Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Instrumentación y Control Automático).

# Procesamiento de imágenes implementado en FPGA para estimar licopeno y β-caroteno en tomate rojo y zanahoria.

Opción de titulación
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias (Instrumentación y Control Automático).

**Presenta:**
Ing. Omar Alejandro Zamudio Ramírez.

Dirigido por:
Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa

Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa
Presidente — Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Secretario — Firma

Dr. Edgar Alejandro Rivas Araiza
Vocal — Firma

Dr. Luis Miguel Contreras Medina
Suplente — Firma

Dr. Juan Fernando García Trejo
Suplente — Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio/2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

**La presente obra está bajo la licencia:**
**https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es**

# CC BY-NC-ND 4.0 DEED

## Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:

**Atribución** — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

**SinDerivadas** — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

**RESUMEN**

Las técnicas no invasivas presentan una gran variedad de ventajas con respecto a las técnicas invasivas-destructivas ya que estas últimas dañan total o parcialmente el fruto y/o planta, el análisis de imágenes resulta ser uno de los métodos no invasivos más populares, eficaces y rápidos para la estimación de los carotenoides licopeno y β-caroteno presentes en tomates y zanahorias que actúan como elementos anticancerígenos, debido a la capacidad de procesamiento necesaria cuando se utilizan estas técnicas se presenta aquí el diseño, integración y validación de un sistema mínimo para la estimación de estos carotenoides en tiempo real y de forma indirecta. El sistema utiliza una FPGA (Field Programmable Gate Array) EPC3C40Q240 encargada de la captura, almacenamiento, análisis de imágenes y presentación de resultados, la interpretación de las imágenes se hace en tiempo real (30 muestras por segundo) al aprovechar el paralelismo de procesos como principal característica de la tecnología FPGA, se indican detalladamente los pasos que fueron seguidos para que el diseño fuera el adecuado y que cumpliera con los requisitos necesarios en cuanto a capacidad de procesamiento, almacenamiento y fiabilidad. Por otro lado se describen los métodos de laboratorio utilizados para la calibración y validación del sistema, la técnica de Fish que utiliza un espectrofotómetro de UV-Vis y la técnica de ultracromatografía de convergencia ($UPC^2$), las muestras utilizadas fueron en fresco y corresponden a las variedades de haz y nantes para los tomates y zanahorias respectivamente. Se muestran los resultados de pruebas por cada uno de los módulos que comprenden el sistema (adquisición, almacenamiento, procesamiento de la imagen y desplegado de resultados) así como resultados que demuestran la fiabilidad del sistema.

(**Palabras clave**: UPC2, UV-Vis, tiempo real, no invasivo)

**SUMMARY**

Non-invasive techniques have a variety of advantages over invasive-destructive techniques as the latter partially or totally damaging the fruit and / or plant, image analysis is one of the most popular, effective and fast non-invasive methods for estimating the lycopene and β-carotene carotenoids present in tomatoes and carrots acting as anticancer elements, due to the processing capacity needed when these techniques are used is presented here the design, integration and validation of a minimal system for estimation of these carotenoids in real time and indirectly. The system uses an FPGA (Field Programmable Gate Array) EPC3C40Q240 responsible for the capture, storage, image analysis and presentation of results, interpretation of images is done in real time (30 samples per second) to exploit the parallelism of processes such as main characteristic of FPGA technology, stating in detail the steps that were followed for the design was appropriate and that meets the requirements in terms of processing power, storage and reliability. Furthermore the laboratory methods used for calibration and validation of the system, Fish technique using a UV-Vis spectrophotometer and ultra-chromatography convergence technique ($UPC^2$) are described. Samples used were fresh and correspond to haz and nantes varieties for tomatoes and carrots respectively. Test results for each of the modules comprising the system (acquisition, storage, image processing and unfolding of results) and results demonstrating the reliability of the system is shown.

(**Keywords**: $UPC^2$, UV-Vis, real time, non-invasive)

**"La gratitud, como ciertas flores, no se da en la altura y mejor reverdece en la tierra buena de los humildes"**

**– José Martí**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo y patrocinio a lo largo de todo el programa de la Maestría y para la realización de este proyecto de tesis.

# TABLA DE CONTENIDOS

**RESUMEN** ..... **2**

**SUMMARY** ..... **3**

**AGRADECIMIENTOS** ..... **5**

**TABLA DE CONTENIDOS** ..... **5**

**ÍNDICE DE TABLAS** ..... **8**

**ÍNDICE DE FIGURAS** ..... **9**

**1 INTRODUCCIÓN** ..... **12**

1.1 TRABAJOS RELACIONADOS ..... 14
1.2 PRODUCTOS EN EL MERCADO ..... 18
*1.2.1 ColorFlex* ..... *18*
*1.2.2 LabScanXE* ..... *19*
*1.2.3 MiniScaXE* ..... *20*
1.3 JUSTIFICACIÓN ..... 21
1.4 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA ..... 22

**2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS** ..... **23**

2.1 HIPÓTESIS ..... 23
2.2 OBJETIVO GENERAL ..... 23
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES ..... 23

**3 MARCO TEÓRICO** ..... **24**

3.1 FPGA ..... 24
3.2 ESPACIOS DE COLOR ..... 24
*3.2.1 Espacio de color RGB* ..... *25*
*3.2.2 Espacio de color CMY* ..... *27*
*3.2.3 Espacio de color YIQ* ..... *27*
*3.2.4 Espacio de color YCbCr* ..... *28*
*3.2.5 Espacio de color HSI* ..... *29*
*3.2.6 Espacio de color XYZ* ..... *30*
*3.2.7 Espacio de color CIELAB* ..... *32*
3.3 SEGMENTACIÓN DE IMÁGENES ..... 38
3.4 EL B-CAROTENO ..... 41
3.5 EL LICOPENO ..... 42
3.6 DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES ..... 43
*3.6.2 Técnica de Fish* ..... *46*
3.6.2.1 Método de extracción: ..... 46
3.6.2.2 Método espectrofotométrico para determinación de licopeno ..... 47
3.6.2.3 Método para la determinación de β-caroteno en zanahoria: ..... 48
*3.6.3 Técnica por cromatografía* ..... *48*

**4 METODOLOGÍA** ..... **50**

4.2 DISEÑO E INTEGRACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA ..... 51
*4.2.2 Principales requerimientos del sistema* ..... *51*
*4.2.3 Sensor APS- Toshiba TCM8230MD* ..... *52*

*4.2.4 Memoria SRAM- CYPRESS CY7C1370D ... 53*
*4.2.5 Monitor VGA- Multek 9928DPTL070H-01 ... 54*
*4.2.6 FPGA- CYCLONE III EP3C40Q240C8N ... 55*
*4.2.7 Consideraciones para el diseño del sistema ... 57*
4.2.7.1 Voltajes de Alimentación ... 57
4.2.7.2 Relojes y Módulos PLL ... 58
4.2.7.3 Bancos de entrada y salida I/O ... 59
4.2.7.4 Configuración de la FPGA ... 60
4.2.7.4.1 Encendido ... 60
4.2.7.4.2 Reset ... 61
4.2.7.4.3 Configuración ... 61
4.2.7.4.4 Error de Configuración ... 61
4.2.7.4.5 Inicialización ... 61
4.2.7.4.6 Modo Usuario ... 62
4.2.7.4.7 Configuración JTAG ... 65
4.2.7.4.8 Programar la EP3C40Q240C8N con SFL ... 66
4.2.7.4.9 Generar y cargar el archivo .jic para el SFL ... 67
4.2.7.5 Diseño del PCB ... 68
4.2.7.5.1 Conexión de las fuentes de alimentación ... 68
4.2.7.5.2 Conexión de la memoria SRAM ... 69
4.2.7.5.3 Esquemático monitor VGA ... 70
4.2.7.5.4 Sensor APS ... 71
4.2.7.5.5 Configuración de la FPGA EP3C40Q240C8N ... 71
4.2.7.5.6 PCB ruteado ... 74
4.3 PRUEBAS DE LABORATORIO. ... 75
*4.3.1 Prueba por cromatografía ... 75*
4.3.1.1 Fase preparativa: extracción ... 75
4.3.1.1.1 Preparación de la muestra ... 76
4.3.1.1.2 Desarrollo del método de extracción ... 77
4.3.1.2 Fase analítica: separación e identificación ... 80
4.3.1.2.1 Desarrollo del método cromatográfico ... 80
**5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN ... 83**
5.1 DISEÑO E INTEGRACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA ... 83
5.2 PRUEBAS DE LABORATORIO ... 86
*5.2.1 Fase preparativa: extracción ... 86*
*5.2.2 Fase analítica: Identificación y cuantificación ... 89*
5.2.2.1 Desarrollo del método cromatográfico ... 89
5.3 MODELO ESTADÍSTICO. ... 95
5.4 VALIDACIÓN DEL SISTEMA. ... 96
5.5 ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA. ... 99
5.6 CONCLUSIONES. ... 100
**6 BIBLIOGRAFÍA ... 101**

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3-1. ILUMINACIÓN PARA EL ESTÁNDAR DE OBSERVACIÓN CIE 2º (HUNTERLAB, 2008). 37
TABLA 3-2. ILUMINACIÓN PARA EL ESTÁNDAR DE OBSERVACIÓN CIE 10º (HUNTERLAB, 2008). 37
TABLA 3-3. B-CAROTENO EN ALGUNAS FRUTAS (WALJI, 2007) ..... 42
TABLA 3-4. CAROTENOIDES CON FUNCIÓN DE PROVITAMINA A Y SIN FUNCIÓN DE PROVITAMINA A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) ..... 44
TABLA 4-1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS TCM8230MD ..... 53
TABLA 4-2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CY7C1370D ..... 54
TABLA 4-3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MULTEK ..... 55
TABLA 4-4. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS EP3C40Q240C8N ..... 55
TABLA 4-5. FRECUENCIAS MÁXIMAS ..... 56
TABLA 4-6. CARACTERÍSTICAS EPCS16 ..... 63
TABLA 4-7. LONGITUD Y CAPACITANCIA RECOMENDADAS (ALTERA CORPORATION, 2012A) 65
TABLA 4-8. REGULADORES DE TENSIÓN ..... 68
TABLA 4-9. MÉTODO #1 ..... 79
TABLA 4-10. MÉTODO #2 ..... 79
TABLA 4-11. MÉTODOS PROBADOS PARA LA SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LICOPENO Y B-CAROTENO 81
TABLA 5-1. RECURSOS UTILIZADOS ..... 86
TABLA 5-2. MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA MÁS ADECUADO PARA LA SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES POR MEDIO DE ULTRACROMATOGRAFÍA DE CONVERGENCIA ..... 89
TABLA 5-3. VALORES DE LABORATORIO ..... 95
TABLA 5-4. RESULTADOS DE VALIDACIÓN. ..... 97
TABLA 5-5. RESULTADOS ESPECTROFOTÓMETRO. ..... 99
TABLA 5-6. ANÁLISIS DE VARIANZA ..... 99

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1. LECTURAS DE COLOR EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE MADURACIÓN. ..... 18
FIGURA 1-2. COLORFLEX (ZAMUDIO-RAMÍREZ, 2013)..... 19
FIGURA 1-3. LABSCANXE (ZAMUDIO-RAMÍREZ, 2013). ..... 20
FIGURA 1-4. MINISCANXE (ZAMUDIO-RAMÍREZ, 2013)..... 21
FIGURA 3-1. ESPACIO DE COLOR RGB..... 26
FIGURA 3-2. ESPACIO DE COLOR CMY ..... 27
FIGURA 3-3. ESPACIO DE COLOR YIQ..... 28
FIGURA 3-4. ESPACIO DE COLOR YCBCR. ..... 29
FIGURA 3-5. ESPACIO DE COLOR HSI ..... 30
FIGURA 3-6. ESPACIO DE COLOR XYZ ..... 32
FIGURA 3-7. REPRESENTACIÓN DEL ESPACIO DE COLOR CIELAB (HUNTERLAB, 2008)..... 33
FIGURA 3-8. REPRESENTACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE OBSERVACIÓN DE 2º Y 10º (HUNTERLAB, 2008). ..... 34
FIGURA 3-9. CAMPOS RELATIVOS DE VISTA DE LOS ESTÁNDARES DE OBSERVACIÓN DE 2º Y 10º (HUNTERLAB, 2008). ..... 34
FIGURA 3-10. EJEMPLOS DE ILUMINACIONES (HUNTERLAB, 2008)..... 35
FIGURA 4-1. UBICACIÓN ESPACIAL CAMPUS AMAZCALA ..... 50
FIGURA 4-2. DIAGRAMA A BLOQUES DE LA PLATAFORMA ELECTRÓNICA..... 51
FIGURA 4-3. DISTRIBUCIÓN DE CLKS, PLLS Y GLKS (ALTERA CORPORATION, 2012A) ..... 59
FIGURA 4-4. DISTRIBUCIÓN DE BANCOS DE ENTRADA Y SALIDA I/O (ALTERA CORPORATION, 2012A) 60
FIGURA 4-5. DIAGRAMA DE TIEMPOS CONFIGURACIÓN AS (LICÓN-GUTIÉRREZ ET AL., 2012) 62
FIGURA 4-6. CONFIGURACIÓN AS (ALTERA CORPORATION, 2012A) ..... 64
FIGURA 4-7. CONFIGURACIÓN JTAG (ALTERA CORPORATION, 2012A)..... 66
FIGURA 4-8. CONFIGURACIÓN SFL (ALTERA CORPORATION, 2012A) ..... 67
FIGURA 4-9. DIAGRAMA DE CONEXIÓN REGULADOR 1.2 V..... 69
FIGURA 4-10. CONEXIONES DE LA MEMORIA SRAM..... 70
FIGURA 4-11. DISTRIBUCIÓN DE PINES MONITOR VGA..... 70
FIGURA 4-12. ESQUEMÁTICO DEL SENSOR APS ..... 71
FIGURA 4-13. USB-BLASTER LADO FPGA ..... 72

**FIGURA 4-14. USB-BLASTER LADO CONECTOR ..... 72**
**FIGURA 4-15. ESQUEMÁTICO EPCS16 ..... 73**
**FIGURA 4-16. CONEXIONES CRISTALES Y SENSOR APS ..... 73**
**FIGURA 4-17. BANCO I/O NÚMERO 3 ..... 74**
**FIGURA 4-18. RUTEO DEL PCB (ARRIBA IZQUIERDA), VISTA 3D DE LA CARA SUPERIOR (ARRIBA DERECHA)Y VISTA 3D DE LA CARA INFERIOR (ABAJO)..... 74**
**FIGURA 4-19. MATERIAL VEGETAL EN LOS 6 ESTADÍOS DE MADURACIÓN (IZQUIERDA), ESTUFA DE SECADO DE CONVECCIÓN FORZADA CON LA CUAL SE REALIZÓ LA OPERACIÓN DE SECADO (CENTRO) Y MATERIAL VEGETAL SELECCIONADO Y PROCESADO PARA LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES (DERECHA). ..... 77**
**FIGURA 4-20. SISTEMA DE ASFE® MV-10 (WATERS®, 2015) ..... 78**
**FIGURA 5-1. VISTA DE LA CARA SUPERIOR (IZQUIERDA). VISTA DE LA CARA INFERIOR (DERECHA). 83**
**FIGURA 5-2. SEÑALES DE PRUEBA DE LA MEMORIA SRAM ..... 84**
**FIGURA 5-3. PROCESO DE CONVERSIÓN DE RGB A CIELAB ..... 85**
**FIGURA 5-4. SEÑALES DEL PROCESO DE RECOLECCIÓN DE PIXELES..... 86**
**FIGURA 5-5. MUESTRA DE CÁSCARA DE TOMATE BOLA ESTADÍO 6 DESPUÉS DEL SECADO Y MOLIENDA, ANTES DE LA EXTRACCIÓN. ..... 87**
**FIGURA 5-6. DOS MUESTRAS SOMETIDAS AL MÉTODO #2 DESPUÉS DEL PRIMER CICLO DE EXTRACCIÓN, LA MUESTRA DE LA IZQUIERDA SE TRABAJÓ CON LA "MEZCLA DE FISH", MIENTRAS QUE LA DEL LADO DERECHO SE MANEJÓ CON HEXANOS..... 87**
**FIGURA 5-7. A LA DERECHA SE PUEDE OBSERVAR LA MUESTRA DESPUÉS DE 6 CICLOS DE EXTRACCIÓN CON HEXANOS, LA MUESTRA DE LA IZQUIERDA SE OBTUVO DESPUÉS 7 CICLOS CON LA "MEZCLA DE FISH" ..... 88**
**FIGURA 5-8. MUESTRAS SOMETIDAS AL MÉTODO #1 IZQ. MEZCLA DE FISH DER. HEXANOS (ARRIBA IZQUIERDA), MUESTRAS SOMETIDAS AL MÉTODO #2 IZQ. MEZCLA DE FISH DER. HEXANOS (ARRIBA DERECHA) Y MUESTRAS TRABAJADAS CON HEXANOS COMO CO-SOLVENTE IZQ. MÉTODO 2 DER. MÉTODO #1 (ABAJO)..... 88**
**FIGURA 5-9. LA IMAGEN MUESTRA UNA COMPARACIÓN ENTRE LA MATRIZ ANTES DE LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES (IZQ.), Y (DER.) LA MISMA MUESTRA SOMETIDA AL MÉTODO MÁS EFECTIVO DE EXTRACCIÓN (MÉTODO #2 CO-SOLVENTE: HEXANOS). ..... 89**
**FIGURA 5-10. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL CAROTENOIDE LICOPENO ..... 90**

**FIGURA 5-11. ESPECTRO DEL B-CAROTENO ..... 90**

**FIGURA 5-12. CROMATOGRAMAS DE LAS INYECCIONES DE ESTÁNDAR DE LICOPENO A DIFERENTES CONCENTRACIONES: 10 (IZQUIERDA), 20 (CENTRO) Y 40 PPM (DERECHA) ..... 91**

**FIGURA 5-13. CROMATOGRAMAS DE LAS INYECCIONES DE ESTÁNDAR DE B-CAROTENO A DIFERENTES CONCENTRACIONES: 10 (IZQUIERDA), 20 (CENTRO) Y 40 PPM (DERECHA) ..... 91**

**FIGURA 5-14. PRIMERA INYECCIÓN DE LA MUESTRA DE CÁSCARA DE TOMATE BOLA CORRESPONDIENTE AL ESTADÍO 6, EN EL CROMATOGRAMA SE PUEDEN IDENTIFICAR 2 PICOS EL PRIMERO CORRESPONDE AL B-CAROTENO CON UN TIEMPO DE RETENCIÓN (TR) DE 1.135, Y EL SEGUNDO AL LICOPENO CON UN TR DE RETENCIÓN (TR) DE 1.135 Y EL SEGUNDO DEL LICOPENO CON UN TR DE 1.521 MIN. ..... 92**

**FIGURA 5-15. SEGUNDA INYECCIÓN DE MUESTRA, AL MINUTO 1.140 SE OBSERVA EL BETACAROTENO Y LUEGO APARECE EL LICOPENO AL MINUTO 1.520 DE LA CORRIDA ..... 93**

**FIGURA 5-16. INYECCIÓN NÚMERO 3, EL TR DEL B-CAROTENO ES DE 1.144 MIENTRAS QUE EL DEL LICOPENO CORRESPONDE A 1.522 MIN..... 94**

**FIGURA 5-17. PRUEBAS DE LABORATORIO. ..... 97**

# 1 INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son una clase de pigmentos distribuidos generalmente en el reino vegetal encontrados principalmente en las partes aéreas de las frutas y verduras dando una coloración entre el amarillo (β-caroteno) y el rojo (licopeno). Los carotenoides se dividen en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β-caroteno y el licopeno), mientras que las xantofilas contienen además el oxígeno (por ejemplo la luteína). El β-caroteno es el mayor precursor de la vitamina A, la deficiencia de vitamina A es un gran problema de salud en más de 70 países, la mayoría ubicados en naciones en desarrollo (Rosati et al., 2000). El consumo de β-caroteno ha sido relacionado con la disminución de desórdenes neurodegenerativos gracias a su actividad antioxidante (Yusuf et al., 2012).

El licopeno y el β-caroteno son componentes con potentes propiedades antioxidantes que previenen la aparición de ciertos tipos de cáncer, estudios han comprobado el poder antioxidante de estos componentes, su ingestión protege contra la acción destructiva de los radicales libres que atacan las células produciendo enfermedades degenerativas, parecen reducir las probabilidades de cáncer de próstata, pulmón, estómago, vejiga, mama, cuello del útero y ayudan a mantener jóvenes a las personas durante más tiempo. En un análisis químico, los carotenoides pueden ser identificados gracias a métodos espectrofotométricos, el espectro visible de los carotenoides oscila en el rango de 400 a 500 nm, en tomate rojo se puede observar el licopeno en una longitud de onda de 503 nm (Fish et al., 2002), mientras que en las zanahorias a 449 nm, Biswas et al. (2011) determinaron la cantidad de β-caroteno en zanahorias utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 449 nm.

Actualmente existen distintas técnicas para medir atributos de las plantas y/o frutos como es el caso del licopeno y el β-caroteno en tomates y zanahorias, las cuales pueden ser catalogadas en tres tipos: invasivas destructivas, invasivas no destructivas y no invasivas. Las invasivas destructivas son aquellas que para obtener información es necesario destruir total o parcialmente el elemento a analizar, estas técnicas son muy utilizadas para el análisis de laboratorio, por otro lado las invasivas no destructivas son más utilizadas que las invasivas destructivas; sin embargo, en la mayoría de los casos interfieren con el crecimiento natural de las plantas, por último las no invasivas son aquellas en donde no se requiere contacto directo con el objetivo para poder obtener sus propiedades. Debido a las características de las técnicas usadas en la actualidad resulta más conveniente usar técnicas no invasivas para la estimación indirecta del licopeno y β-caroteno presentes en los tomates y zanahorias y uno de los métodos con mayor auge en el mundo científico, eficaz y rápido es el de la visión artificial, por medio de técnicas de procesamiento de las imágenes capturadas de los tomates y zanahorias es posible determinar la concentración de estos antioxidantes, sin embargo esto lleva a un reto importante en cuanto a la plataforma tecnológica a utilizar ya que algunos de los principales aspectos a considerar es la capacidad de procesamiento requerida para aplicar técnicas de procesamiento de imágenes debido al elevado consumo de recursos de procesamiento, el costo de la plataforma y por último la portabilidad y maniobrabilidad de la misma.

