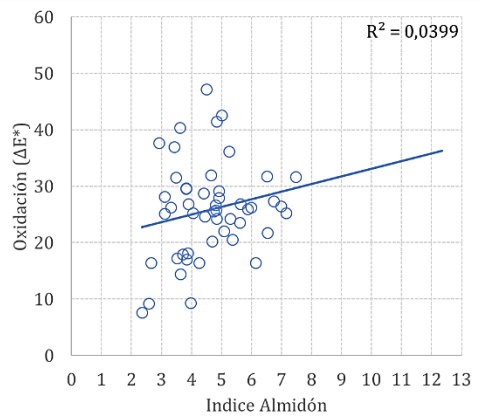
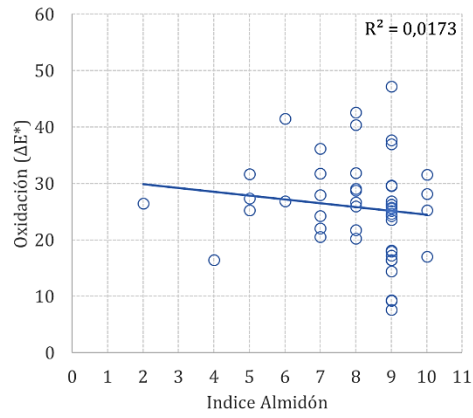
10.18



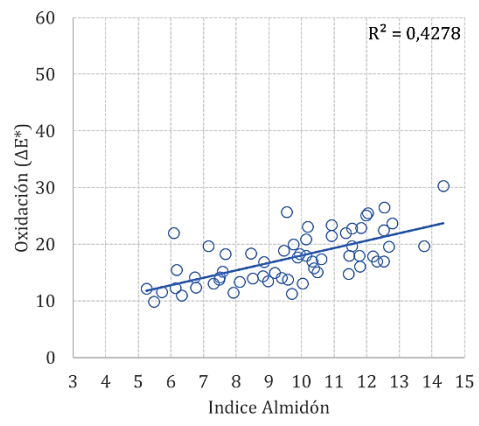
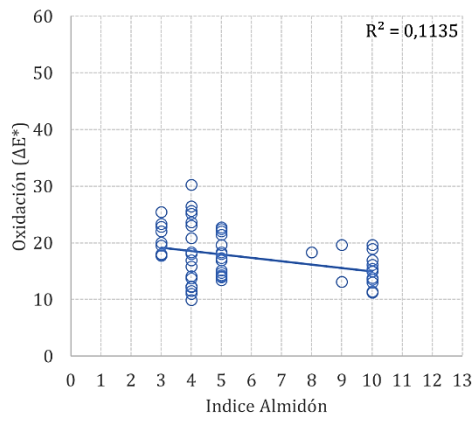
11.18



12.27

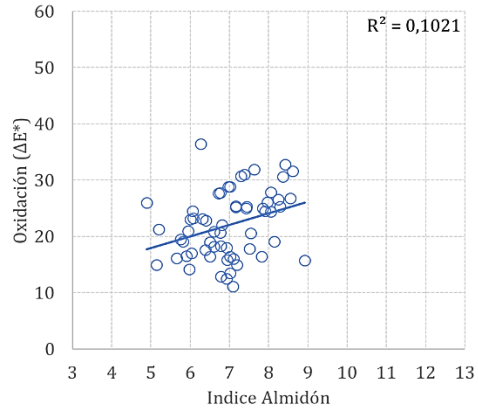
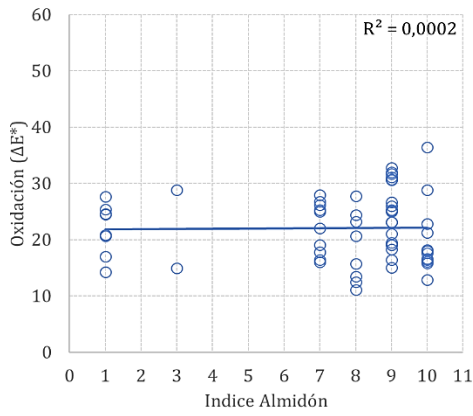