En el presente el uso de las tecnologías FPGA en la investigación y desarrollo de sistemas digitales aplicados para tareas específicas se ha incrementado de manera considerable, esto debido a las ventajas que las FPGAs tienen respecto a otros dispositivos programables, algunas de esas ventajas son la elevada frecuencia de reloj, alto número de operaciones por segundo, portabilidad del código, reusabilidad del código y librerías, bajo costo monetario, ejecución paralela de procesos, capacidad de interactuar con interfaces de alto y bajo nivel, seguridad y protección de la propiedad intelectual, entre otras (Ramos-Arregún et

al., 2012). Gracias a las características de las FPGAs es muy común su utilización para las tareas relacionadas a las señales e imágenes, sin embargo en muchos de los trabajos estas fungen con actividades de adquisición de datos (señales o imágenes) únicamente y en combinación con DSPs (Digital Signal Controller), que son los encargados de aplicar todas las operaciones matemáticas necesarias para llegar al resultado, forman plataformas en las que se eleva el precio por la utilización en combinación que conlleva a usar elementos extras.

## 1.1 Trabajos relacionados.

Koray y Saranli (2013) desarrollaron un diseño en hardware para el flujo óptico de alto desempeño basado en tecnología FPGA para aplicaciones de visión por computadora , el algoritmo de flujo óptico es popularmente utilizado en la visión artificial en aplicaciones de detección de colisión, segmentación de movimiento, rastreo, sustracción de fondo, odometría visual entre otros, el sistema electrónico estaba compuesto por una FPGA en donde se describían principalmente módulos de memorias, comunicaciones y del método del gradiente y promedio, por otro lado Kalomiros y Lygouras (2008) diseñaron y evaluaron un sistema de hardware/software para el procesamiento rápido de imágenes, compararon el desempeño de una FFT (Fast Fourier Transform) implementado en un sistema hibrido de hardware/software contra otros proveedores de software comercial, en donde los principales actores fueron la paquetería de software Labview de Texas Instruments y la arquitectura de hardware en una FPGA Cyclone II del fabricante Altera, obtuvieron resultados de mejor desempeño de sus sistema contra las paqueterías comerciales, otro ejemplo es la reconfiguración parcial dinámica del diseño de flujo y ambiente para imágenes y procesamiento de señales basado en FPGA hecho por Krill et al. (2010) en donde describieron una reconfiguración parcial dinámica (DPR) para imágenes y algoritmos de procesamiento de señales usados en aplicaciones adaptivas, también en México se han realizado trabajos de este tipo como el elaborado por Ibarra-Manzano y Almanza-Ojeda (2012) por ejemplo en donde presentaron una arquitectura en

FPGA para la clasificación de objetos basado en un algoritmo acelerador adaptivo, la arquitectura usaba los atributos de color y textura como atributos de entrada para discriminar objetos en una escena en tiempo real.

Muchas investigaciones se han centrado en el desarrollo de técnicas no invasivas para medir los atributos de las plantas. Gómez et al. (2007) desarrollaron una nariz electrónica la cual usa información aromática para predecir las etapas de madurez en los tomates. Al-Mallahi et al. (2010) desarrollaron un algoritmo para clasificar y separar papas que circulan en una banda transportadora junto con trozos de tierra. Liming y Yanchao (2010) desarrollaron un sistema automático capaz de separar fresas basándose en tres características: forma, tamaño y color. Mercado-Luna et al. (2010) desarrollaron un sistema que utiliza análisis de imágenes a color para determinar la concentración de nitrógeno en las hojas de las plantas de tomate. Min et al. (2008) diseñaron un sistema para predecir la concentración de nitrógeno en las hojas de naranja usando un espectrofotómetro. La mayoría de las aplicaciones físicas de los sistemas requieren operar en tiempo real. Estos sistemas típicamente son implementados como programas en computadoras de uso general, pero esto no se considera una solución de diseño adecuado. Dos plataformas son comúnmente utilizadas para realizar procesamiento de imágenes: los procesadores digitales de señales (DSP) y los FPGAs.

Stinco et al. ( 2013) evaluaron los diferentes contenidos de isómero de licopeno por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) y el color de los diversos genotipos de tomate y subproductos derivados del tomate por SPR (Surface plasmon resonance) y DIA (Digital Image Analisis) con cuatro propósitos principales: 1) para comparar los niveles de isómeros de licopeno en productos de tomate procesados contra productos frescos, 2) para evaluar la validez de DIA y SPR para determinar el color de estos productos, 3) para comparar la capacidad de ambas metodologías instrumentales para discriminar entre los dos diferentes

grupos de muestras, y 4) para comparar la utilidad de ambas metodologías para la estimación de los niveles de licopeno, por otro lado Fernández-Ruiz et al. (2010) probaron de una manera no destructiva varios modelos lineales de color, valores individuales de L* a* y b*, $(a^*/b^*)$, $(a^{*2}/b^{*2})$ y parámetros obtenidos por diversos aparatos como el calorímetro Minolta CR-200b y el Hunter Lab Scan XE, con el propósito de estimar el contenido de licopeno en distintas muestras de tomate. De todos los métodos lineales que se aplicaron el mejor de todos ellos fue el de los valores individuales de L* a* y b* medidos con los calorímetros Hunter. Se diseñaron diferentes modelos de RBEF (Radial Basis Network Exact Fit), los primeros de ellos usando los tres parámetros de color (L* a* y b*) y posteriormente con los parámetros individuales de $(a^*/b^*)$y $(a^{*2}/b^{*2})$. También se han desarrollado redes neuronales artificiales (ANN) integradas a sistemas computarizados de inspección (CIS) para determinar el color de la pasta de tomate en el espacio de color CIE L*a*b* y el número y tamaño de marcas oscuras en el producto. En este análisis, la comparativa entre el CIS y los inspectores humanos para encontrar las manchas oscuras, los inspectores tuvieron dificultades para encontrar maracas con un diámetro menor a los 0.2 mm mientras que el CIS obtuvo una buena capacidad de medida y determinación, de las 99 muestras el CIS arrojó un numero de 235 manchas por 233 por parte de los inspectores (Velioĝlu et al., 2011).

Algunos otros investigadores han explorado el uso de espectroscopia de desplazamiento espacial Raman (SORS) para la evaluación no destructiva de la madurez interna de los tomates. Un sistema Raman usando un láser de 785 nm fue desarrollado para recoger espectros de desplazamiento espacialmente en una longitud de onda de $200 - 2500\ \mathrm{cm}^{-1}$. Las mediciones del SORS se llevaron a cabo utilizando una distancia fuente-detector que va de 0 a 5 mm con un tamaño de paso de 0.2 mm. Ciento sesenta y tomates en siete estados de madurez (es decir, verde inmaduro, verde maduro, rompedor, torneado, rosa, rojo claro y rojo) se pusieron a prueba. La viabilidad del SORS para la detección del subsuelo se

examinó mediante el uso de un bloque de teflón colocado bajo rebanadas del pericarpio exterior de 5 mm y 10 mm de espesores cortada de tomates verdes y rojos (Qin et al., 2012).

Gastélum-Barrios et al. (2011) realizaron una investigación con el objetivo mejorar la producción de tomate y calidad de la fruta a través de los métodos de medición de fruta, que tienen un bajo factor de impacto en la fruta y de la planta durante las mediciones. Presentaron una revisión de los principales atributos, como el color, velocidad de maduración, la firmeza, la forma, el tamaño y la composición, que determinan la calidad del fruto de tomate para los consumidores finales, e hizo un breve resumen de los métodos (invasivo destructivas e invasivas no destructivos) que se utiliza actualmente para evaluar estos atributos.

Uno de los trabajos que tiene mayor relación con el trabajo aquí presentado es el que hicieron Vazquez-Cruz et al. (2013) donde desarrollaron una red neuronal para estimar la concentración de los carotenoides licopeno y β-caroteno en tomates durante las seis etapas de maduración, establecieron la relación existente entre parámetros de color (L*, a*, b* y hue) así como del área de las hojas de la planta, los resultados pueden ser expresados claramente en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** donde se observa claramente que la banda que proporciona mayor información es la banda de color a* que presenta valores negativos para etapas que presentan una mayor coloración verde y positivos para una pigmentación roja.

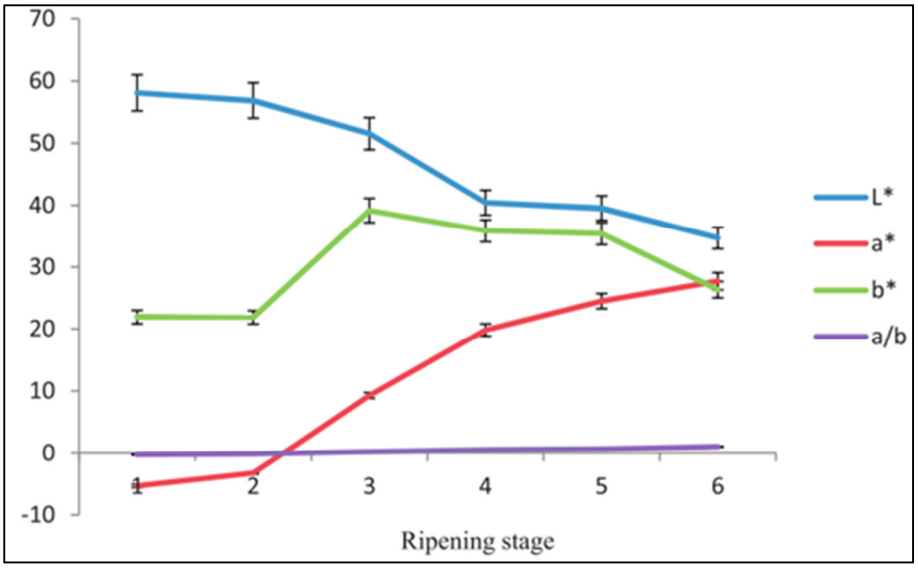



Figura 1-1. Lecturas de color en las diferentes etapas de maduración.

## 1.2 Productos en el mercado

En el mercado existe una gran variedad de productos que miden el color de los frutos, los principales de ellos de la marca HunterLab aunque todos son utilizados en la medida de color de muestras sólidas o semisólidas de características no completamente uniformes, a continuación se enuncian algunos de ellos así como características y prestaciones.

### 1.2.1 ColorFlex

Este instrumento es pequeño, con un banco o espacio en su parte superior, es un espectrofotómetro de reflectancia. Contiene un teclado, pantalla con varias opciones y es ideal para aplicaciones de control de calidad en una amplia gama de industrias, puede medir el color de diferentes tipos de productos incluyendo materiales brutos, verificación de acabados de color en productos o verificación de color a través del proceso. Los datos pueden ser almacenados en la memoria o impresos también puede ser usado con una PC, es muy utilizado

para la evaluación de color en productos de tomate como cátsup, jugo y salsas, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el ColorFlex físicamente.

Figura 1-2. ColorFlex (Zamudio-Ramírez, 2013)

### 1.2.2 LabScanXE

Es un espectrofotómetro con un porta muestras de 1.75 pulgadas, es usado para medir la reflectancia de los semilíquidos translucidos, en un vaso de muestra con un disco, anillo y una tapa para cubrir la muestra. Algunas muestras de semisólidos requieren de una preparación y presentación compensatoria en orden de la medición de la muestra. Este versátil espectrofotómetro mide la reflectancia de color en la forma en la que el ojo la ve, incluso el efecto de brillo. Mide muestras casi en cualquier forma de sólido y de polvos a líquidos, un ejemplo de cómo es físicamente se puede observar en la.

Figura 1-3. LabScanXE (Zamudio-Ramírez, 2013).

### 1.2.3 MiniScaXE

Este espectrofotómetro puede ser usado para medir la reflectancia de muestras planas, sólidos opacos, cuando el instrumento que es portátil, se coloca sobre la muestra. Este método es el usado idealmente para la medición de muestras planas, sólidos opacos, incluyendo trozos de pintura, losa de cerámica, tablas de forro de vinil y hasta alimentos como pan y quesos sólidos, puede observarse en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** que es el más portable de todos ellos.

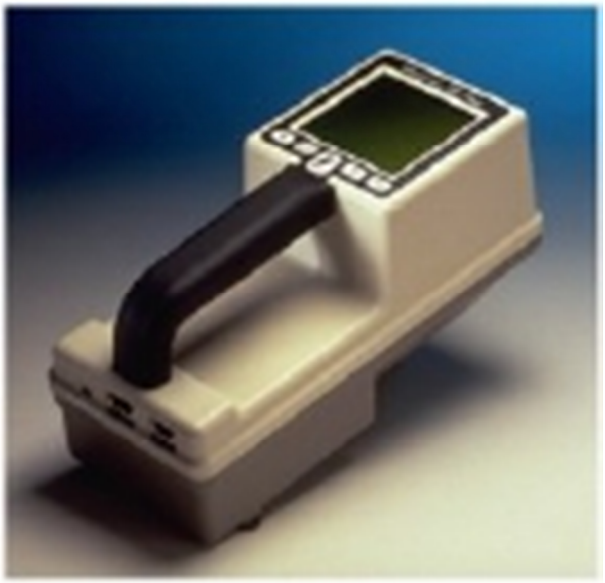


Figura 1-4. MiniScanXE (Zamudio-Ramírez, 2013).

## 1.3 Justificación

Debido a que la tendencia es desarrollar sistemas no invasivos para la agricultura, es necesario construir un sistema basado en análisis de imágenes, que sea capaz de estimar los carotenoides licopeno y β-caroteno en tomates y zanahorias sin alterar su desarrollo natural, para lograr el desarrollo de un sistema de este tipo es necesario generar el conocimiento indispensable para obtener modelos matemáticos que relacionen el color de los frutos con la cantidad estos carotenoides, con estas técnicas se podrán tener resultados muy aproximados a los obtenidos en los análisis de laboratorio en un tiempo instantáneo (milisegundos) y con un costo por muy debajo de los instrumentos de análisis químicos. El sistema, además de ser portátil, será capaz de tener una alta repetitividad en sus procesos, para lograr este fin se hará uso de plataformas FPGAs en combinación con el procesamiento de imagen a color, con esto se permitirá analizar fotografías directamente en el sistema para posteriormente trasladarlas a una base de datos que lleve el registro de todas las pruebas. La utilización de plataformas FPGAs incrementa el rendimiento del procesamiento de las señales y debido a su flexibilidad permiten la reconfiguración del *hardware*; es

decir, el sistema no sufre modificaciones físicas, solo es necesario modificar la descripción del mismo para actualizar las características del sistema. Finalmente, con este sistema se disminuye el personal especializado así como los costos y el tiempo invertido.

## 1.4 Descripción del problema

De acuerdo a los antecedentes no se han desarrollado métodos y modelos estadísticos/matemáticos para determinar el contenido de licopeno y β-caroteno en tomate rojo y zanahoria utilizando procesamiento de imágenes, más lejano aún, no se ha implementado un sistema digital dedicado a la determinación en tiempo real de carotenoides. Actualmente existen métodos invasivos destructivos para determinar carotenoides los cuales requieren de la destrucción del fruto para su análisis, para compensar esta deficiencia los métodos no invasivos resultan ser una opción vital a desarrollar. Otro de los grandes problemas es que los análisis más exactos son los que requieren uso de laboratorios, los cuales tienen altos costos de manejo ya que requieren de equipos altamente sofisticados y de gran costo (espectrofotómetros, HPLC. $UPC^2$), reactivos químicos específicos; así como de invertir horas de análisis para obtener resultados de un número de muestras considerablemente pequeño (20 muestras al día).

# 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 2.1 Hipótesis

Al usar el espacio de color CIE L*a*b* en el análisis de la imagen y acompañado del uso de tecnología FPGA se obtiene una exactitud mayor al 85% en la estimación de los carotenoides licopeno y β-caroteno en tomates y zanahorias en comparación a técnicas de laboratorio como son la técnica de Fish y la técnica de Ultracromatografía de Convergencia así como una capacidad de procesamiento en tiempo real.

## 2.2 Objetivo general

Proponer un modelo estadístico en el que utilizando el espacio de color CIE L*a*b* en conjunto con el procesamiento de imágenes en FPGA aproxime la concentración de licopeno y β-caroteno en tomates y zanahorias en al menos un 85% respecto a las técnicas de laboratorio como son la técnica de Fish y la técnica de Ultracromatografía de Convergencia.

## 2.3 Objetivos particulares

- Desarrollar un modelo estadístico con base en el espacio de color CIELAB para estimar licopeno y β-caroteno en tomates y zanahorias.
- Diseñar e integrar una tarjeta electrónica para la captura, almacenamiento y procesamiento de imágenes con base en tecnologías FPGA.

# 3 MARCO TEÓRICO

## 3.1 FPGA

Un FPGA está compuesto de matrices bidimensionales de bloques lógicos y flip-flops, con una interconexión electrónica entre ellos programable. Son dispositivos de alta densidad lógica, se pueden utilizar para integrar grandes cantidades de circuitos lógicos en un solo circuito integrado. El FPGA se ha convertido en una de las tecnologías de mayor éxito para el desarrollo de sistemas que requieren operación en tiempo real. El chip FPGA puede ser programado con lenguaje de descripción de hardware, de los cuales existen dos tipos: Lenguaje Descriptivo de Alta Densidad (VHDL) y el lenguaje Verilog. VHDL es un lenguaje de descripción de hardware para el diseño digital (Nesreen et al., 2010). Los FPGAs se utilizan actualmente en una gran variedad de aplicaciones de hardware, tales como cámaras digitales, teléfonos celulares, reconocimiento de voz y procesamiento de imágenes, que requieren un bajo coste y altas tasas de transferencia de datos. Algunas ventajas de los FPGAs sobre las PC y DSP para las funciones de procesamiento de imágenes, incluyen su capacidad de realizar muchos cálculos en paralelo y la ejecución de todos los comandos en el hardware, lo que es ideal para sistemas en tiempo real.

## 3.2 Espacios de color

El uso del color en el procesamiento de imágenes está principalmente motivado por dos factores:

- El color es un poderoso descriptor que, en la mayoría de los casos simplifica la identificación y extracción de los objetos de una escena en específico.
- Los humanos podemos distinguir miles de colores y sin embargo sólo dos docenas de niveles de gris.

Debido a las características del ojo humano y a la teoría tricromática todos los colores que podemos reconocer en una imagen son una combinación de los llamados colores primarios: R (Red/Rojo), G (Green/Verde) y B (Blue/Azul). El objetivo de un modelo de color es facilitar la especificación de los colores de una forma normalizada y aceptada genéricamente. En esencia, un modelo de color es la especificación de un sistema de coordenadas tridimensional y de un subespacio de este sistema en el que cada color queda representado por un único punto. Entre los espacios de color utilizados más frecuentemente para el procesamiento de imágenes se encuentran el RGB, YIQ, CMY, YCbCr, HSI, XYZ Y LAB.

Generalmente las características para poder distinguir un color de otro son: brillo, tono y saturación. El brillo es la luminosidad u oscuridad relativa del color y normalmente se expresa como un porcentaje comprendido entre 0% (negro) y 100% (blanco). El tono es el color reflejado o transmitido a través de un objeto. Se mide como un ángulo en grados, entre 0º y 360º. Normalmente, el tono se identifica por el nombre del color, como rojo, naranja o verde. Por último la saturación, a veces llamada cromatismo, se refiere a la pureza relativa de la cantidad de luz blanca mezclada con el tono, es decir, es la fuerza o pureza del color. La saturación representa la cantidad de blanco que existe en proporción al tono y se mide como porcentaje entre 0%(gris) y 100%(saturación completa). En la rueda de colores estándar, la saturación aumenta a medida que nos aproximamos al borde de la misma. Las coordenadas de tono y saturación definen la cromaticidad, entonces un color puede ser caracterizado por su brillo y cromaticidad.

### 3.2.1 Espacio de color RGB

En el modelo RGB cada color aparece en sus componentes espectrales primarias: rojo, verde y azul, este modelo está basado en el sistema de

coordenadas cartesianas. El subespacio de color de interés es el tetraedro mostrado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en el cual los valores RGB están en tres vértices; cian, magenta y amarillo se sitúan en otros tres vértices, el negro corresponde al origen y el blanco se sitúa en el vértice más alejado al origen. En este modelo, la escala de grises se extiende desde el negro al blanco a lo largo de la diagonal que une esos dos puntos, y los colores son puntos dentro del tetraedro definidos por los vectores desde el origen. Por conveniencia se asume que todos los vectores han sido normalizados de modo que el tetraedro de la figura es el tetraedro unitario, es decir, todos los valores R, G y B están en el rango [0,1]. Las imágenes en este espacio se forman por la combinación en diferentes proporciones de cada uno de los colores primarios RGB. Las imágenes del modelo de color RGB consisten en tres planos de imagen independientes, uno por cada color primario. Cuando llegan a un monitor RGB, estas tres imágenes se combinan en la pantalla fosforescente para producir una imagen en color compuesta. De forma alternativa, la mayoría de las cámaras de color empleadas para la adquisición de imágenes digitales utilizan el formato RGB, lo que por sí solo hace de este un modelo importante en el procesamiento de imágenes.

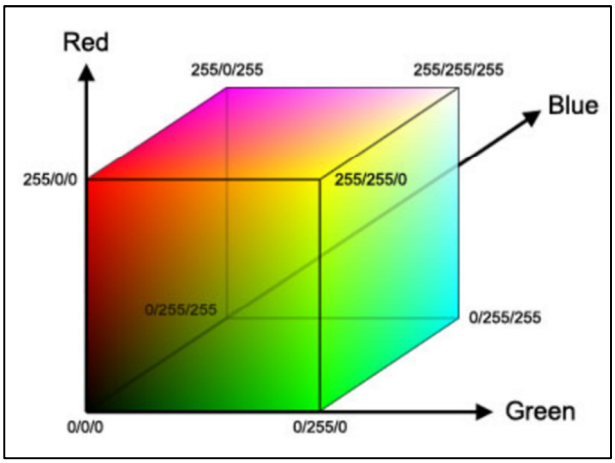



Figura 3-1. Espacio de color RGB

### 3.2.2 Espacio de color CMY

Cian (C), magenta (M) y amarillo (Y) son los colores secundarios de la luz, o bien los colores primarios de los pigmentos. Se denominan sustractivos ya que se utilizan como filtros para sustraer colores de la luz blanca. La mayoría de los dispositivos que depositan pigmentos coloreados sobre papel como son las impresoras y fotocopiadoras en color, necesitan una entrada CMY o bien una conversión interna de RGB a CMY. El sistema coordenado es el mismo que en el espacio RGB pero donde había negro ahora existe el blanco y viceversa, en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar el espacio de color CMY.

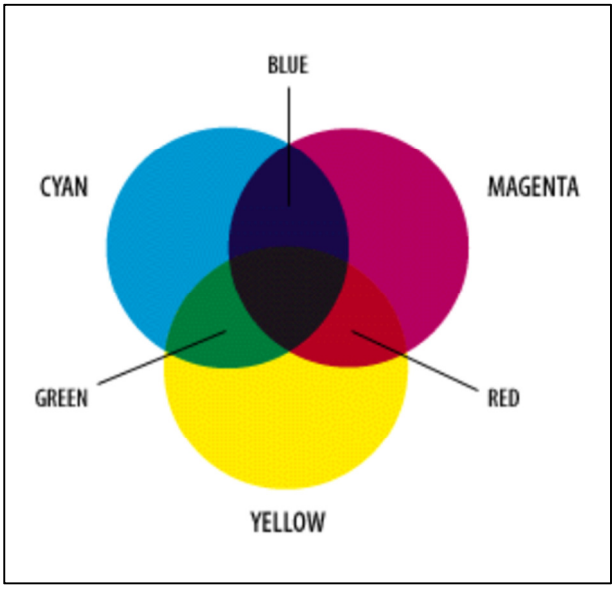



Figura 3-2. Espacio de color CMY

### 3.2.3 Espacio de color YIQ

El espacio de color YIQ se utiliza en las emisiones comerciales de televisión. Básicamente el YIQ es una recodificación del RGB utilizada por su eficacia en la transmisión y para mantener la compatibilidad con los estándares de

televisión en blanco y negro. La componente Y del sistema YIQ proporciona toda la información de video que necesita un sistema de televisión monocromático. El modelo YIQ fue diseñado para aprovechar la mayor sensibilidad del sistema visual humano a los cambios de la saturación. Así los estándares YIQ emplean más bits para la representar la Y y menos para representar la I o Q. Además de tratarse de un estándar ampliamente difundido, la ventaja principal del modelo YIQ en el procesamiento de imágenes es que la luminancia (Y) y la información del color (I y Q) están desacopladas, así la importancia de este desacoplamiento radica en que la componente de luminancia de una imagen puede procesarse sin afectar su contenido cromático, en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se distingue gráficamente el espacio de color YIQ.

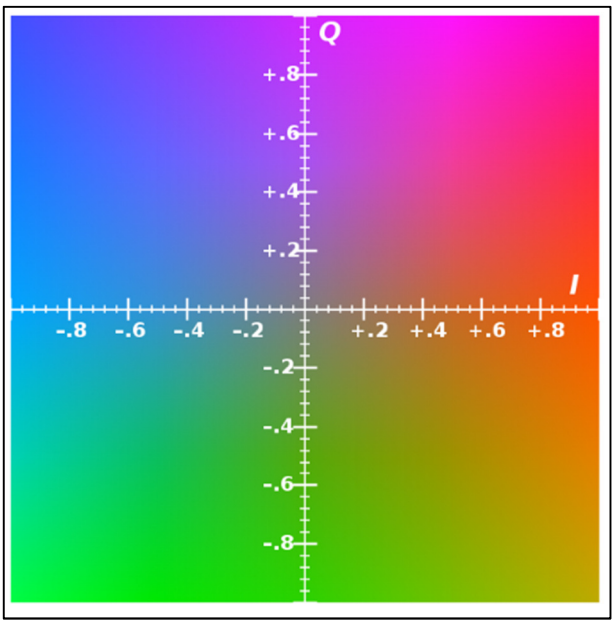



Figura 3-3. Espacio de color YIQ

### 3.2.4 Espacio de color YCbCr

Se trata de una codificación no lineal del espacio RGB. El parámetro Y indica la luminancia, los parámetros Cb y Cr indican el tono del color: Cb ubica el

color en una escala entre el azul y el amarillo, Cr indica la ubicación del color entre el rojo y el verde. El espacio YCbCr es una versión escalada y desplazada del espacio de color YUV. El parámetro Y representa la luminosidad (es decir, información en blanco y negro), mientras que U y V representan la crominancia, es decir, información con respecto al color. Cb y Cr son la diferencia entre la componente azul y la diferencia entre la componente roja y un valor de referencia respectivamente. La transformación de RGB a YCbCr puede ser ejecutada utilizando ((1) donde R, G y B oscilan en el rango de [0,1]. Y en el de [16,235] y Cb y Cr en el de [16,240], en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa la representación gráfica del espacio de color YCbCr.

$$\begin{bmatrix} Y \\ C_b \\ C_r \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 65.481 & 128.553 & 240966 \\ -39.797 & -74.203 & 112 \\ 112 & -93.786 & -18.214 \end{pmatrix} * \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 16 \\ 128 \\ 128 \end{bmatrix} \quad \textbf{(1)}$$

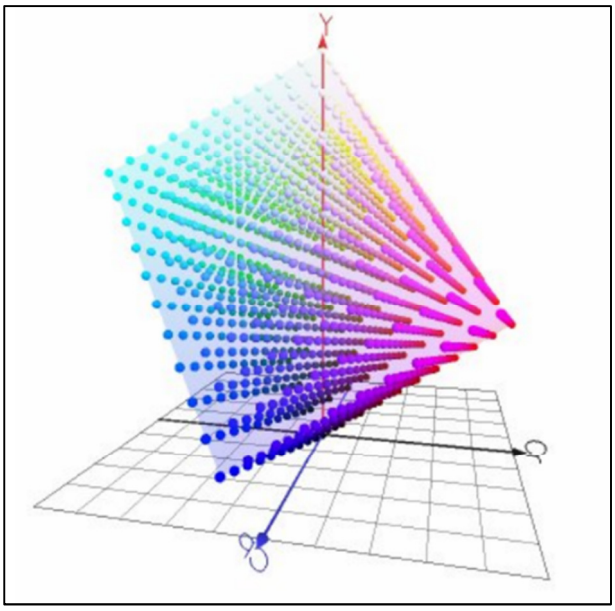



Figura 3-4. Espacio de color YCbCr.

### 3.2.5 Espacio de color HSI

Sus siglas corresponden a H (Hue/Tonalidad), S (Saturation/Saturación), I (Intesity/Intensidad) como puede observarse en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**. El modelo HSI debe su utilidad a dos hechos básicos. Primero, la componente de intensidad, I, está desacoplada de la información cromática contenida en la imagen. Segundo, las componentes de tono y saturación están íntimamente relacionadas en la forma en que los seres humanos percibimos el color. Estas características hacen que el modelo HSI sea una herramienta ideal para desarrollar algoritmos de procesamiento de imágenes basados en alguna de las propiedades de la percepción del color del sistema visual humano.

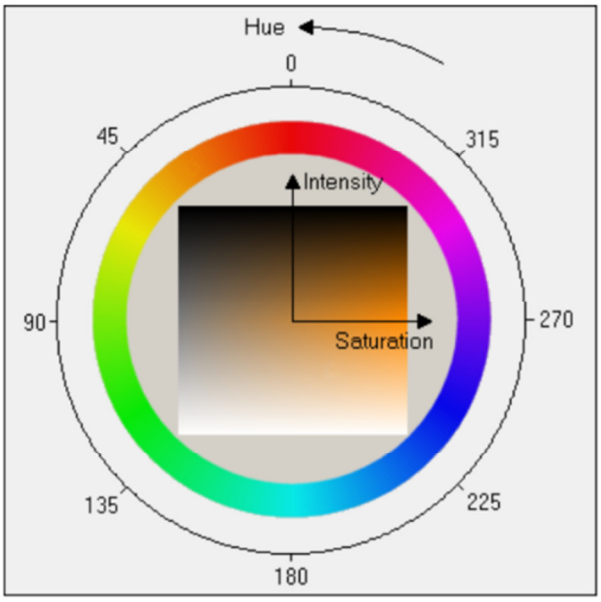



Figura 3-5. Espacio de color HSI

### 3.2.6 Espacio de color XYZ

El espacio de color XYZ se usa como una especie de comodín en algunas transformaciones de espacios de color, los valores triestímulo XYZ conforman la base de los presentes espacios de color de la CIE. El concepto de los valores

triestímulo XYZ se basa en la teoría de los tres componentes de la visión en color, que establece que el ojo posee receptores para tres colores primarios (rojo, verde y azul) y que todos los demás colores se ven como mezclas de estos tres colores primarios como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**. Los valores triestímulo XYZ se calculan utilizando estas funciones de coincidencia de color del observador estándar. La transformación del espacio de color de RGB a XYZ se hace con las fórmulas que se enmarcan a continuación:

$$var_R = (R/255) \tag{2}$$

$$var_G = (G/255) \tag{3}$$

$$var_B = (B/255) \tag{4}$$

$$var_{R1} = 100[(var_R + 0.055/1.055)^{2.4}\,] \quad Cuando \quad var_R > 0.04045 \tag{5}$$

$$var_{R1} = 100[var_R/12.92] \quad Cuando \quad var_R \leq 0.04045 \tag{6}$$

$$var_{G1} = 100[(var_G + 0.055/1.055)^{2.4}\,] \quad Cuando \quad var_G > 0.04045 \tag{7}$$

$$var_{G1} = 100[var_G/12.92] \quad Cuando \quad var_G \leq 0.04045 \tag{8}$$

$$var_{B1} = 100[(var_B + 0.055/1.055)^{2.4}\,] \quad Cuando \quad var_B > 0.04045 \tag{9}$$

$$var_{B1} = 100[var_B/12.92] \quad Cuando \quad var_B \leq 0.04045 \tag{10}$$

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 0.4124 & 0.3576 & 0.1805 \\ 0.2126 & 0.7152 & 0.0722 \\ 0.0193 & 0.1192 & 0.9505 \end{pmatrix} \begin{bmatrix} var_{R1} \\ var_{G1} \\ var_{B1} \end{bmatrix} \tag{11}$$

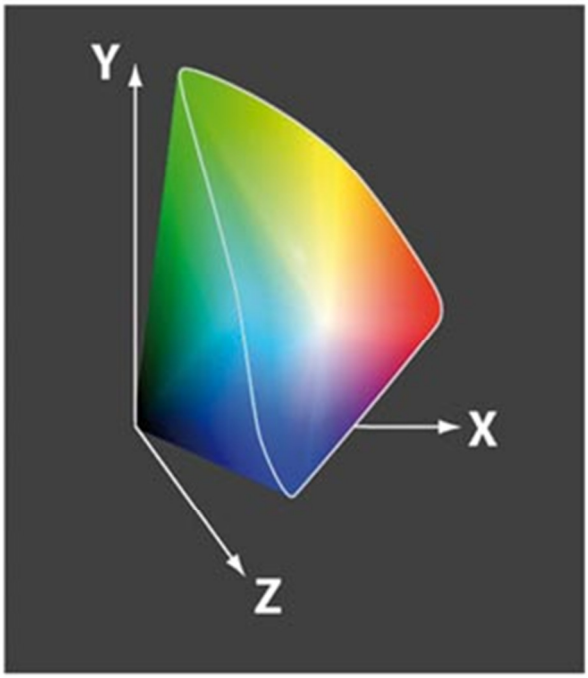



Figura 3-6. Espacio de color XYZ

### 3.2.7 Espacio de color CIELAB

En 1976, la Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'Éclairage, CIE) recomendó la escala de color CIE L*a*b* (CIELAB) en un intento de proporcionar un estándar, una escala de color aproximadamente uniforme la cual pudiera ser usada por cualquiera. Logrando así valores de colores que fácilmente pudieran ser comparados (HunterLab, 2008).

El CIELAB es un modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano, los tres parámetros en el modelo representan la luminosidad de color (L*, L*=0 negro y L*=100 indica blanco), su posición entre rojo y verde (a*, valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b*, valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo). La siguiente

figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra la representación del espacio.

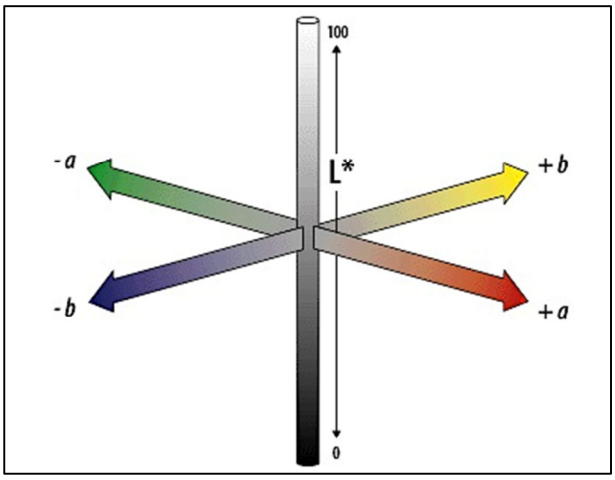



Figura 3-7. Representación del espacio de color CIELAB (HunterLab, 2008).

Debido a que las personas perciben el color y la apariencia en distintas formas, la CIE intentó estandarizar la observación humana. En 1931 publicaron el Estándar CIE de Observación de 2º. En el año de 1964, desarrollaron el Estándar de Observación de 10º (HunterLab, 2008). La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra la perspectiva de observación de los dos estándares.

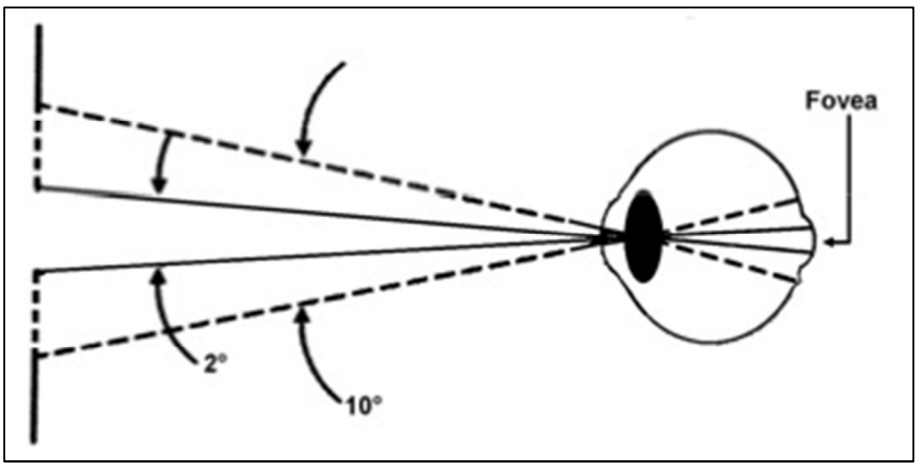


Figura 3-8. Representación de los estándares de observación de 2º y 10º (HunterLab, 2008).

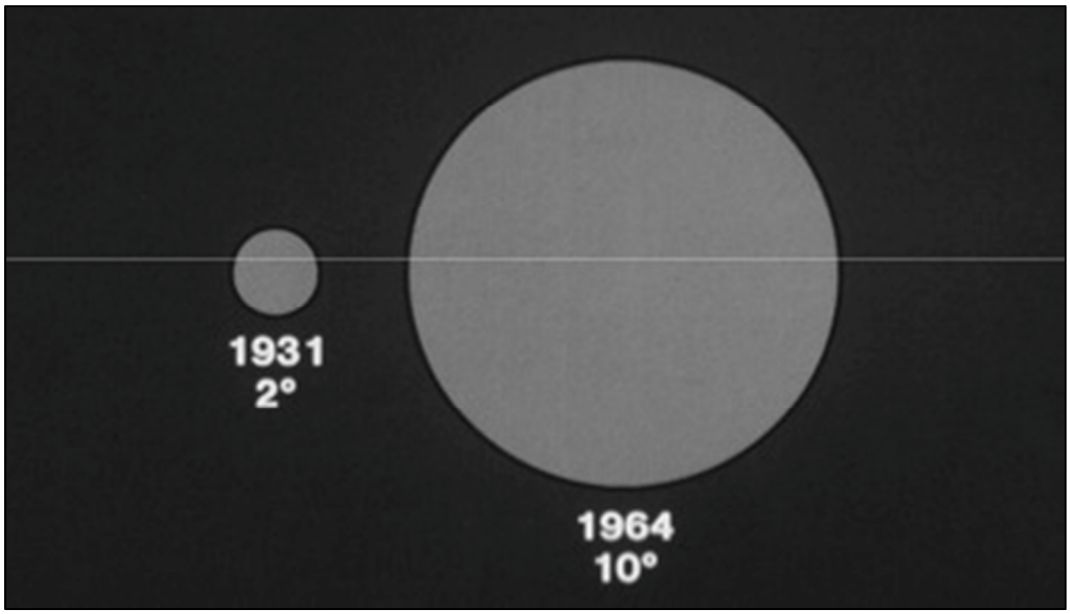



Figura 3-9. Campos relativos de vista de los estándares de observación de 2º y 10º (HunterLab, 2008).

La CIE estableció diferentes tipos de iluminación, algunos de los más utilizados son listados a continuación:

A.- Lámpara incandescente o de tungsteno.

C.- Luz de día del cielo norte o luz promedio de día.

D65.- Iluminación comúnmente utilizada; luz promedio de mediodía en la mayor parte del mundo.

D50.- Luz de horizonte (salida o puesta de sol).

D55.- Luz de media-mañana o media-tarde.

D75.- Nublado.

F2, Fcw, CWF, F.- Luz blanca fluorescente.

TL4 o TL84.- Lámpara fluorescente marca Philips modelo TL84 encontrada en mercados europeos.

Ultralume 3000.- Lámpara fluorescente marca Westinghouse encontrada en mercados de los Estados Unidos.

La siguiente figura muestra algunos ejemplos de iluminación con su respuesta en el espectro de luz.

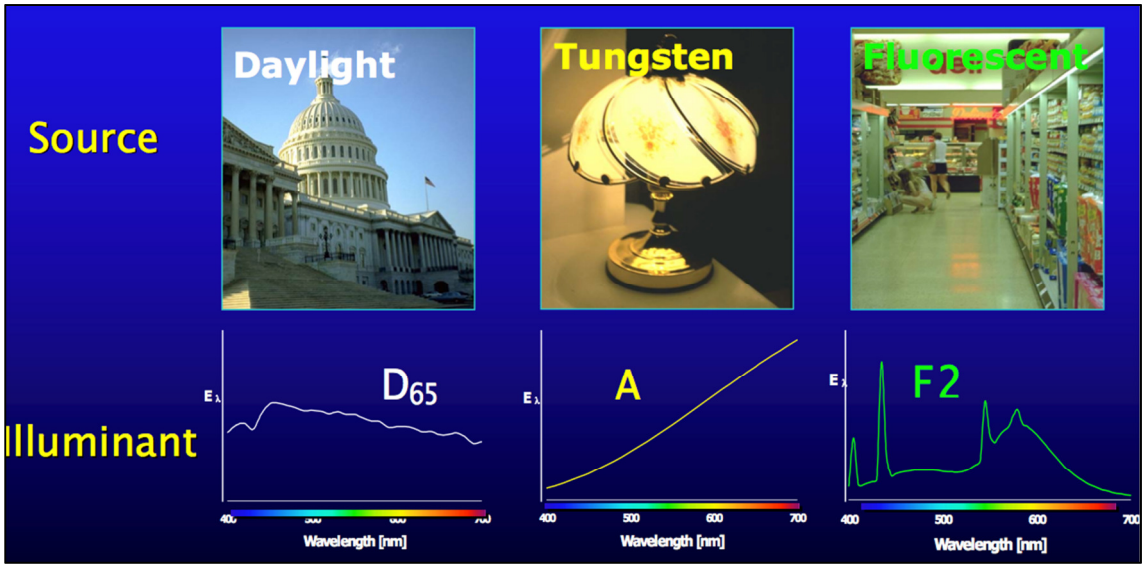



Figura 3-10. Ejemplos de iluminaciones (HunterLab, 2008).

Para obtener los valores correspondientes de L*, a* y b*, se parte del espacio de color llamado Valores Triestímulos (CIE Tristimulus Values), que parte de los valores XYZ y se utilizan en las fórmulas descritas a continuación.

Si $X/X_n, Y/Y_n$ y $Z/Z_n$ son todos mayores que $0.008856$, entonces:

$$L^* = 116\sqrt[3]{Y/_{Y_n}} - 16 \qquad \textbf{12)}$$

$$a^* = 500\left(\sqrt[3]{X/_{X_n}} - \sqrt[3]{Y/_{Y_n}}\right) \qquad \textbf{13)}$$

$$b^* = 200\left(\sqrt[3]{Y/_{Y_n}} - Z/_{Z_n}\right) \qquad \textbf{14)}$$

Si alguno de $X/X_n$ ,$Y/Y_n$ o $Z/Z_n$ es igual o menor que $0.008856$, entonces:

$$L^* = 903.3(Y/Y_n) \qquad \textbf{15)}$$

$$a^* = 500[f(X/X_n) - f(Y/Y_n)] \qquad \textbf{16)}$$

$$b^* = 200[f(Y/Y_n) - f(Z/Z_n)] \qquad \textbf{17)}$$

Dónde:

$X, Y$ y $Z$ son los valores triestímulos.

$X_n, Y_n$ y $Z_n$ son los valores triestímulos de la iluminación.

$Y_n = 100.00$.

$X_n$ y $Z_n$ son listados en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

Tabla 3-1. Iluminación para el estándar de observación CIE 2º (HunterLab, 2008).

| Iluminación | $X_n$ | $Z_n$ |
|---|---|---|
| **A** | 109.83 | 35.55 |
| **C** | 98.04 | 118.11 |
| **$D_{65}$** | 95.02 | 108.82 |
| **F2** | 98.09 | 67.53 |
| **TL4** | 101.40 | 65.90 |
| **UL3000** | 107.99 | 33.91 |
| **$D_{50}$** | 96.38 | 82.45 |
| **$D_{60}$** | 95.23 | 100.86 |
| **$D_{75}$** | 94.96 | 122.53 |

Tabla 3-2. Iluminación para el estándar de observación CIE 10º (HunterLab, 2008).

| Iluminación | $X_n$ | $Z_n$ |
|---|---|---|
| **A** | 111.16 | 35.19 |
| **C** | 97.30 | 116.14 |
| **$D_{65}$** | 94.83 | 107.38 |
| **F2** | 102.13 | 69.37 |
| **TL4** | 103.82 | 66.90 |
| **UL3000** | 111.12 | 35.21 |
| **$D_{50}$** | 96.72 | 81.45 |
| **$D_{60}$** | 95.21 | 99.60 |

| | | |
|---|---|---|
| **$D_{75}$** | 94.45 | 120.70 |

$$f(X/X_n) = \sqrt[3]{X/X_n} \quad Cuando\ \ X/X_n > 0.008856 \tag{18}$$

$$f(X/X_n) = 7.87\left(\frac{X}{X_n}\right) + \frac{16}{116} \quad Cuando\ \ X/X_n \leq 0.008856 \tag{19}$$

$$f(Y/Y_n) = \sqrt[3]{Y/Y_n} \quad Cuando\ \ Y/Y_n > 0.008856 \tag{20}$$

$$f(Y/Y_n) = 7.87\left(\frac{Y}{Y_n}\right) + \frac{16}{116} \quad Cuando\ \ Y/Y_n \leq 0.008856 \tag{21}$$

$$f(Z/Z_n) = \sqrt[3]{Z/Z_n} \quad Cuando\ \ Z/Z_n > 0.008856 \tag{22}$$

$$f(Z/Z_n) = 7.87\left(\frac{Z}{Z_n}\right) + \frac{16}{116} \quad Cuando\ \ Z/Z_n \leq 0.008856 \tag{23}$$

## 3.3 Segmentación de imágenes.

La segmentación de imágenes es el proceso de dividir una imagen en diferentes regiones de tal manera que cada región es casi homogénea, mientras que la unión de las dos regiones no lo es. Esta tarea de visión a bajo nivel es a menudo el paso preliminar (y también es crucial) en muchos aplicaciones de video y aplicaciones de visión por computadora, como la localización de objetos o el reconocimiento, la compresión de datos, seguimiento, recuperación de la imagen, o comprensión (Yang et al., 2012), además según Sowmya and Sheela Rani (2011) la segmentación juega un papel muy importante en cualquier sistema automatizado de reconocimiento de imágenes, porque es justo aquí donde se realiza la extracción el o los objetos de interés para el futuro procesamiento tales como descripción o reconocimiento.