19.21

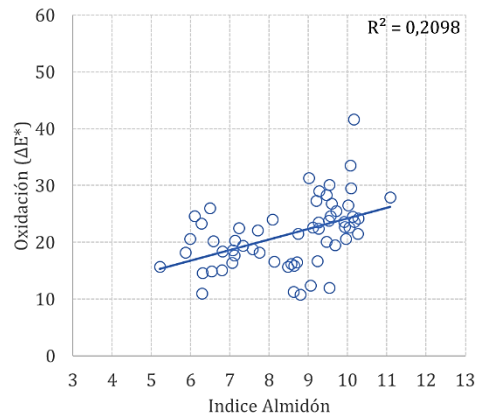
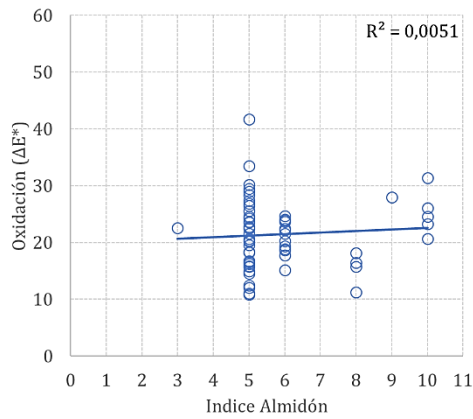


**TIPO 2. VARIEDADES CUYA OXIDACIÓN SE VE POCO AFECTADA POR EL NIVEL DE MADURACIÓN**

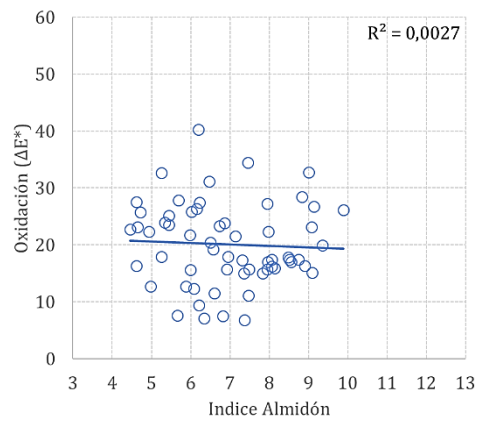
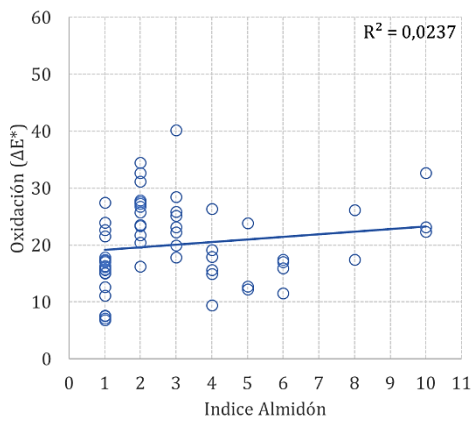
**08.10**



**08.21**

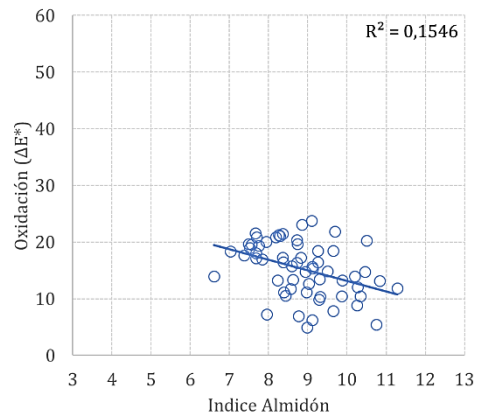
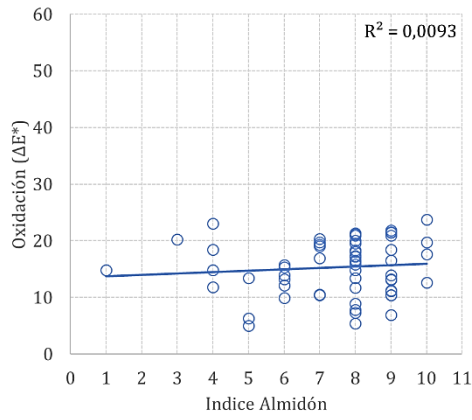


**14.02**



**TIPO 3. VARIEDADES EN LAS QUE EL NIVEL DE OXIDACIÓN ES MÁS ALTO EN FRUTOS MADUROS**

**02.05**



**17.21**