Desde hace ya algunos años se ha estado investigando en los métodos para hacer segmentación de imágenes, algunos de ellos pioneros en el área, pudiendo estos métodos ser clasificados en cinco grandes categorías: métodos basados en umbralización de histograma, métodos basados en regiones, métodos basados en gráficos, métodos basados en agrupación y métodos basados en bordes.

- Métodos basados en umbralización de histograma: La umbralización de histograma es la operación de convertir una imagen de varios niveles en una imagen binaria, se asigna el valor de 0 (fondo) o 1 (o los objetos en primer plano) a cada píxel de una imagen basada en una comparación con algún valor umbral T (intensidad o valor de color). Cuando T es constante, la aproximación es llamada umbral mundial; de lo contrario, se llama umbral local. Los métodos de umbral global pueden fallar cuando la iluminación de fondo no es uniforme. Múltiples umbrales se utilizan para compensar la iluminación desigual. La selección de umbral se suele hacer interactiva. Los métodos de umbral basados en histograma son muy populares debido a su simplicidad y eficiencia. Sin embargo, los algoritmos de umbralización tradicionales basados en histograma no pueden procesar imágenes cuyos histogramas son casi unimodales, especialmente cuando la región objetivo es mucho más pequeña que el área de fondo (Yang et al., 2012).
- Métodos basados en regiones: El objetivo de la segmentación basada en regiones es el uso de características de la imagen para asignar píxeles individuales en una imagen de entrada a los conjuntos de píxeles, denominado regiones que podrían corresponder a un objeto o una parte significativa de uno. Las diversas técnicas son: técnicas locales, técnicas globales y las técnicas de separación y fusión. La eficacia de los algoritmos de crecimiento de región depende del área de aplicación y la imagen de entrada. Si la imagen es lo suficientemente simple, simples técnicas locales

pueden ser efectivas. Sin embargo, en escenas difíciles, hasta las técnicas más sofisticadas no pueden producir una segmentación satisfactoria (Yang et al., 2012).

- Métodos basados en gráficos: Estos métodos suelen utilizar una gráfica en la que los nodos representan los píxeles de la imagen y los arcos de enlace representan los píxeles vecinos. La segmentación se consigue reduciendo al mínimo el peso que corta un gráfico en sub-gráficos. En general, estos métodos sufren de una alta complejidad computacional (Yang et al., 2012).
- Métodos basados en agrupación: El agrupamiento es un proceso mediante el cual un conjunto de datos (píxeles) se sustituyen por un grupo; los píxeles pueden permanecer juntos porque son del mismo color, textura, etc. Hay dos algoritmos naturales para la agrupación: la agrupación por división y agrupación por aglomeración. La dificultad en el uso de cualquiera de los métodos directamente es que hay un montón de píxeles en una imagen. Además, los métodos no son explícitos acerca de la función objetivo que se está optimizando. Un enfoque alternativo es escribir una función objetivo y luego construir un algoritmo. Los medios K y difusos medios C algoritmos son técnicas iterativas que se utilizan para partición de una imagen en grupos K, donde cada píxel de la imagen es asignado al grupo que minimiza la varianza entre el píxel y el centro de la agrupación y se basa en color del píxel, la intensidad, la textura, y la ubicación, o una combinación ponderada de estos factores. Estos algoritmos están garantizados a converger, pero no pueden devolver la solución óptima. La calidad de la solución depende de la configuración inicial de los grupos y el valor de K (Yang et al., 2012).
- Métodos basados en bordes: Los métodos de detección de bordes son unos de los métodos más utilizados para el problema de la segmentación de imágenes. Estos métodos localizan los píxeles en la imagen que corresponden a los bordes de los objetos vistos en la imagen. El resultado es una imagen binaria con los píxeles del borde detectado. Algunos de los algoritmos más utilizados son Sobel, Prewitt y Laplaciano. Estos algoritmos

son adecuados para las imágenes que son simples y sin ruido. La principales desventajas de la técnica de detección de bordes son que no funciona bien (produciendo la falta de bordes o bordes extras) cuando las imágenes tienen muchas bordes y ruido, por lo tanto no pueden identificar fácilmente una curva cerrada o un límite (Yang et al., 2012).

## 3.4 El β-Caroteno.

Las zanahorias son unas raíces comestibles ricas en carotenos, unos compuestos que el hígado trasforma fácilmente en vitamina A, entre estos destaca el β-caroteno, este componente aparece en frutas y verduras de color anaranjado y verde fuerte, como las coles, las patatas, las calabazas, los albaricoques y las espinacas o en frutos, como el mango, el pomelo o el melón, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra la concentración de β-caroteno en algunos alimentos (Walji, 2007) en donde se puede observar que las zanahorias son los frutos que mas β-caroteno proporcionan. Los β-carotenos son componentes con potentes propiedades antioxidantes que previenen la aparición de ciertos tipos de cáncer. Actúan especialmente contra el cáncer de pulmón y el de boca o impiden el desarrollo de células cancerosas, haciendo que estos procesos no pasen de un estadio primitivo. Además, se ha comprobado el poder antioxidante de este componente: su ingestión protege contra la acción destructiva de los radicales libres, unos agentes producidos por causas externas, como la contaminación o por causas internas del propio organismo, que atacan las células produciendo enfermedades degenerativas, como por ejemplo, el envejecimiento prematuro o la mala circulación.

Entre todas las propiedades medicinales de los β-carotenos se pueden mencionar las siguientes: anticancerosos, antimutagénicos, antitumorales, inmunoestimulantes, anticoronarios, antiulcéricos, antifotofóbicos y antidegenerativos. Los carotenos poseen virtudes como las de proteger las

arterias de la arteriosclerosis o mantener jóvenes a las personas durante más tiempo. Su presencia en el cuerpo garantiza la buena salud de la visión, impidiendo la formación de las cataratas o la hipersensibilidad a la luz solar; el buen estado de la piel, de los dientes y de las encías.

Tabla 3-3. β-caroteno en algunas frutas (Walji, 2007)

| Alimento | (µg/100g) | (UI/100g) |
|---|---|---|
| **Zanahorias** | 12,000 | 6,667 |
| **Espinacas** | 6,000 | 3,333 |
| **Batata** | 4,000 | 2,233 |
| **Albaricoques secos** | 3,600 | 2,000 |
| **Berro** | 3,000 | 1,667 |
| **Mango** | 1,200 | 667 |
| **Tomates** | 600 | 333 |
| **Col** | 300 | 167 |
| **Guisante congelado** | 300 | 167 |
| **Patatas** | 0 | 0 |

## 3.5 El Licopeno.

El licopeno es un carotenoide, un grupo de compuestos presentes en muchas frutas y verduras, hay más de 750 tipos de carotenoides en la naturaleza, sin embargo, sólo 20 de ellos han sido encontrados en la sangre y tejidos humanos, de los carotenoides más a menudo presentes en la sangre humana es el licopeno, seguido del β-caroteno, luteína y zeaxantina, al igual que otros carotenoides, el licopeno tiene un poder antioxidante fuerte. Los antioxidantes son capaces de contrastar la acción destructiva de los radicales libres en el cuerpo

humano (que están en serio peligro para las células y tejidos), que realizan una función básica de protección y prevención contra diversas enfermedades, los radicales libres son subproductos de procesos celulares metabólicos del cuerpo. Juegan un papel importante en una serie de procesos biológicos, algunos de los cuales son necesarios para la vida, como la destrucción intracelular de las bacterias, sin embargo, grandes cantidades de radicales libres puede ser muy peligroso para el cuerpo humano. Debido a su reactividad extrema, los radicales libres pueden participar en reacciones colaterales nocivos dando lugar a daño celular. Los objetivos de la acción destructiva de los radicales libres son los componentes celulares como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas (Festy, 2007).

De acuerdo a Candelas et al. (2006), las concentraciones de licopeno en tomate rojo varían entre 5 y 50 mg/Kg. El licopeno parece ser importante en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis, hipertensión, infarto), muchos tipos de cáncer (páncreas, sistema digestivo, hígado, próstata, pulmón, estómago, vejiga, mama y cuello del útero.), enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), la osteoporosis, diabetes mellitus, la infertilidad masculina, enfermedades de la piel (debido a los rayos UVA-UVB), la degeneración macular senil (Darvin et al., 2008), también se han demostrado las propiedades de este carotenoide para estimular la formación de tejido óseo, muy adecuado cuando hay riesgo de osteoporosis, como en la menopausia, y en la vejez para prevenir fracturas de huesos. Aparece en los tomates frescos, pero especialmente en los cocinados, dado que la cocción ayuda a liberar este elemento y facilitar la absorción por el organismo.

### 3.6 Determinación de carotenoides

De acuerdo con Rodriguez-Amaya (2001), la temperatura y el tiempo de cosecha tienen una influencia significativa en la concentración de carotenoides en

tomates (Lycopersicon esculentum) producidos bajo cámaras de ambiente controlado en invernadero. A temperaturas diurnas de 17.8 / 25.6 ºC mínimo-máximo, la concentración de β-caroteno en los frutos cosechados después de 7, 14, y 21 días fue 2,97, 2,18 y 2,19 µg/g, respectivamente, después de la aparición de la coloración inicial. Los niveles correspondientes de licopeno fueron 43.5, 57.7, y 64.8 µg/g. En temperaturas de 2.8 / 13.9 ºC, el β-caroteno se encuentra en 3.56, 3.73 y 3.67 µg/g y el licopeno en sólo 9.30, 20.5 y 24.2 µg/g en los tomates recolectados después de 7, 14, y 21 días después de la aparición de color. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra el contenido de carotenoides en diferentes variedades del tomate *(Lycopersicon esculentum)*.

Tabla 3-4. Carotenoides con función de Provitamina A y sin función de Provitamina A (Rodriguez-Amaya, 2001)

| **Referencia, origen de la muestra y técnica cromatográfica** | **Nombre científico** | **Variedad o cultivar y número de lotes analizados** | **Concentración µg/g por porción comestible en crudo** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Carotenoides con función de provitamina A | Carotenoides sin función de provitamina A |
| **(Hart and Scott, 1995) Norwich, RU (HPLC)** | Tomate (Lycopersicon esculentum) | Cherry n=4 | β-caroteno (4.7) | Luteína (1.0), licopeno (27) |
| | | Flavortop n=4 | β-caroteno (4.3) | Licopeno (50) |
| | | Tigerella n=4 | β-caroteno (17) | Luteína (1.9), licopeno (12) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Ida F1 hybrid n=4 | β-caroteno (9.6) | Luteína (1.0), licopeno (13) |
| | Shirley F1 n=4 | β-caroteno (7.7) | Licopeno (21) |
| | Craig n=4 | β-caroteno (11) | Luteína (1.5), licopeno (29) |
| | Moneymaker n=4 | β-caroteno (4.3) | Licopeno (35) |
| | Allicanti n=4 | β-caroteno (5.2) | Licopeno (37) |
| | Beefsteak n=4 | β-caroteno (8.8) | Licopeno (27) |
| | Sungold (amarillo) n=4 | β-caroteno (22) | Luteína (2.0), licopeno (3.9) |
| **(Khachik et al., 1986) Maryland, EUA (HPLC)** | Indefinida n=3 | β-caroteno *trans+cis* (2.8 ±0.2) | Luteína (1.3±0.2), licopeno (39±0), neurosporeno (3.0±0.1), caroteno (8.4±0.2), fitoflueno (5.1±0.8), fitoeno (6.0±1.0), |
| **(Tavares and Rodriguez-Amaya,** | Santa Cruz n=10 | β-caroteno (5.1 ±1. 1) | licopeno (31±20), *cis*-licopeno (3.0±2.4), |

| | |
|---|---|
| **1994) Sao Paulo, Brasil (OCC)** | fitoflueno (3.7±4.6) |

3.6.2 Técnica de Fish

La técnica de Fish es una técnica para la extracción y análisis de carotenoides en frutos, comúnmente estos análisis se hacen por medio de técnicas espectrofotométricas y de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), la técnica de Fish comparada contra las técnicas antes mencionadas requiere de un 80 % menos de solventes orgánicos para para la liberación y extracción de los carotenoides, se mide la absorbancia de la mezcla a una cierta longitud de onda en donde cada uno de los carotenoides están presentes, en este caso de estudio las mediciones de absorbancia serán hechas a las longitudes de onda de $503\ nm$ para el licopeno y a $449\ nm$ para el β-caroteno, de acuerdo a Fish et al. (2002) el método se divide en las siguientes etapas:

3.6.2.1 Método de extracción:

I. Se pesa $0.6\ g$ de muestra (con aproximación de $0.01\ g$).
II. Se coloca en un matraz EM previamente cubierto con papel aluminio (para evitar la foto oxidación).
III. Se le agregan $5\ ml$ de acetona, $5\ ml$ de etanol y $10\ ml$ de n-hexano en una relación 1:1:2.
IV. Las muestras se agitan a una velocidad constante no mayor a las 1000 rpm, durante 20 minutos en hielo.
V. Se agregan $3\ ml$ de agua desionizada y se vuelve a agitar por 10 minutos bajo las mismas condiciones.
VI. Se deja en reposo a temperatura ambiente por un lapso de 5 minutos para permitir la separación de fases polares y no polares.

VII. Se mide la absorbancia de la capa superior (capa de hexano) en cubetas de vidrio de $1\,cm$ de paso, a una longitud de onda de $503\,nm$ para minimizar la interferencia con otros carotenoides en el espectrofotómetro visible.

3.6.2.2 Método espectrofotométrico para determinación de licopeno

I. Se realiza la curva de calibración con varias soluciones de licopeno en n-hexano a diferentes concentraciones, se mide la absorbancia a $503\,nm$.
II. El contenido de licopeno se estima usando la absorbancia leída y el peso de la muestra en ( 24).

$$Licopeno(mg/Kg) = A_{503}\frac{PM/V}{\varepsilon/b} \qquad (24)$$

Dónde:

ε es el coeficiente molar de extinción para licopeno en hexano igual a $17.2x10^4 M^{-1}cm^{-1}$.

PM es el peso molecular del licopeno igual a $536.87\,g/mol$.

b es la longitud atravesada por la luz en el medio igual a $1\,cm$.

V es el volumen de n-hexano utilizado igual a $10mL$.

Sustituyendo en ( 24) se obtiene:

$$Licopeno(mg/Kg) = (A_{503})\left(\frac{31.2}{g\ de\ muestra}\right) \qquad (25)$$

3.6.2.3 Método para la determinación de β-caroteno en zanahoria:

La capa externa más delgada y el centro de la zanahoria se retiran de la muestra y las partes restantes son cortadas en pequeñas rebanadas. Posteriormente se muelen por separado hasta ser convertida en una pasta fina durante 2 minutos. De la pasta obtenida se separa una muestra de 1 g en un tubo de ensayo de vidrio. Se le añaden 5 ml de acetona fría y se agita ocasionalmente durante 10 minutos y finalmente se centrifuga a 1370 rpm por 10 minutos. La capa flotante se recolecta en un nuevo tubo de ensayo y se le agregan nuevamente 5 ml de acetona para ser agitados con las mismas condiciones anteriores. La capa flotante generada se hace pasar por un papel No. 42 de filtro Whatman. La muestra restante se ingresa a un espectrofotómetro uv-visible para medir la absorbancia a una longitud de onda de 449 nm.

3.6.3 Técnica por cromatografía.

La técnica de Ultracromatografía de Convergencia ($UPC^{2}$ ®) es una tecnología cromatográfica que utiliza dióxido de carbono ($CO_2$) comprimido como fase móvil principal combinada con algunos otros disolventes en menor proporción como metanol, etanol, hexanos, acetonitrilo y, en menor extensión, tetrahidrofurano; también ofrece la posibilidad de incorporar al medio pequeñas cantidades de ácidos débiles como fórmico, acético, sulfúrico o fosfórico con el fin de aprovechar los principios cromatográficos y la selectividad de la cromatografía de fase normal.

Las fases estacionarias más comunes se preparan con sílice químicamente modificada conteniendo cadenas de hidrocarburos, donde las constituidas por 8 átomos de carbono ($C_8$) se usan en menor extensión que las constituidas por 18 átomos de carbono ($C_{18}$).

En cuanto a la detección es necesario enfatizar los detectores del espectro UV-Vis son los más comunes. Los sistemas de fluorescencia y de detección electroquímica se utilizan en menor extensión para compuestos cuya absorbancia en el UV-Vis es muy baja (Piñeiro et al., 2005). En el caso del UPC$^{2}$ ® la detección se efectúa por medio de un detector con arreglo de fotodiodos alineados, que posee entre otras ventajas, la detección de impurezas traza sin precedentes y cuantificación con capacidades de análisis espectral

Con UPC$^{2}$ se pueden separar, detectar y cuantificar diversos compuestos que desafían a las tecnologías LC y GC. A diferencia de los otros tipos de cromatografías la técnica de UPC$^{2}$ ® ofrece las siguientes ventajas:

- La fase móvil principal ($CO_2$ comprimido), es menos costosa y menos tóxica que las fases móviles líquidas o gases transportadores.
- Volumen de inyección variable, que se traduce en una pérdida de muestra mínima, así como ventajas operativas.
- El restablecimiento de la columna a sus condiciones iniciales es más rápido, por lo tanto, los tiempos de análisis se reducen considerablemente.
- El sistema ofrece una elevada flexibilidad para el desarrollo de métodos.

# 4 METODOLOGÍA

El lugar de desarrollo y pruebas se ubicó en la facultad de ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro en el campus Amazcala de, ubicado en la población de Amazcala, El Marqués, Querétaro y ubicado en 20.704792º, -100.259657º. Las actividades fueron realizadas dentro de los laboratorios de Instrumentación y Control y de Bioingeniería con los que cuenta el campus, coordinadas por el Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa y por el Dr. Juan Fernando García Trejo correspondientemente, en la siguiente figura se observa la ubicación espacial del campus.

Figura 4-1. Ubicación espacial Campus Amazcala

La metodología fue dividida en varias secciones:

- Diseño e integración de la plataforma tecnológica.
- Pruebas de laboratorio.

## 4.2 Diseño e integración de la plataforma tecnológica

Esta plataforma tecnológica es necesaria ya que es con la que se hacen la captura, almacenamiento y análisis de las imágenes, en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se describe a forma de bloques los principales módulos del sistema; los bloques que se observan por fuera del cuadro de la línea punteada corresponden a elementos físicos mientras que los internos corresponden a descripciones de hardware dentro de la FPGA descritos en VHDL (Very High Speed Integrated Circuit), a continuación se enmarcan los pasos que se siguieron para su correcto diseño.

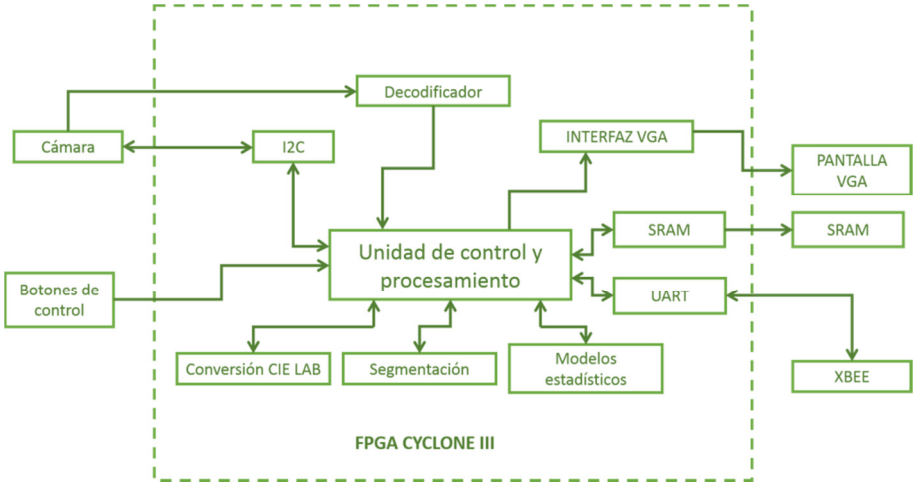



Figura 4-2. Diagrama a bloques de la plataforma electrónica

### 4.2.2 Principales requerimientos del sistema.

El hecho de diseñar e implementar un sistema que trabaje por medio del procesamiento de imágenes significa que es mandatorio el uso de un sensor APS

(Active Pixel Sensor) o mejor conocido como CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) que detecte la luz y la convierta en señales digitales en un patrón de matriz de pixeles, la investigación desarrollada por Gastélum-Barrios (2012) dio a conocer que para aplicaciones de esta índole es suficiente usar una resolución VGA (Video Graphics Array) de 640x480 pixeles ya que resoluciones mayores no arrojan mejoría considerable en cuanto a los resultados, sin embargo la reducción de la calidad de la imagen si repercute directamente en el uso de recursos dedicados al procesamiento, se requiere también una memoria que tenga la capacidad de alojar al menos una imagen completa (1 MB) ya que es de esta memoria de donde se obtienen los pixeles a mostrar en la pantalla VGA, así como de una alta frecuencia de operación para que tenga la capacidad de entregar rápidamente los datos consultados, es importante mencionar que muchas de los sistemas utilizados en la actualidad habitualmente realizan el procesamiento de la imagen en un proceso por separado al cual se le asigna un tiempo de procesador específico en el que entra a realizar operaciones; en este trabajo se aprovechan dos de las principales características de los dispositivos FPGA, el paralelismo de procesos y la velocidad de operación, en otras palabras la imagen es procesada pixel a pixel conforme estos van siendo adquiridos, por otro lado es necesario mostrar al usuario los resultados obtenidos por el sistema, es por esto que el uso de un monitor VGA se vuelve indispensable; el elemento principal y como unidad encargada tanto de administrar los periféricos así como de realizar las operaciones internas de procesamiento es una FPGA que cumpla con los requerimientos de velocidad para poder explotar al máximos las características de los periféricos seleccionados (sensor APS, memoria externa, monitor VGA), que cuente con los pines necesarios para la conexión con estos así como de los LEs (Logic Elements) necesarios para describir el hardware requerido para el sistema. El sistema cuenta con el sensor APS como periférico de entrada, mientras que el monitor lo es de salida y la memoria forma parte de la unidad central.

### 4.2.3 Sensor APS- Toshiba TCM8230MD

Como ya se mencionó anteriormente la resolución sugerida para este tipo de aplicaciones es VGA de 640*480 pixeles y esta cámara cumple con ese requerimiento. El tamaño de la imagen cumple con el formato óptico de 1/6 de pulgada, usa la tecnología CMOS para así de esta forma habilitar las operaciones de bajo consumo y provee una excelente reproducción de color a través de su filtro primario y gracias a que incorpora un procesador de señales embebido su diseño es compacto y simple(TOSHIBA, 2008). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran algunas de las principales características del sensor entre las que destaca la frecuencia de operación máxima y mínima permitida, es decir, a la velocidad que arroja los pixeles.

Tabla 4-1. Principales características TCM8230MD

| **Tamaño** | **6*6*4.5 mm** |
|---|---|
| **Bus de Configuración** | I2C(Inter-Integrated Circuit) |
| **Tamaño del Sensor Óptico** | 1/6 de Pulgada |
| **Tamaño del Pixel** | 3.75µm*3.75µm |
| **Filtro de Color** | RGB, Bayern |
| **Velocidad de Cuadro** | 30fps |
| **Precisión** | 10 bits |
| **Campo de Vista Horizontal** | 57.4° |
| **Campo de Vista Vertical** | 44.5° |
| **Campo de Vista Diagonal** | 69.1° |
| **Frecuencia de Reloj Mínima** | 12 MHz |
| **Frecuencia de Reloj Máxima** | 25 MHz |

### 4.2.4 Memoria SRAM- CYPRESS CY7C1370D

La principal función de esta memoria es almacenar los pixeles que son enviados por el sensor APS y así formar un mosaico de la imagen que posteriormente será solicitado por el módulo VGA y de este modo mostrar la imagen al usuario, se optó por una memoria SRAM (Static Random Access Memory) ya que esta tecnología está basada en semiconductores y así de este modo tiene la capacidad de mantener los datos mientras esté alimentada sin la necesidad de circuito de refresco, a diferencia de una memoria DRAM (Dynamic Random Access Memory) que está formada por condensadores y resultado de esto necesita de un circuito de refresco dinámico de sus cargas. Entre sus principales características está la capacidad de almacenamiento que es de 2 MB y como se mencionó el requisito mínimo es de 1 MB, por otro lado ofrece buena frecuencia de operación, 250 MHZ (CYPRESS, 2012), que es óptima para la aplicación tal y como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

Tabla 4-2. Principales características CY7C1370D

| **Capacidad** | **2048 Bytes** |
|---|---|
| **Frecuencia de Operación** | 250 MHz |
| **Latencia** | 2.6 ns |
| **Voltaje de Operación** | 3.3 V |

### 4.2.5 Monitor VGA- Multek 9928DPTL070H-01

Fue necesario utilizar un monitor de resolución VGA de 640*480 pixeles de acuerdo a lo establecido en la etapa de requerimientos principales del sistema, este periférico de salida no cumple con tareas de alta prioridad para el sistema ya que únicamente es usado para mostrar la imagen capturada por el sensor APS así como de mostrar los resultados obtenidos por el análisis ejecutado, al ser de baja prioridad para el sistema se le delega mayor precedencia al uso de memoria

SRAM para proceso de adquisición de pixeles. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se pueden observar las principales características de la pantalla VGA, entre la cuales destacan una frecuencia de operación de 33 MHz, una resolución por pixel de 24 bits, es decir, 8 bits por cada valor triestímulo del espacio de color RGB (Red Green Blue) y la resolución de 800*480 pixeles (Terasic, 2011), dado que el sensor APS tiene una resolución de 640*480 pixeles se descartan los 160 pixeles horizontales restantes colocándolos con un fondo de color negro.

Tabla 4-3. Principales características Multek

| **Resolución** | **800*480 Pixeles** |
|---|---|
| **Resolución por Pixel** | 24 Bits |
| **Frecuencia de Operación** | 33 MHz |
| **Voltaje de Operación** | 3.3 V |

### 4.2.6 FPGA- CYCLONE III EP3C40Q240C8N

Es la parte principal del sistema debido a que es el dispositivo encargado de administrar los periféricos de entrada y de salida, administrar la lógica interna como multiplicadores embebidos, PLL's (Phase-Locked Loop), memorias RAM embebidas, relojes globales etc., la familia Cyclone III ofrece una combinación única de alta funcionalidad, bajo consumo y bajo costo (Altera Corporation, 2012a). Entre las características más importantes se encuentran 39600 LEs, 4 PLLs con cinco salidas cada uno de ellos resultando en 20 relojes globales y 128 pines de propósito general de entrada y salida (Altera Corporation, 2007) como se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 4-4. Principales características EP3C40Q240C8N

| | |
|---|---|
| **Les** | **39,600** |
| **Bloques de memoria M9K** | 126 |
| **Memoria total (Mbits)** | 1.1 |
| **Multiplicadores 18*18** | 126 |
| **PLL's** | 4 |
| **Relojes globales** | 20 |
| **Número máximo de pines I/O** | 128 |
| **Grado de velocidad** | C8 |

Además las especificaciones de frecuencias máximas se pueden observar en la siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en donde los valores mostrados están basados en la caracterización actual por el fabricante, esos números representan el desempeño actual del dispositivo bajo el peor proceso del silicio, voltaje y condiciones de temperatura de junción, es decir, el fabricante garantiza el óptimo funcionamiento del dispositivo por debajo o hasta esas frecuencias. Se puede observar que la salida de reloj hacia un pin externo puede trabajar hasta una frecuencia de 472.5 MHz y los pines I/O hasta 200 MHz (Altera Corporation, 2012b) lo que refleja que es conveniente trabajar un reloj global de 200 MHz como frecuencia máxima ya que en este caso se utiliza una sola frecuencia y garantiza el óptimo funcionamiento de todos los bloques internos de la FPGA.

Tabla 4-5. Frecuencias máximas

| | |
|---|---|
| **Bloques de memoria M9K** | **260 MHz** |
| **Relojes globales** | 402.5 MHz |
| **Salida de PLLs a pin externo** | 472.5 MHz |

| | |
|---|---|
| **FIFO (First Input First Output)** | 238 MHz |
| **Configuración AS (Active Serial)** | 20-40 MHz |
| **Pines I/O de propósito general** | 200 MHz |

### 4.2.7 Consideraciones para el diseño del sistema

Se seleccionó la EP3C40Q240C8N que tiene 39600 LEs, sin embargo el fabricante Altera recomienda seleccionar un dispositivo que tenga más elementos lógicos que el número estimado (Altera Corporation, 2013) ya que ofrece ventajas como:

- Se tendrá elementos lógicos extra si se desea actualizar o expender el diseño.
- Para propósitos de debuggeo se requiere de elementos lógicos adicionales.
- Recursos adicionales permite mayor flexibilidad con el software Quartus II para la optimización de ubicación y ruteo para un máximo desempeño, bajo consumo o en el mejor de los casos ambos.

#### 4.2.7.1 Voltajes de Alimentación

La FPGA necesita trabajar con valores distintos de voltajes, en donde 1.2 V se usan para alimentar a la lógica interna (VCCINT) y para la alimentación digital de los módulos PLL (VCCD-PLL), 2.5 V para la alimentación analógica de los módulos PLL (VCCA), además los bancos de pines I/O pueden trabajar con distintos valores de voltajes (VCCIO), 3.3 V, 3.0 V, 2.5 V, 1.8 V, 1.5 V y 1.2 V que dependen de las tensiones que manejen los dispositivos que estén conectados a los bancos de pines, sin embargo como ya se mencionó todos los dispositivos usados trabajan a una tensión de 3.3 V a excepción del sensor APS que emite

señales de 2.8 V pero debido al estándar CMOS3.3, esta tensión está dentro de los valores requeridos para un 1 lógico, así que la tensión usada para alimentar los buffers de entrada y salida (VCCIO) es de 3.3 V para el estándar CMOS3.3.

#### 4.2.7.2 Relojes y Módulos PLL

La EP3C40Q240C8N provee hasta 16 pines dedicados para los relojes (CLK[15..0]) que pueden manejar los relojes globales (GLKs), soporta cuatro pines dedicados para relojes en cada lado del dispositivo como muestra la siguiente figura, estos pines pueden ser conectados a los GLKs o en su defecto para alimentar a los módulos PLL, es importante mencionar que los GLKs se distribuyen a través del dispositivo entero, alimentando al dispositivo en todos sus cuadrantes. En este diseño se han dedicado dos pines CLK a dos frecuencias diferentes, 50 MHz y 12 MHz, para tener referencias a frecuencias distintas. En cuanto a la salidas de los módulos PLL es necesario utilizar un bloque de control de reloj disponible en el software Quartus II, este módulo sirve para conectar las salidas de los módulos PLL a los pines dedicados para las salidas externas o a los GLKs, en este caso se han usado tres módulos PLL y tres módulos de control de reloj diferentes, uno de ellos para el reloj de lógica interna GLKs y dos más de ellos para las salidas de reloj de 33 MHz para el monitor VGA y 200 MHz para la memoria SRAM, es importante señalar que sólo la salida C0 puede ser conectada al pin de reloj externo.

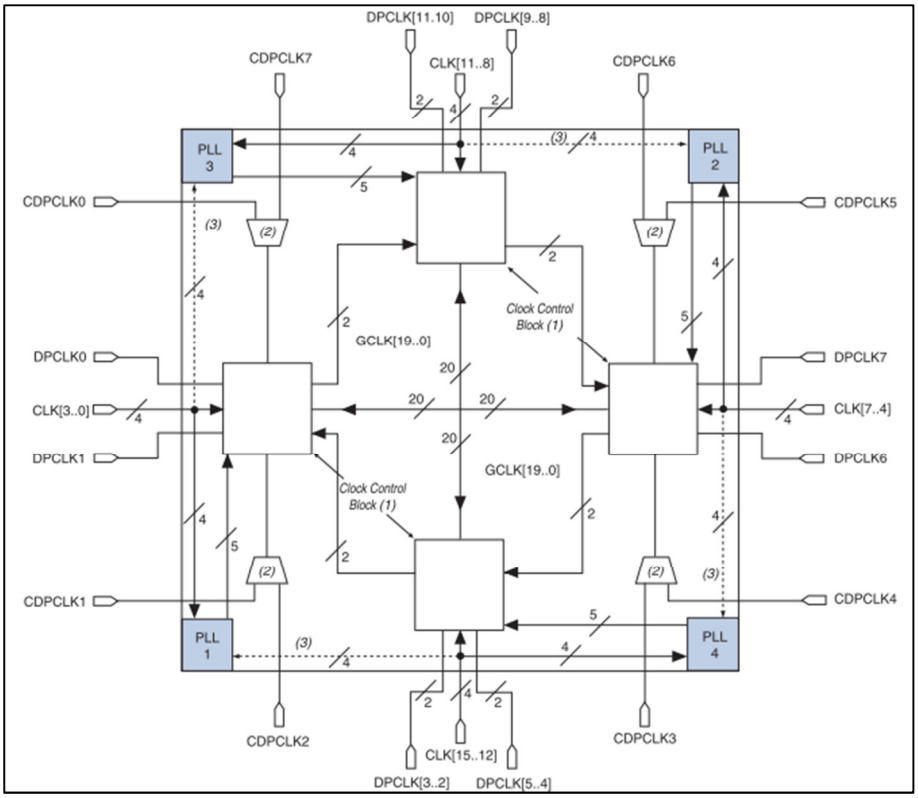



Figura 4-3. Distribución de CLKs, PLLs y GLKs (Altera Corporation, 2012a)

### 4.2.7.3 Bancos de entrada y salida I/O

Los pines de entrada y salida I/O en la EP3C40Q240C8N están agrupados juntos dentro de bancos de entrada y salida (I/O banks) y como ya se mencionó cada uno de ellos tiene un bus de alimentación separado de cada uno de los otros buses de alimentación, cuenta con ocho bancos de entrada y salida como se muestra en la siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

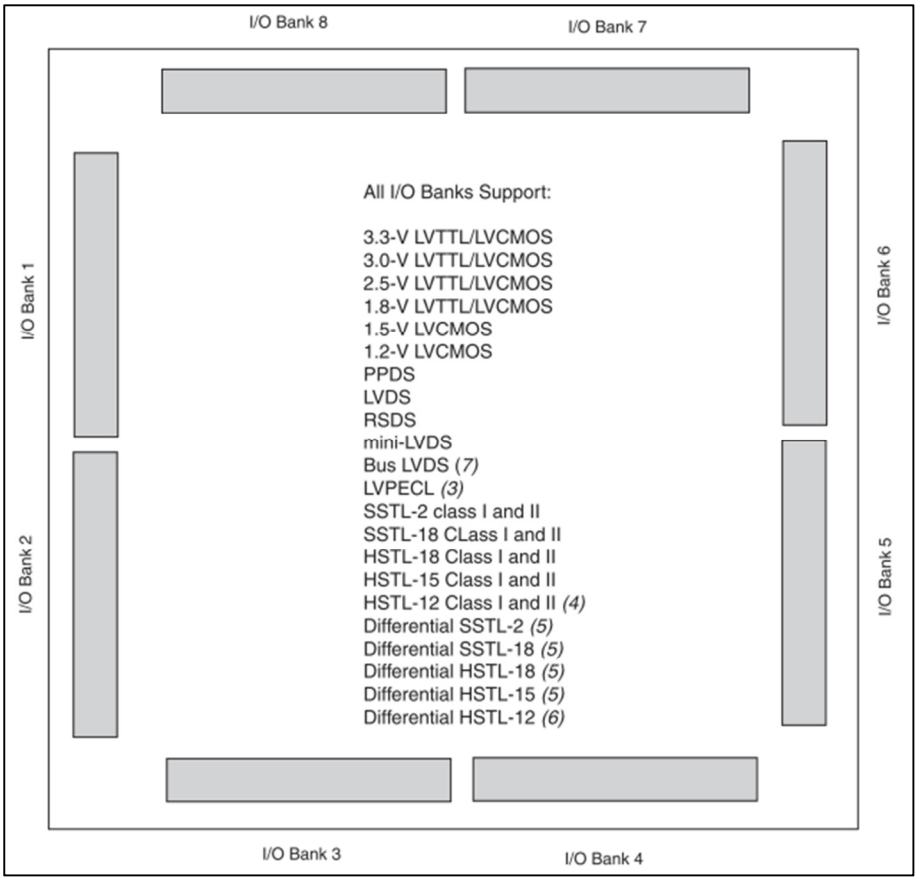



Figura 4-4. Distribución de bancos de entrada y salida I/O (Altera Corporation, 2012a)

#### 4.2.7.4 Configuración de la FPGA

A continuación se describe paso a paso el proceso de configuración por el cual la EP3CQ240C8N debe pasar para poder llegar al modo usuario.

##### 4.2.7.4.1 Encendido

Si el dispositivo es encendido todos los niveles de voltaje de los bancos de entrada y salida (VCCIO) así como los voltajes VCCINT, VCCA, deben estar correctamente alimentados para que el dispositivo salga del estado POR (Power On Reset).

#### 4.2.7.4.2 Reset

Cuando los pines nCONFIG o nSTATUS muestran un estado bajo quiere decir que el dispositivo se encuentra en estado de Reset y todos los pines I/O se ponen en estado de alta impedancia, después del encendido pasa por el estado POR, al salir del estado POR la FPGA libera el pin nSTATUS el cual está conectado a una resistencia pull-up de 10 KΩ, después de esto pasa a un estado de configuración y el dispositivo está listo para recibir la configuración de la memoria EPCS16.

#### 4.2.7.4.3 Configuración

La información de configuración es muestreada durante cada ciclo de reloj (DCLK). Después de recibir toda la información el dispositivo libera el pin CONF_DONE que está conectado a una resistencia pull-up externa de 10 KΩ, una transición de estado alto a bajo en el pin CONF_DONE indica que la configuración está compuesta y la inicialización del dispositivo puede empezar.

#### 4.2.7.4.4 Error de Configuración

Si ocurre un error durante la configuración la EP3C40Q240C8N coloca la señal de nSTATUS en estado lógico bajo, indicando que hubo un error en la adquisición de la información y como resultado el pin CONF_DONE permanece en estado bajo.

#### 4.2.7.4.5 Inicialización

En la EP3C40Q240C8N existen dos fuentes de reloj para la inicialización, un oscilador interno de 10 MHz o un pin opcional llamado CLKUSER, en este caso

se ha utilizado la opción por default que es la del oscilador interno la cual requiere de 3.185 ciclos de reloj para una correcta inicialización.

4.2.7.4.6 Modo Usuario

Existe una opción de habilitar el pin INIT_DONE en el que una transición de estado bajo a alto indica que la inicialización ha terminado y el modo usuario empieza, en este modo todos los pines I/O funcionan como fueron asignados dentro del diseño.

Todas las etapas anteriores pueden ser resumidas en un diagrama de tiempos, el cual se muestra en la siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

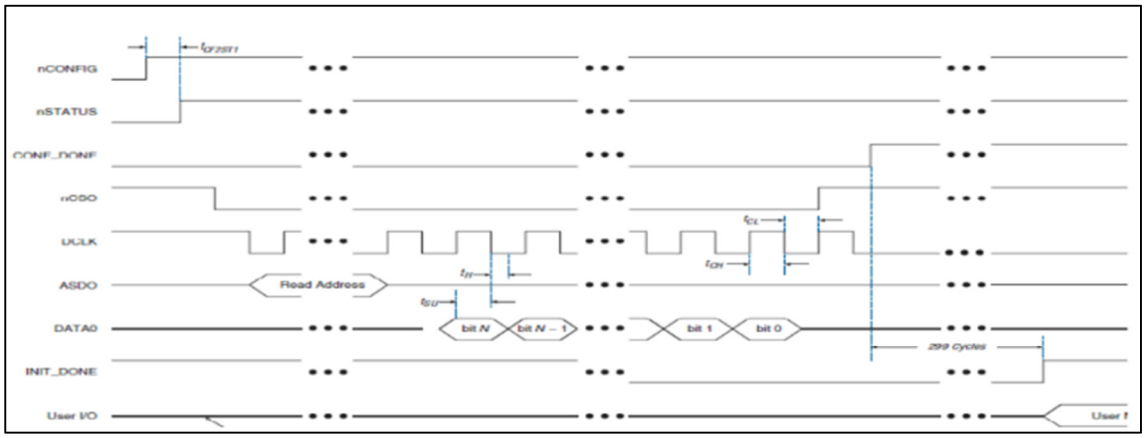



Figura 4-5. Diagrama de tiempos configuración AS (Licón-Gutiérrez et al., 2012)

Para la configuración del dispositivo FPGA se seleccionó el método de configuración AS en su modalidad de fast POR que consiste en cargar el programa a la memoria de la FPGA desde una memoria flash externa EPCS16 de la cual se muestran sus principales características en la siguiente tabla**¡Error! No**

**se encuentra el origen de la referencia.** (Altera Corporation, 2014), el fabricante altera además recomienda usar el SFL (Serial Flash Loader) para reducir los elementos necesarios en el diseño del PCB (Printed Circuit Board) ya que se puede programar el dispositivo EPCS vía JTAG y de esta forma evitar tener interfaces de programación separadas (Altera Corporation, 2013).

Tabla 4-6. Características EPCS16

| | |
|---|---|
| **Tamaño de memoria** | **1,048,576 bits** |
| **Soporte para descompresión On-Chip** | No |
| **Soporte ISP** | Si |
| **Soporte de cascada** | No |
| **Reprogramable** | Si |
| **Voltaje de operación** | 3.3 V |

Para seleccionar el método de configuración se usaron los pines dedicados llamados MSEL, con los cuales dependiendo la configuración binaria de ellos representa el método seleccionado, en este caso para la configuración usada la combinación es “101” para los pines MSEL[2]…MSEL[0], es extremadamente importante mencionar que estos pines deben de estar conectados a la alimentación VCCA de 2.5 V.

En la familia Cyclone III el reloj maestro activo corre a una frecuencia máxima de 40 MHz tal y como muestra la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y típicamente es de 30 MHz, la configuración serial provee una interface serial para accesar a la información de configuración, durante la configuración la EP3C40Q240C8 lee la información de configuración usando la interface serial, la descomprime de ser necesario y configura su propia SRAM.

La configuración AS consta de cuatro líneas las cuales pueden observarse en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y que se enumeran a continuación:

- Entrada de reloj serial (DCLK)
- Salida de datos serial (DATA)
- Entrada de información AS (ASDI)
- Selector de chip activo en bajo (nCS)

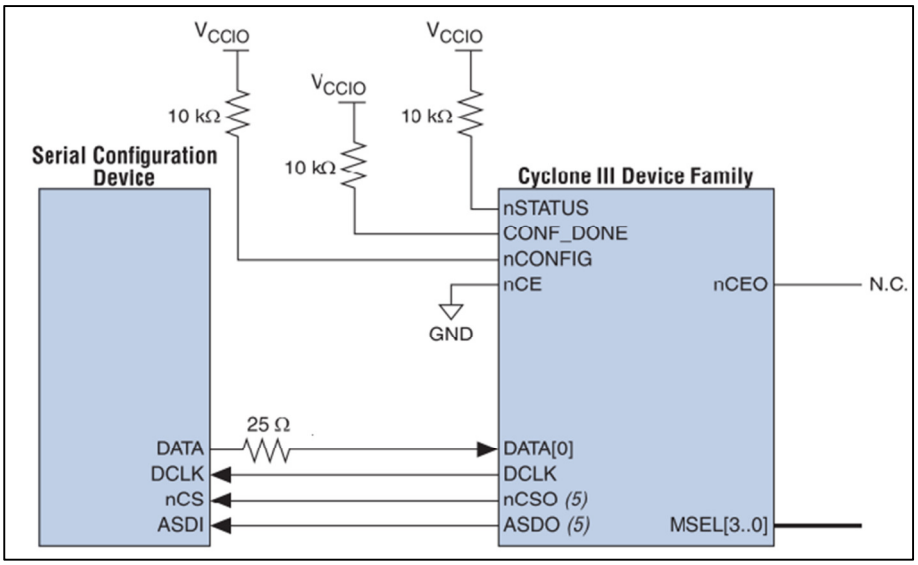



Figura 4-6. Configuración AS (Altera Corporation, 2012a)

Para la configuración AS la longitud de las pistas en el PCB y la capacitancia entre la memoria EPCS16 y la EP3C40Q240C8N deben de seguir las especificaciones recomendadas en la siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

Tabla 4-7. Longitud y capacitancia recomendadas (Altera Corporation, 2012a)

| Pin AS | Longitud Máxima | Capacitancia Máxima |
|---|---|---|
| **DCLK** | 25.4 cm | 15 pF |
| **DATA [0]** | 25.4 cm | 30 pF |
| **nCSO** | 25.4 cm | 30 pF |
| **ASDO** | 25.4 cm | 30 pF |

Como se mencionó el sistema fue diseñado para trabajar de forma híbrida, es decir, en combinación con las configuraciones JTAG y AS, esto para ahorrar componentes en el momento del diseño del PCB. A continuación se describe como debe ser diseñada la configuración AS.

4.2.7.4.7 Configuración JTAG

Los cuatro pines requeridos para la operación del dispositivo en modo JTAG son TDI, TDO, TMS y TCK. El pin TCK tiene una resistencia pull-down interna mientras que para los pines TDI y TMS es pull-up de 25 KΩ. El pin TDO es alimentado por la fuente VCCIO en el banco de entrada y salida número uno. Para descargar los datos por medio de la configuración JTAG es necesario usar un cable de descarga como puede ser USB-Blaster, MasterBlaster, ByteBlaster II, ByteBlasterMV o Ethernet-Blaster, en este trabajo el cable usado es el USB-Blaster que usa un conector de diez posiciones organizados en dos líneas.

Los pines de la configuración JTAG en conjunto con el cable de descarga USB-Blaster se observan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y se enumeran a continuación:

- Test data input (TDI)
- Test data output (TDO)
- Test mode select (TMS)
- Test clock input (TCK)

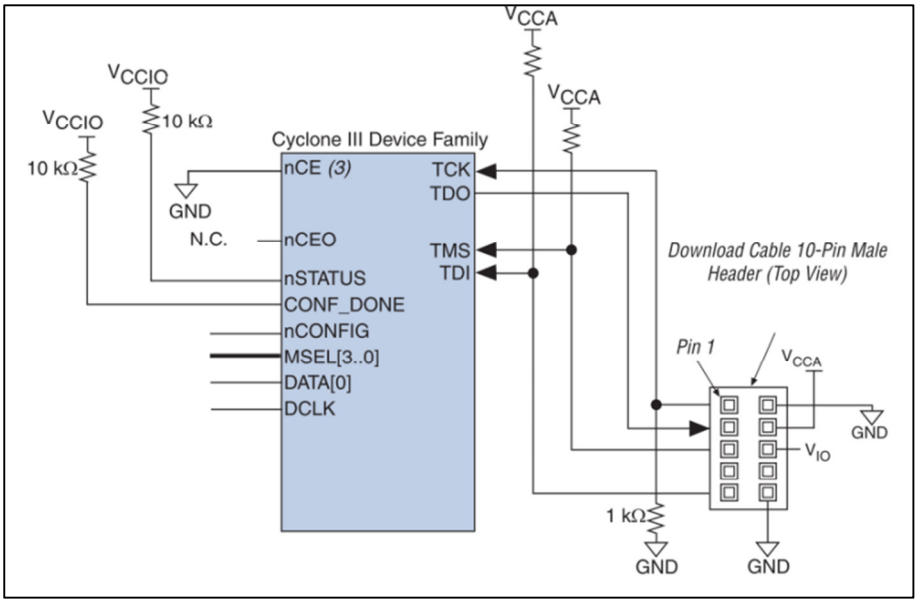



Figura 4-7. Configuración JTAG (Altera Corporation, 2012a)

Como se mencionó, la programación de la memoria flash EPCS16 en este sistema se hizo por medio de la configuración JTAG en lugar de la programación propia de la configuración AS, en este método se usa el SFL el cual se describe en el siguiente punto.

4.2.7.4.8 Programar la EP3C40Q240C8N con SFL

La FPGA EP3C40Q240C8N soporta la programación in-system de una memoria EPCS16 mediante la interfaz JTAG usando un diseño SFL. El USB-Blaster puede usar los cuatro pines de la interfaz JTAG para programar la memoria flash EPCS16 incluso si este no tiene acceso a los pines de configuración de la interfaz AS. El SFL es un puente para que la FPGA que usa su

interfaz JTAG para acceder a la configuración indirecta de la JTAG de la EPCS usando un archivo .jic. El diagrama híbrido queda como se muestra en la siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

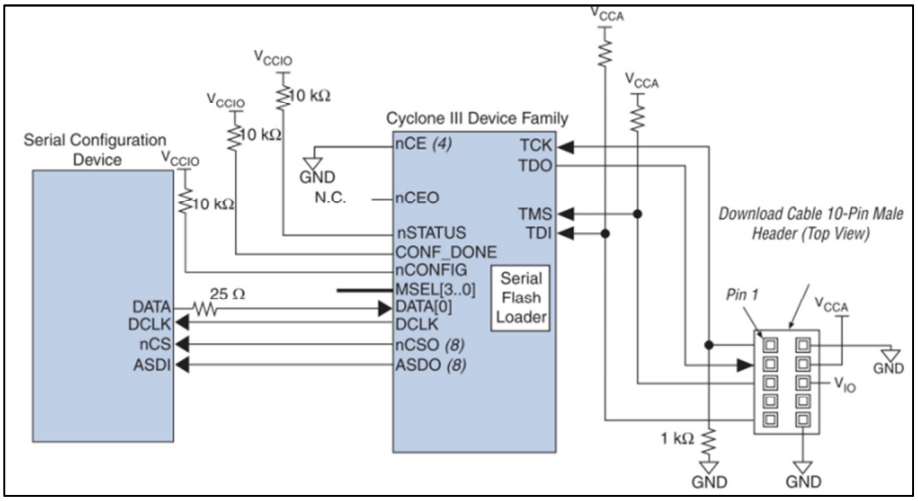



Figura 4-8. Configuración SFL (Altera Corporation, 2012a)

4.2.7.4.9 Generar y cargar el archivo .jic para el SFL

Se ha mencionado que es necesario crear un archivo .jic para poder utilizar la programación tipo SFL pero no se ha dicho como, a continuación se enumeran y describen los pasos para generar el archivo .jic para programar la memoria flash EPCS, es importante resaltar que estos pasos prosiguen de la compilación del diseño y la generación del archivo .sof:

- Una vez generado el archivo .sof abrir el conversor de archivos de programación en el software Quartus II ubicado en File->Convert Programming Files.
- Seleccionar la opción JTAG Indirect Configuration File.
- Seleccionar el dispositivo de configuración a EPCS16.
- Seleccionar el nombre y ruta en donde será arrojado el archivo .jic.
- Seleccionar el archivo .sof previamente generado.

- Seleccionar el dispositivo en la opción de Flash Loader, en este caso es EP3C40Q240C8N.
- Por último dar click en la opción Generate.
-

El archivo está generado y listo para ser programado, para ello se selecciona la opción Programmer en modo JTAG en Quartus II, se selecciona el archivo .jic previamente generado y por último se da click en la opción start.

#### 4.2.7.5 Diseño del PCB

Hasta este punto se conocen los requerimientos del sistema así como las consideraciones para el diseño del PCB, en este apartado se expone como fue su diseño en el software CAD (Computer-Aided Design) Altium Designer en su versión 14.3.

##### 4.2.7.5.1 Conexión de las fuentes de alimentación

Las fuentes de alimentación son demasiado importantes en este tipo de aplicaciones ya que si la alimentación queda sucia o ruidosa el dispositivo tendrá problemas de funcionamiento, es por eso que se debe seleccionar minuciosamente los reguladores que van a ser usados, en este caso se han seleccionado dos reguladores de voltaje del tipo conmutado para las tensiones de 5.0 V y 3.3 V y para el resto de tensiones reguladores lineales con ultra baja caída de voltaje y con filtros integrados, en la siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los números de serie de cada uno de los reguladores utilizados, el precio por unidad en dólares americanos y en qué parte dentro del PCB es utilizado.

Tabla 4-8. Reguladores de tensión

| Voltaje | Número de serie | Precio | Utilización |
|---|---|---|---|
| **1.2 V** | LP3879MR-1.2 | 2.34 Dlls | FPGA |
| **1.5 V** | TPS73215DBVT | 2.09 Dlls | APS |
| **s2.5 V** | TPS73725DCQR | 1.67 Dlls | FPGA |
| **2.8 V** | ADP170AUJZ-2.8 | 1.07 Dlls | APS |
| **3.3 V** | LM2676S-3.3 | 5.44 Dlls | SRAM, FPGA, FLASH |
| **5.0 V** | LM2676SX-5.0 | 4.67 Dlls | VGA |

La siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra un ejemplo del esquemático realizado en Altium el cual corresponde al regulador de 1.2 V.

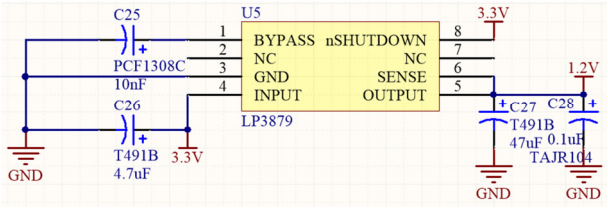



Figura 4-9. Diagrama de conexión regulador 1.2 V

4.2.7.5.2 Conexión de la memoria SRAM

La memoria SRAM tiene un empaquetado TQFP-100, los pines de direcciones y datos son conectados a los pines I/O estándar de la FPGA a excepción del pin CLK que es conectado directamente al pin de uso dedicado que corresponde a la salida de reloj del módulo PLL, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el diagrama de conexión correspondiente en Altium.

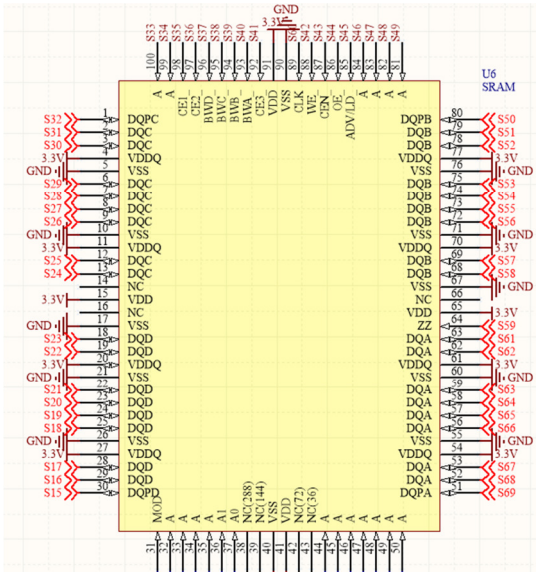



Figura 4-10. Conexiones de la memoria SRAM

4.2.7.5.3 Esquemático monitor VGA

El monitor VGA viene con todo su hardware necesario para operar por lo que únicamente es necesario conectarle las señales de comunicación y las tensiones correspondientes, al igual que en la memoria SRAM el pin de reloj del monitor está conectado directamente a uno de los pines dedicados de salida de reloj de los módulos PLL. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra la distribución de los pines del monitor VGA.

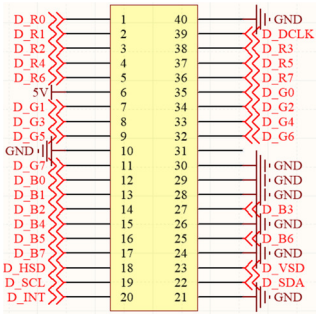



Figura 4-11. Distribución de pines monitor VGA

4.2.7.5.4 Sensor APS

El sensor APS está conectado a los pines CLK restantes, esto porque los pines CLK funcionan únicamente como pines de entrada y además son los pines más rápidos, esto para no perder pixeles en el proceso de adquisición de la imagen, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el esquemático de conexiones del sensor APS en Altium.

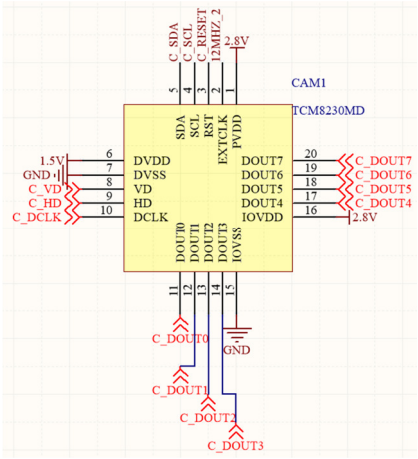



Figura 4-12. Esquemático del sensor APS

4.2.7.5.5 Configuración de la FPGA EP3C40Q240C8N

La configuración de la FPGA se divide en varias secciones que se describen y enlistan a continuación:

Conexiones con el USB-Blaster

De acuerdo a las secciones anteriores se hace las conexiones correspondientes entre el conector del USB-Blaster y la FPGA.

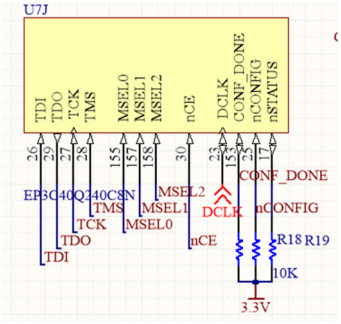



Figura 4-13. USB-Blaster lado FPGA

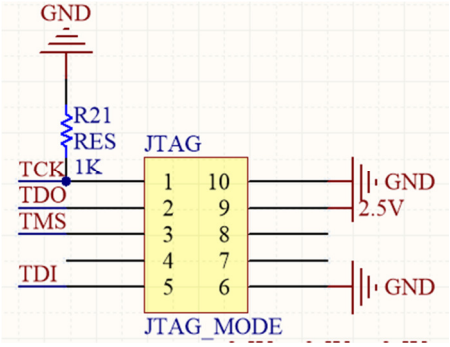



Figura 4-14. USB-Blaster lado conector

Esquemático de la memoria flash EPCS16

La memoria flash EPCS16 tiene un empaquetado SOIC-8, las conexiones se hacen conforme a lo descrito en secciones anteriores, en la siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa las conexiones correspondientes.

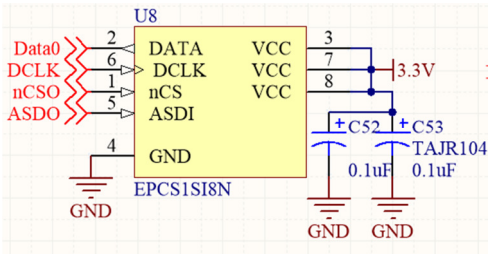



Figura 4-15. Esquemático EPCS16

Cristales y señales del sensor APS

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra las conexiones de los cristales de 50 MHz, 12 MHz y las señales provenientes del sensor APS.

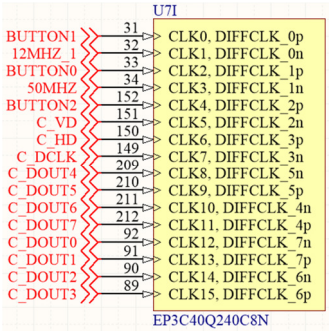



Figura 4-16. Conexiones cristales y sensor APS

Bancos de pines de entrada y salida I/O

Se muestra un ejemplo en la siguiente figura de los ocho bancos de entrada y salida que conforman la FPGA EP3C40Q240C8N, el banco 3 en donde se conecta las señales del monitor VGA, es importante resaltar que la señal de reloj del monitor está conectada al pin PLL1_CLKOUTp de la FPGA el cual corresponde a la salida de reloj del módulo PLL1.

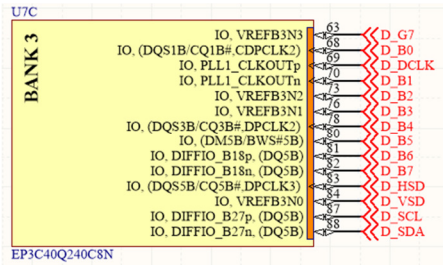



Figura 4-17. Banco I/O número 3

4.2.7.5.6 PCB ruteado

El software CAD permite hacer el ruteo de las pistas, colocación de los dispositivos, así como generar vistas tanto en dos y tres dimensiones.

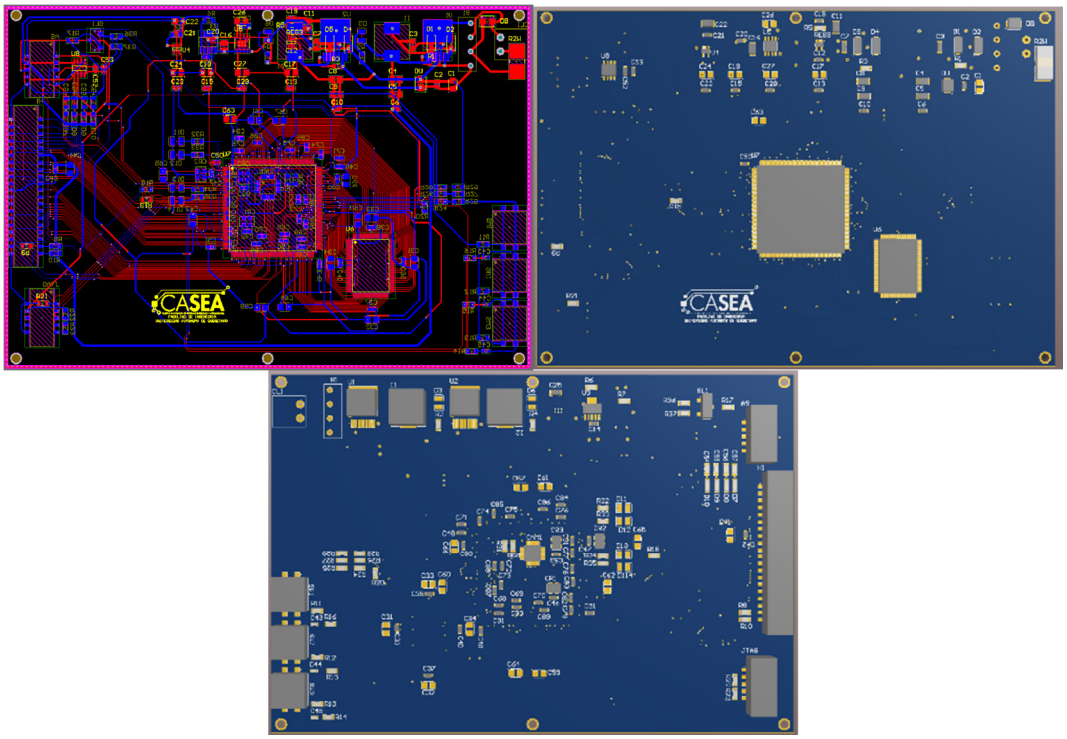


Figura 4-18. Ruteo del PCB (Arriba izquierda), vista 3D de la cara superior (Arriba derecha)y vista 3D de la cara inferior (Abajo).

## 4.3 Pruebas de laboratorio.

Las pruebas de laboratorio fueron supervisadas por el equipo de trabajo del Dr. Juan Fernando García Trejo, las muestras fueron obtenidas de los invernaderos experimentales del campus Amazcala, todas ellas dentro de los seis grados de maduración establecidos por la FAO (Food and Agriculture Organization), esta etapa se dividió en varias fases.

### 4.3.1 Prueba por cromatografía

#### 4.3.1.1 Fase preparativa: extracción

Para el análisis de carotenoides se requiere de la preparación de un extracto a partir de la matriz de la muestra, que contenga los pigmentos de interés y que además esté libre de moléculas que puedan interferir en dicho análisis.

La recuperación en muestras sólidas es complicada al constituir el fruto una matriz natural con una alta actividad enzimática, por lo que deben tomarse las precauciones necesarias con el fin de evitar modificaciones químicas, que ocurren frecuentemente en el proceso. Los métodos de protección de estos compuestos frente a dichos procesos degradativos incluyen la adición de antioxidantes (BHT) durante la extracción y el uso de contenedores que protejan algunos compuestos fotosensibles presentes en la muestra.

Para ello y de acuerdo al método propuesto por García-Trejo (2014) se llevó a cabo el desarrollo de una metodología de extracción que implica pruebas con diversos solventes y procedimientos de preconcentración, con la técnica de extracción por fluidos supercríticos. A menudo se emplea la extracción líquido-líquido o la extracción en fase sólida. Estos métodos convencionales tienen varias

limitantes debido a los largos tiempos de extracción y a las precauciones necesarias para proteger a los analitos de los procesos de degradación.

El método de extracción seleccionado fue el de extracción con fluidos supercríticos (SFE). Un fluido (gas) por encima de su punto crítico (punto supercrítico) exhibe las propiedades de solvatación de un disolvente líquido. La mayor ventaja de esta técnica sobre los métodos tradicionales de preparación de muestras es el uso de fluidos supercríticos no tóxicos como el dióxido de carbono (CO2). Aunque se han investigado muchos fluidos supercríticos (compuestos fluorocarbonados, N2O, SF6, NH3), el más comúnmente usado como fluido supercrítico es el dióxido de carbono (CO2). Alcanza el estado supercrítico a una presión (72.9 atm) y temperaturas (31.3 ºC) relativamente bajas. Es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, muy inerte químicamente y fácil de conseguir. Es apolar, pero su polaridad puede ajustarse con modificadores como la acetona, metanol o etanol. Su rápido poder de penetración y solvatación proporciona altas recuperaciones para muchos analitos. Hay que indicar además que la polaridad del fluido seleccionado puede ser modificada apropiadamente para optimizar el aislamiento de los compuestos de interés (Piñeiro et al., 2005).

4.3.1.1.1 Preparación de la muestra

Se recolectaron muestras de tomate variedad bola en sus 6 diferentes estados de maduración, se realizó la selección de tomates en estadio 6, que corresponde al de mayor maduración, ya que en esta etapa el contenido de pigmentos es mayor. La preparación de la muestra consistió en el lavado y pelado de los frutos, ya que solamente se utilizó la cáscara (mayor contenido de pigmentos) para su posterior secado a 30ºC por 10 días en una estufa de secado de convección forzada marca Memmert m, con el fin de retirar la mayor cantidad de humedad para facilitar la extracción. Después se procedió con la molienda de

la muestra para aumentar la superficie de contacto de los solventes sobre la matriz.

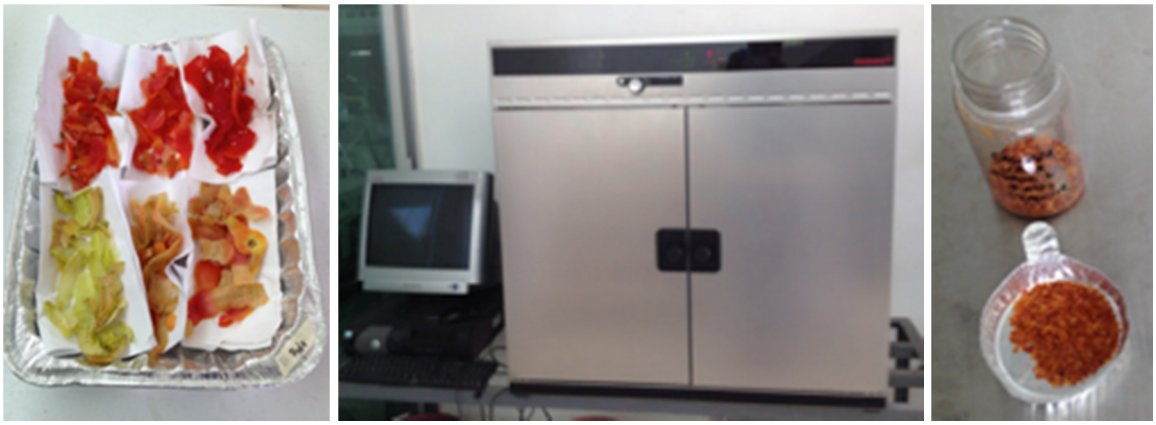


Figura 4-19. Material vegetal en los 6 estadíos de maduración (Izquierda), estufa de secado de convección forzada con la cual se realizó la operación de secado (Centro) y Material vegetal seleccionado y procesado para las pruebas de extracción de carotenoides (Derecha).

4.3.1.1.2 Desarrollo del método de extracción

Para llevar a cabo la fase preparativa se utilizó el sistema de ASFE® MV-10 Waters® debido a las múltiples ventajas que ofrece frente a los métodos anteriormente mencionados, algunas de las cuales se enuncian a continuación:

- Utiliza CO2 el medio ambiente en lugar de disolventes orgánicos tóxicos
- Mayor eficiencia de extracción (tiempo, costos, etc.), así como la selectividad frente a diversos analitos.
- Mejor manejo y recuperación de extractos (Waters®, 2015)

Figura 4-20. Sistema de ASFE® MV-10 (Waters®, 2015)

El desarrollo del método de extracción se realizó por medio del software con el que cuenta el equipo (Chromscope) y se definió a partir de las propiedades del analito. Las pruebas para el establecimiento del método de extracción se describen a continuación:

- Elección del co-solvente de extracción: Se probaron 2 diferentes co-solventes que de acuerdo con la literatura son los más adecuados para la extracción de carotenoides en conjunto con el CO2 supercrítico (solvente principal):
    - Hexanos
    - "Mezcla de Fish" : Etanol:1, Hexanos:2, Acetona (Fish et al., 2002)
- Establecimiento del tiempo de extracción: el método está compuesto por diferentes etapas de extracción en las que se variaron los lapsos de tiempo así como las repeticiones del método completo, con el fin de recuperar el mayor contenido del pigmento en el extracto. Después de diversas pruebas se estableció un tiempo final de extracción de 120 minutos, divididos en 8 pasos de 15 minutos cada uno; 14 minutos correspondieron a fase dinámica y un minuto a fase estática. El método completo constó de 6 repeticiones del ciclo de 120 minutos, a la séptima repetición el contenido de carotenoides en el extracto se consideró debajo del límite de detección.

- Establecimiento del flujo, presión y temperatura de extracción: una vez definido el tiempo se procedió con la variación en el flujo de co-solvente, CO2 y presión de extracción. La temperatura se mantuvo fija a 35ºC ya que el rango de variación del equipo es de ±5ºC y los carotenoides son compuestos termolábiles, es decir, a 40ºC las moléculas comienzan a sufrir degradación. Se establecieron finalmente 2 métodos que se escriben a continuación en la las siguientes tablas.

Tabla 4-9. Método #1

| PASO | FLUJO CO-SOLVENTE (ml/min) | FLUJO CO2 (ml/min) | Presión (bar) | Duración dinámica (min) | Duración estática (min) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0.5 | 0.5 | 100 | 14 | 1 |
| **2** | 0.25 | 1 | 100 | 14 | 1 |
| **3** | 0.25 | 1 | 150 | 14 | 1 |
| **4** | 0 | 1 | 150 | 14 | 1 |
| **5** | 0.5 | 1 | 150 | 14 | 1 |
| **6** | 0.5 | 1.5 | 150 | 14 | 1 |
| **7** | 0.25 | 2 | 150 | 14 | 1 |
| **8** | 0 | 2 | 150 | 14 | 1 |

Tabla 4-10. Método #2

| PASO | FLUJO CO-SOLVENTE (ml/min) | FLUJO CO2 (ml/min) | Presión (bar) | Duración dinámica (min) | Duración estática (min) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0 | 1 | 50 | 14 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **2** | 0.5 | 1 | 100 | 14 | 1 |
| **3** | 0 | 1.5 | 150 | 14 | 1 |
| **4** | 0.5 | 1.5 | 150 | 14 | 1 |
| **5** | 0 | 2 | 150 | 14 | 1 |
| **6** | 0.5 | 2 | 200 | 14 | 1 |
| **7** | 0.25 | 2 | 200 | 14 | 1 |
| **8** | 0 | 2 | 200 | 14 | 1 |

4.3.1.2 Fase analítica: separación e identificación

4.3.1.2.1 Desarrollo del método cromatográfico

Posterior a la etapa de extracción se llevó a cabo la fase de separación e identificación por medio de la técnica de Ultracromatografía de Convergencia (UPC2 ®), para el desarrollo del método de separación e identificación del licopeno y β-caroteno se realizaron diferentes pruebas en base a las recomendaciones realizadas por el departamento de desarrollo de la empresa Waters®:

- Selección de la columna: se realizaron pruebas con 2 columnas:
  - ACQUITY® UPLC BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 3.0 mm X 100 mm.
  - ACQUITY® UPLC HSS (High Strength Silica) C18 Column, 100Å, 1.8 µm, 3 mm X 30 mm.
- Elección de la fase móvil: se trabajó con etanol como fase móvil, en conjunto con el $CO_2$ supercrítico (fase móvil principal), ya que es un solvente polar de baja viscosidad miscible en los solventes que se utilizaron durante la fase de extracción de los carotenoides.

- Establecimiento del tiempo de corrida: Las pruebas iniciales se realizaron con un tiempo de corrida recomendado de 5 minutos, mismo que se ajustó al término de la aparición del pico de interés (aproximadamente 3 minutos).
- El volumen de inyección fue de 5 µl.
- Establecimiento del flujo, presión y temperatura de extracción: se emplearon diferentes flujos de tanto de fase móvil como de $CO_2$, el equipo permite un flujo hasta de 4 ml/min, sin embargo, el flujo recomendado es de 1ml/min. La presión se mantuvo constante a 2000 psi, en condiciones tanto isocráticas como con diferentes gradientes en la fase móvil que iban desde 96% $CO_2$ con un 4% de solvente, hasta un 80% de CO2 con un 20% de solvente. La temperatura en el módulo de muestras (Sample Manager) se mantuvo en 10ºC y en ausencia de luz, en cuanto a la temperatura de la columna se mantuvo a 35ºC ya que el rango de variación del equipo es de ±5º, esto para proteger a las moléculas de la degradación. Las condiciones probadas se presentan a continuación:

Tabla 4-11. Métodos probados para la separación e identificación de licopeno y β-caroteno

| Gradiente de $CO_2$ | Gradiente de solvente | Presión (psi) | Temperatura de la columna (ºC) | Flujo (ml/min) | Volumen de inyección (µl) | Tiempo de corrida (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **96%** | 4% | 2000 | 35(±5) | 1 | 5 | 3 |
| **90%** | 10% | | | | | |
| **87%** | 13% | | | | | |
| **85%** | 15% | | | | | |
| **80%** | 20% | | | | | |

Se hicieron diversas inyecciones de un estándar de licopeno marca Sigma-Aldrich® proveniente de tomate con una pureza del ≥90%, así como de un estándar de β-Caroteno sintético tipo I marca Sigma-Aldrich® con un ≥97.0% de pureza. Los estándares fueron suspendidos en Etanol grado HPLC con BHT 0.1% para disminuir su degradación, y posteriormente fueron sonicados dos veces por 30 minutos. Para las inyecciones se prepararon viales a diferentes concentraciones: 10, 20 y 40 ppm, esto con el fin de identificar los picos de interés, así como su espectro en el cromatograma.

# 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Diseño e integración de la plataforma tecnológica

Una vez que la plataforma electrónica fue diseñada se ensambló y se le hicieron pruebas de funcionamiento a cada uno de los módulos principales, en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa la vista de la cara superior del PCB, en donde, al centro del mismo se encuentra la FPGA y al costado derecho la memoria SRAM, mientras que en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se aprecia la vista de la cara inferior con los botones de control del lado izquierdo y los conectores para el USB-Blaster y el monitor VGA del lado derecho, con ayuda de la herramienta SignalTap que viene con el paquete de Quartus II se capturó y mostró el comportamiento interno del diseño y las señales de entrada y salida en tiempo real mientras el diseño se encontraba corriendo a la máxima velocidad sin la necesidad de agregar pines de entrada y/o puntos de prueba.

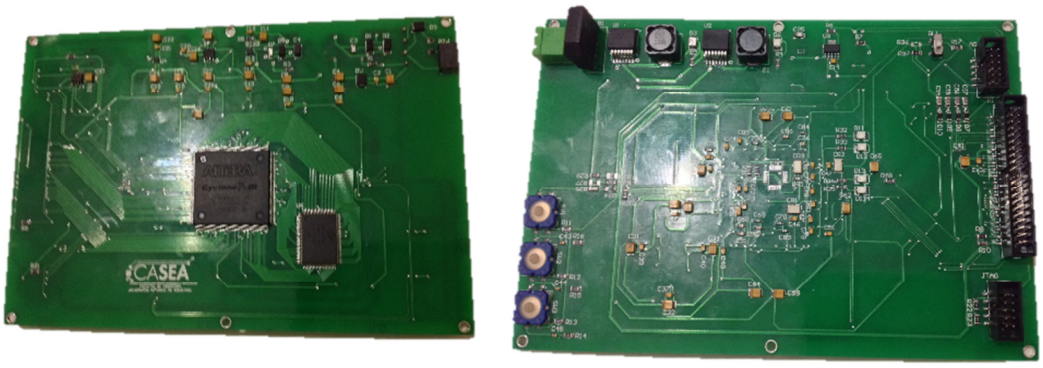



Figura 5-1. Vista de la cara superior (Izquierda). Vista de la cara inferior (Derecha).

La siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el diagrama de tiempos que arrojó la prueba del SignalTap en donde se observa que en el primer ciclo de reloj recibió la instrucción de inicio con la señal

START_PULSE se posicionó en un estado lógico alto, en el siguiente ciclo de reloj se presentó la dirección de memoria que se deseaba acceder con la señal ADDRESS_W que mostró un valor de cero, es decir, la primera localidad de la memoria así como también las señales de los *Chips Enables* se presentaron en sus correspondientes valores de habilitación, la señal de RW_N se estableció en un nivel lógico alto indicando a la memoria que correspondía a una instrucción de lectura, el siguiente ciclo de reloj fue un ciclo muerto ya que la memoria lo usa para propagar las señales , al tercer ciclo de reloj la memoria mostró el dato correspondiente a la localidad cero, es decir un valor de cero (que fue previamente cargado) y por último el valor leído se propago al bus de salida del proceso hasta el cuarto ciclo de reloj y con la señal de EOF en estado alto indicando que el proceso había llegado a su final y que el valor de lectura estaba disponible.

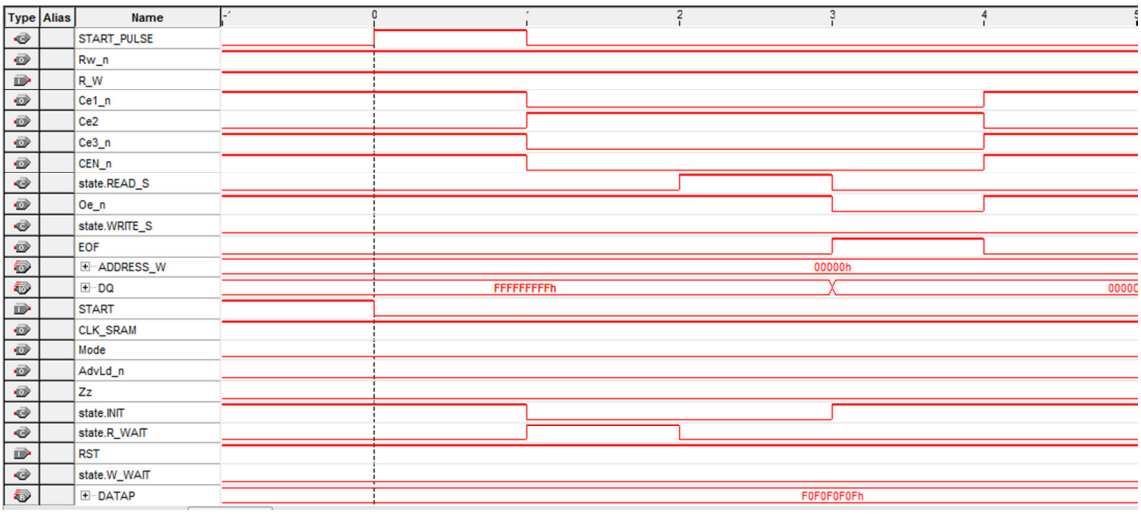



Figura 5-2. Señales de prueba de la memoria SRAM

En cuanto al módulo de conversión del espacio de color RGB al espacio de color arrojó resultados con un índice de error de 0.0196% en la banda de color L* respecto al valor real, de 0.044% en la banda a* y de 0.0379% en la banda de color b* para valores de entrada de RGB (255,255,255) como se puede observar

en la siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, es importante resaltar que se usó una interpretación de punto fijo de 10.22.

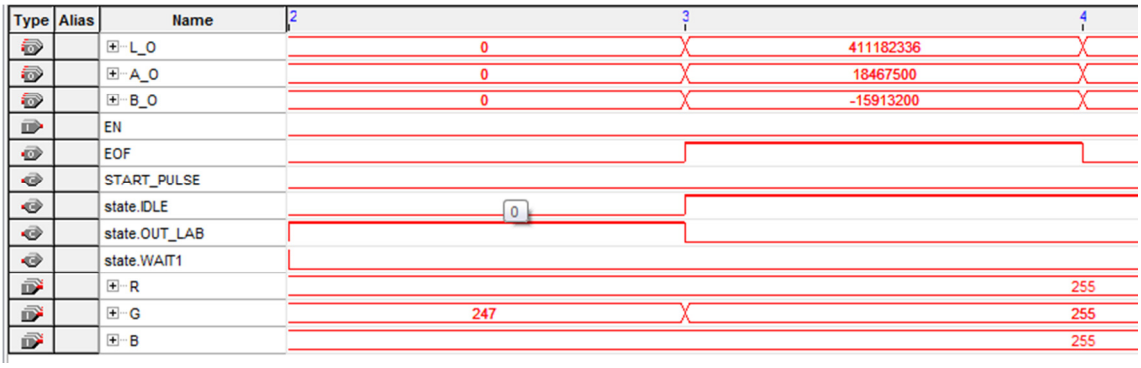



Figura 5-3. Proceso de conversión de RGB a CIELAB

Cuando se probó el proceso de recolección de pixeles que arroja el sensor CMOS se obtuvieron las señales mostradas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en donde se aprecia que mientras las señales de sincronización VD y HD provenientes del sensor CMOS permanezcan en un valor alto, lo que significa un frame valido, el contador C_PIXEL se incrementa en una unidad cada cuatro ciclos de reloj del CMOS, esto debido a que las localidades de la memoria SRAM son de 36 bits cada una, así de esta forma se optimizaron los recursos, la señal FOUR_PIXEL fue incrementándose de uno en uno indicando cuando el contador había llegado a si máximo lo que significaba que era necesario guardar en SRAM los nuevos pixeles recolectados.

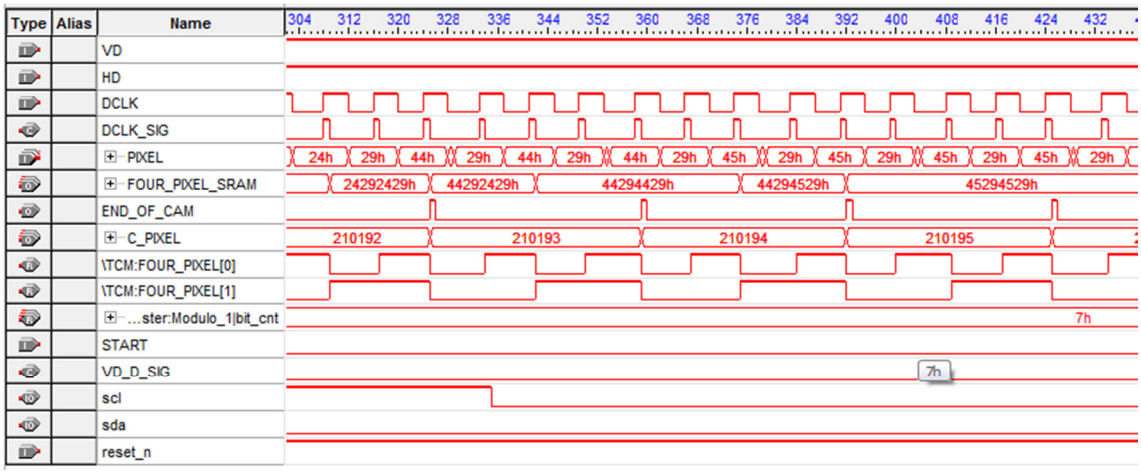


Figura 5-4. Señales del proceso de recolección de pixeles

En cuanto a los recursos utilizados por el diseño se muestran en la siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en donde se puede apreciar que lo que más se utilizó fueron los pines con un 89% que representa la utilización de 115 de los 129 disponibles, los divisores de frecuencias con dos de cuatro representando un 50%, mientras que los bits de memoria y los multiplicadores con un 31% del total disponible

Tabla 5-1. Recursos utilizados

| Recurso | Utilizado | Porcentaje |
|---|---|---|
| **Elementos lógicos** | 2019 | 5% |
| **Funciones combinacionales** | 1621 | 4% |
| **Registros dedicados** | 936 | 2% |
| **Pines** | 115 | 89% |
| **Bits de memoria** | 356352 | 31% |
| **Multiplicadores embebidos de 9 bits** | 78 | 31% |
| **PLLs** | 2 | 50% |

## 5.2 Pruebas de laboratorio

### 5.2.1 Fase preparativa: extracción

- Elección del co-solvente de extracción: El uso de hexanos como co-solvente resultó mejor, ya que se logró obtener el mayor contenido de pigmento en un menor tiempo de extracción.

Figura 5-5. Muestra de cáscara de tomate bola estadío 6 después del secado y molienda, antes de la extracción.

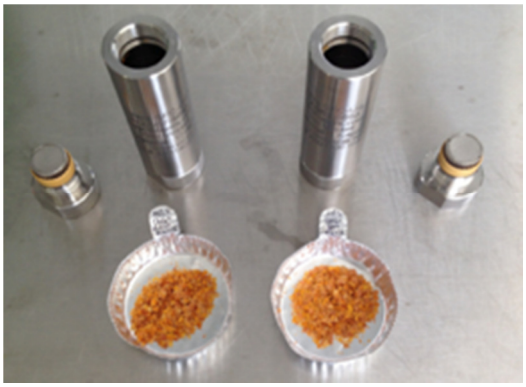


Figura 5-6. Dos muestras sometidas al método #2 después del primer ciclo de extracción, la muestra de la izquierda se trabajó con la “mezcla de fish”, mientras que la del lado derecho se manejó con hexanos

Figura 5-7. A la derecha se puede observar la muestra después de 6 ciclos de extracción con hexanos, la muestra de la izquierda se obtuvo después 7 ciclos con la “mezcla de Fish”

- Tiempo, flujo, presión y temperatura de extracción: En cuanto a dichos parámetros se observaron mejores resultados para el método 1, en las figuras que se muestran a continuación se puede percibir a simple vista.

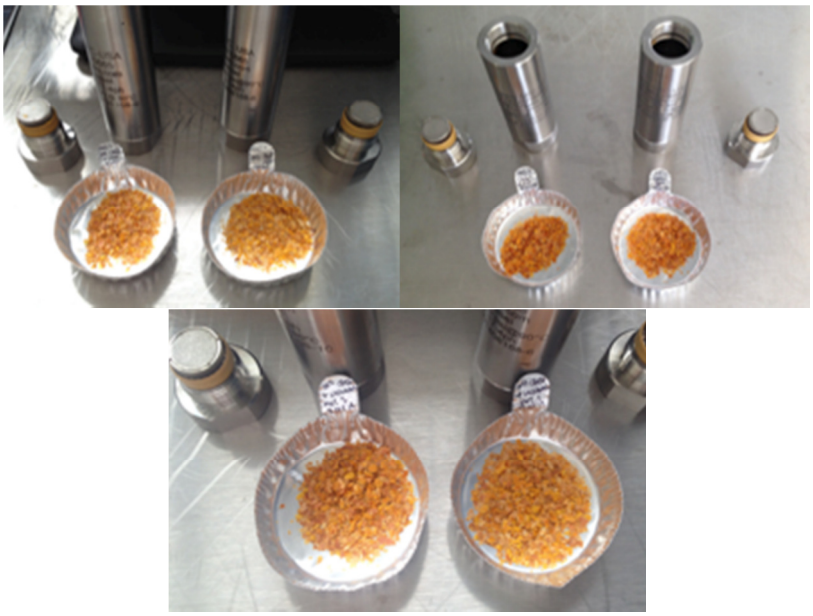


Figura 5-8. Muestras sometidas al método #1 Izq. Mezcla de Fish Der. Hexanos (Arriba izquierda), Muestras sometidas al método #2 Izq. Mezcla de Fish Der. Hexanos (Arriba derecha) y Muestras trabajadas con hexanos como co-solvente Izq. Método 2 Der. Método #1 (abajo).

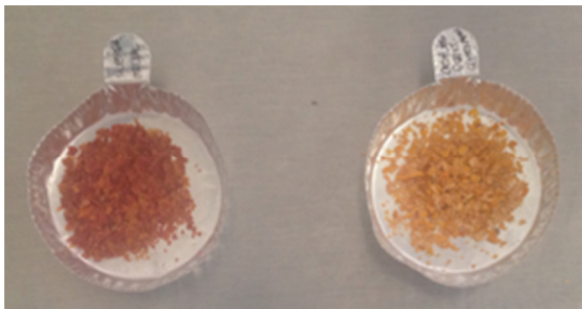


Figura 5-9. La imagen muestra una comparación entre la matriz antes de la extracción de carotenoides (Izq.), y (Der.) la misma muestra sometida al método más efectivo de extracción (método #2 co-solvente: Hexanos).

### 5.2.2 Fase analítica: Identificación y cuantificación

#### 5.2.2.1 Desarrollo del método cromatográfico

- Selección de la columna: La columna ACQUITY® UPLC HSS (High Strength Silica) C18 Column, 100Å, 1.8 µm, 3 mm X 30 mm resultó más adecuada para el análisis ya que se obtuvo una mejor separación de los picos en menos tiempo.
- Establecimiento del flujo, presión y temperatura de extracción: el método que resultó en una mejor separación en un menor tiempo se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5-2. Método de cromatografía más adecuado para la separación e identificación de carotenoides por medio de ultracromatografía de convergencia

| Gradiente de CO2 | Gradiente de solvente | Presión (psi) | Temperatura de la columna (ºC) | Flujo (ml/min) | Volumen de inyección (µl) | Tiempo de corrida (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **85%** | 15% | 2000 | 35(±5) | 1 | 5 | 3 |

A partir de las diferentes inyecciones de estándar realizadas, se pudieron obtener los espectros de las moléculas de interés: licopeno y β-caroteno, mismos que se guardaron en la biblioteca del equipo. Como se logra observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, el pico más alto de absorción del licopeno se localiza a los 451.7 nm, y en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** podemos observar el del β-caroteno con el pico más alto en 433 nm razón por la que los cromatogramas fueron analizados con el software del equipo (Empower 3) en 2D a 452 nm con una resolución de 2.4 nm, debido a que a esa λ se alcanzaron a diferenciar ambos picos.

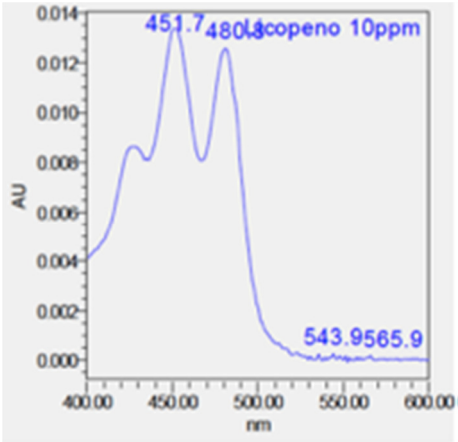



Figura 5-10. Espectro de absorción del carotenoide licopeno

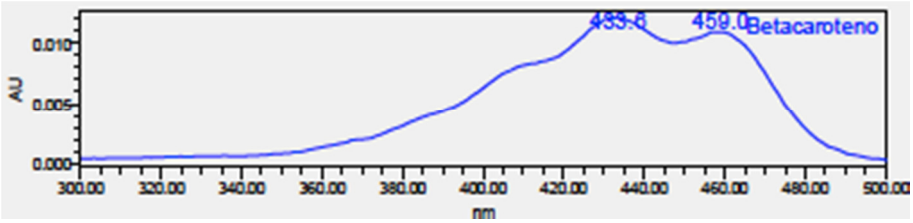



Figura 5-11. Espectro del β-caroteno

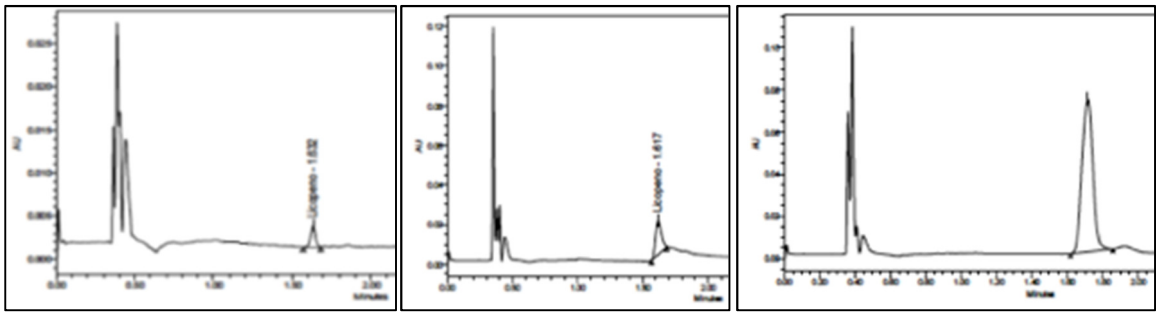


Figura 5-12. Cromatogramas de las inyecciones de estándar de licopeno a diferentes concentraciones: 10 (izquierda), 20 (centro) y 40 ppm (derecha)

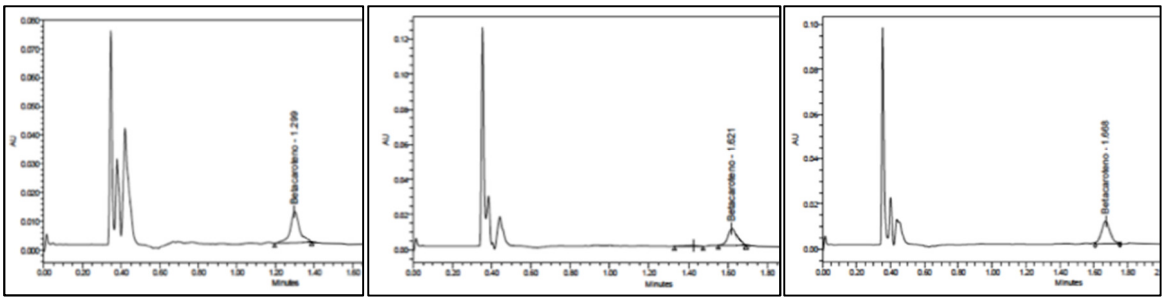
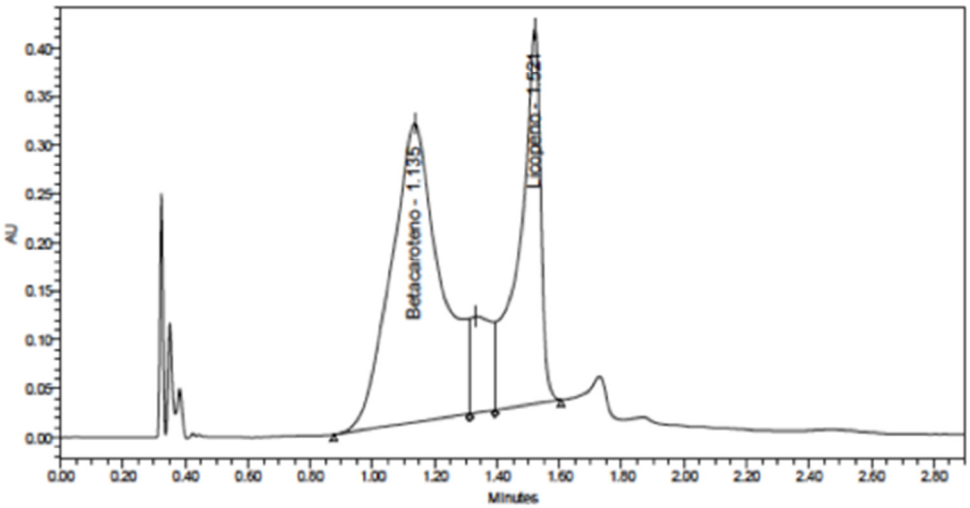


Figura 5-13. Cromatogramas de las inyecciones de estándar de β-caroteno a diferentes concentraciones: 10 (izquierda), 20 (centro) y 40 ppm (derecha)

Una vez identificados los picos en los cromatogramas, así como su espectro y tiempo de retención aproximado, se obtuvieron los siguientes cromatogramas a partir de la inyección del extracto de cáscara de tomate bola, estadío 6, los datos fueron procesados a 452 nm e integrados por “Aphex track” una integración automática que ofrece el software del equipo. El análisis se realizó por triplicado.

SAMPLE INFORMATION

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sample Name: | M4 CBE6+Hex 1aExt. | Acquired By: | System |
| Sample Type: | Unknown | Sample Set Name: | 1er Extracto hexanos |
| Vial: | 1:D,2 | Acq. Method Set: | Licopeno HSS C18 Grad CO2 |
| Injection #: | 1 | Processing Method | MetodoALe |
| Injection Volume: | 5.00 ul | Channel Name: | PDA Ch1 452nm@2.4nm |
| Run Time: | 4.0 Minutes | Proc. Chnl. Descr.: | PDA Ch1 452nm@2.4nm |
| Date Acquired: | 02/10/2014 02:40:12 PM CDT | | |
| Date Processed: | 16/01/2015 03:46:32 PM CST | | |

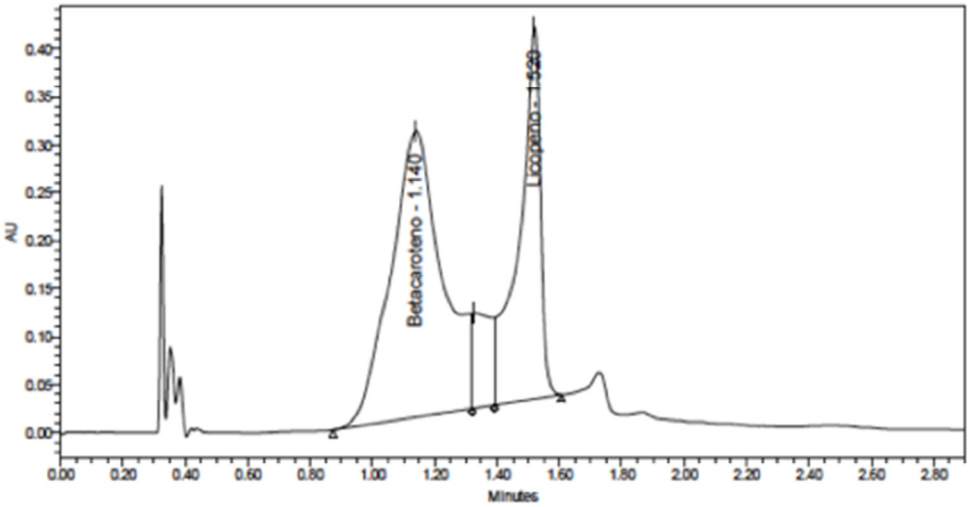



| | Peak Name | RT | Area | % Area | Height |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Betacaroteno | 1.135 | 3332903 | 59.25 | 307110 |
| 2 | | 1.329 | 467193 | 8.30 | 98363 |
| 3 | Licopeno | 1.521 | 1825367 | 32.45 | 385286 |

Figura 5-14. Primera inyección de la muestra de cáscara de tomate bola correspondiente al estadío 6, en el cromatograma se pueden identificar 2 picos el primero corresponde al β-caroteno con un tiempo de retención (TR) de 1.135, y el segundo al licopeno con un TR de retención (TR) de 1.135 y el segundo del licopeno con un TR de 1.521 min.

SAMPLE INFORMATION

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sample Name: | M4 CBE6+Hex 1aExt. | Acquired By: | System |
| Sample Type: | Unknown | Sample Set Name: | 1er Extracto hexanos |
| Vial: | 1:D,2 | Acq. Method Set: | Licopeno HSS C18 Grad CO2 |
| Injection #: | 2 | Processing Method | MetodoALe |
| Injection Volume: | 5.00 ul | Channel Name: | PDA Ch1 452nm@2.4nm |
| Run Time: | 4.0 Minutes | Proc. Chnl. Descr.: | PDA Ch1 452nm@2.4nm |
| Date Acquired: | 02/10/2014 02:45:07 PM CDT | | |
| Date Processed: | 16/01/2015 03:48:29 PM CST | | |

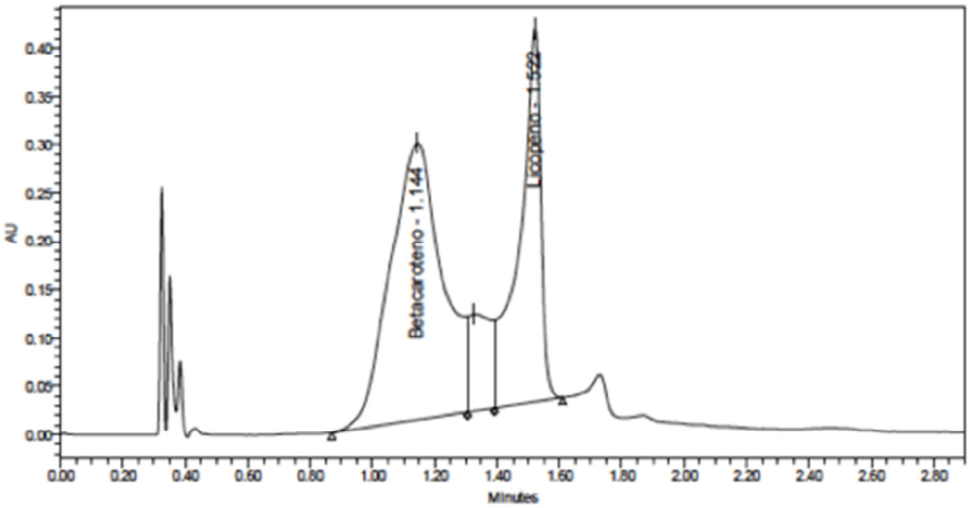



| | Peak Name | RT | Area | % Area | Height |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Betacaroteno | 1.140 | 3412765 | 60.22 | 298711 |
| 2 | | 1.323 | 408911 | 7.22 | 98759 |
| 3 | Licopeno | 1.520 | 1845519 | 32.56 | 387107 |

Figura 5-15. Segunda inyección de muestra, al minuto 1.140 se observa el betacaroteno y luego aparece el licopeno al minuto 1.520 de la corrida

SAMPLE INFORMATION

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sample Name: | M4 CBE6+Hex 1aExt. | Acquired By: | System |
| Sample Type: | Unknown | Sample Set Name: | 1er Extracto hexanos |
| Vial: | 1:D,2 | Acq. Method Set: | Licopeno HSS C18 Grad CO2 |
| Injection #: | 3 | Processing Method | MetodoALe |
| Injection Volume: | 5.00 ul | Channel Name: | PDA Ch1 452nm@2.4nm |
| Run Time: | 4.0 Minutes | Proc. Chnl. Descr.: | PDA Ch1 452nm@2.4nm |
| Date Acquired: | 02/10/2014 02:50:02 PM CDT | | |
| Date Processed: | 16/01/2015 03:49:43 PM CST | | |




| | Peak Name | RT | Area | % Area | Height |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Betacaroteno | 1.144 | 3306861 | 58.44 | 286117 |
| 2 | | 1.326 | 499875 | 8.83 | 99395 |
| 3 | Licopeno | 1.522 | 1851609 | 32.72 | 385859 |

Figura 5-16. Inyección número 3, el TR del β-caroteno es de 1.144 mientras que el del licopeno corresponde a 1.522 min

Tanto el método de extracción como el de separación e identificación propuestos fueron exitosos debido a que se obtuvieron las moléculas deseadas (licopeno y β-caroteno) y se lograron visualizar en los cromatogramas con una buena repetitividad, ya que la diferencia en los tiempos de retención de las moléculas es mínima entre cada repetición.

## 5.3 Modelo estadístico.

A partir de experimentos realizados en laboratorio, en donde se obtuvo valores de licopeno, β-caroteno, y sus respectivos valores de L*, a* y b*, como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se realizó una regresión polinómica. Es importante mencionar que de acuerdo al espacio de color CIELAB el color rojo se expresa con un nivel positivo en la banda a* y con uno negativo para el color verde, planteamientos que concuerdan con los valores de la siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, ya que para un grado de madurez nivel seis, el de mayor maduración y mayor pigmentación, corresponde a un nivel mayor en a* y para el grado uno, el de menor maduración y menor pigmentación, un valor negativo.

Tabla 5-3. Valores de laboratorio

| Promedio Banda a* | Contenido De Licopeno (mg/Kg) | Grado De Madurez |
|---|---|---|
| **33.2342** | 151.684 | 6 |
| **21.963896** | 135.469 | 5 |
| **6.128868** | 38.792 | 4 |
| **2.807998** | 26.52 | 3 |
| **-2.126384** | 17.888 | 2 |
| **-8.076394** | 9.412 | 1 |

La ecuación ( (26) representa una forma sencilla de obtener la concentración de licopeno a partir del valor numérico de la banda a* del espacio de color CIELAB.

$$Licopeno\ \left(\frac{mg}{kg}\right) = 6.4837668x10^{-6}x^5 - 0.00042438354x^4 + 0.0015539835x^3 + 0.24177883x^2 + 2.0622763x + 16.334527 \quad \textbf{(26)}$$

Dónde:

x=promedio de la banda a*.

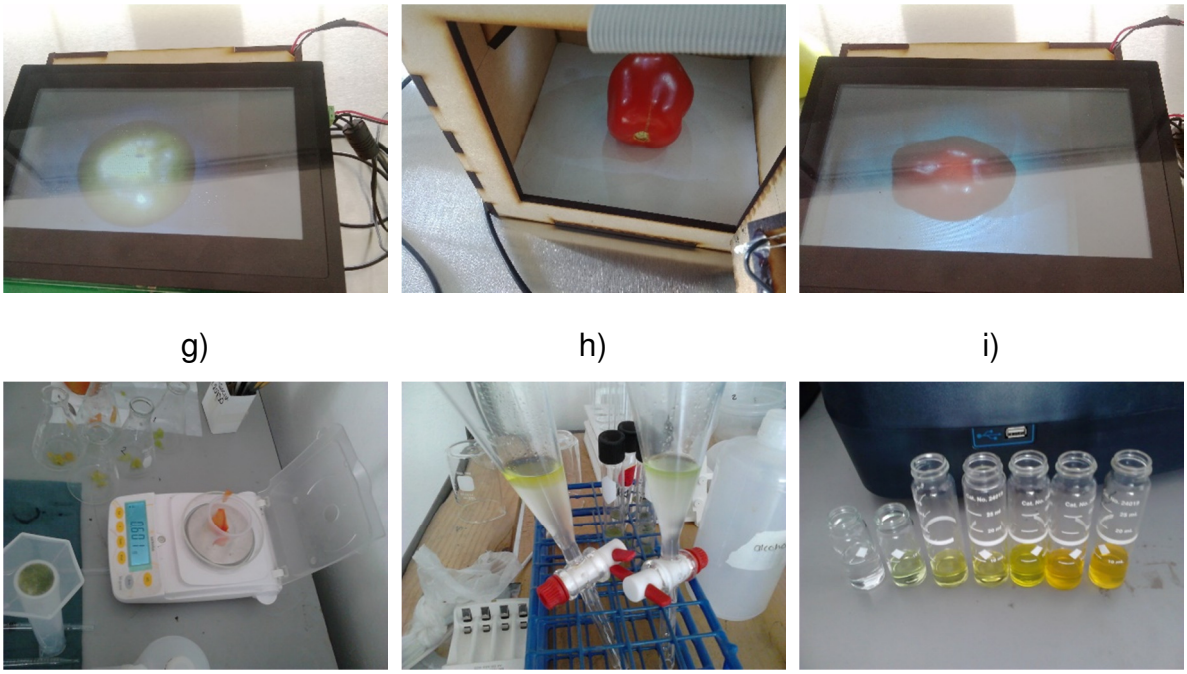
El índice de correlación de esta aproximación es $r^2 = 0.996$

## 5.4 Validación del sistema.

El sistema fue puesto a prueba en el laboratorio del campus Amazcala de la facultad de Ingeniería, se hizo la descripción de hardware de la ecuación ( (26) y se obtuvieron los resultados de concentración de licopeno en comparación con los equipos de laboratorio, en la siguiente figura**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa el sistema en funcionamiento en los incisos a) al f) en donde se muestra el tomate y la foto capturada del mismo mientras que los g) al i) pruebas de laboratorio por la técnica de Fish.

a) b) c)

d) e) f)



g) h) i)

Figura 5-17. Pruebas de laboratorio.

La siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra los resultados obtenidos por el sistema en donde se puede observar que los valores de mayor pigmentación corresponden a los niveles de mayor concentración de licopeno así como de un índice de valores más positivos en cuanto a la banda a* y viceversa para grados de madurez inferiores

Tabla 5-4. Resultados de validación.

| Grado De Madurez | Banda a* | Banda b* | Licopeno (mg/Kg) | Promedio Banda a* | Promedio Banda b* | Promedio Licopeno (mg/Kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **6** | 38.11246 | 28.75853 | 158.13080 | 34.21747 | 23.71005 | 154.87749 |
| | 31.60363 | 21.58865 | 153.10623 | | | |
| | 32.40013 | 22.2966 | 153.64832 | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 34.01129 | 23.66232 | 154.50530 | | | |
| | 34.95983 | 22.24416 | 154.99678 | | | |
| **5** | 31.49848 | 25.80462 | 153.02534 | 27.08408 | 23.13880 | 145.51696 |
| | 27.12012 | 23.3535 | 146.63715 | | | |
| | 26.01808 | 23.28133 | 143.86191 | | | |
| | 25.68673 | 21.74339 | 142.92429 | | | |
| | 25.09698 | 21.51117 | 141.13612 | | | |
| **4** | 8.22043 | 19.39841 | 48.79434 | 8.42835 | 20.73615 | 50.00308 |
| | 7.93291 | 20.52632 | 47.20857 | | | |
| | 9.37061 | 21.63813 | 55.36448 | | | |
| | 8.81843 | 20.53503 | 52.16746 | | | |
| | 7.79938 | 21.58288 | 46.48052 | | | |
| **3** | 3.38159 | 21.50985 | 26.08054 | 3.24897 | 23.37045 | 25.64357 |
| | 3.50805 | 23.75319 | 26.55079 | | | |
| | 2.98747 | 24.20184 | 24.66256 | | | |
| | 2.52247 | 24.07398 | 23.08338 | | | |
| | 3.84529 | 23.3134 | 27.84060 | | | |
| **1** | -8.1518 | 19.18897 | 12.64071 | -8.04754 | 19.18843 | 12.58853 |
| | -7.78948 | 19.19459 | 12.45783 | | | |
| | -7.55163 | 18.9825 | 12.34034 | | | |
| | -8.19479 | 19.13392 | 12.66250 | | | |
| | -8.55 | 19.44217 | 12.84128 | | | |

La siguiente tabla presenta los datos obtenidos por la técnica de Fish para las mismas muestras de tomates.

Tabla 5-5. Resultados espectrofotómetro.

| Grado De Madurez | Absorbancia | Licopeno (mg/Kg) |
|---|---|---|
| **6** | 3.025 | 157.3 |
| **5** | 2.74 | 142.48 |
| **4** | 0.814 | 42.328 |
| **3** | 0.495 | 25.74 |
| **1** | 0.223 | 11.596 |

## 5.5 Análisis de varianza ANOVA.

Como se observa en la siguiente tabla**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** el análisis de varianza ANOVA arroja un factor de confianza de 0.9670, lo cual nos quiere decir que los datos obtenidos con el sistema embebido y los arrojados por el patrón de medida concuerdan en un 96.7% entre ellos; este resultado se traduce en que el sistema desarrollado es confiable en sus medidas.

Tabla 5-6. Análisis de varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA

| *Origen de las variaciones* | *Suma de cuadrados* | *Grados de libertad* | *Promedio de los cuadrados* | *F* | *Probabilidad* | *Valor crítico para F* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 8.437585365 | 1 | 8.437585365 | 0.00182 | 0.967026149 | 5.317655063 |
| Dentro de los grupos | 37108.96065 | 8 | 4638.620081 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 37117.39823 | 9 | | | | |

## 5.6 Conclusiones.

Con base a los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que el sistema cumplió con los objetivos de la investigación, el análisis de varianza anova arrojó un índice de correlación de 96.7% con lo que la hipótesis es correcta, es decir, se superó el 85% de exactitud planteado, según Candelas et al.(2006) En variedades más comunes de jitomate rojo la concentración de licopeno va de 1.16 mg/Kg para la etapa verde, 14.45 mg/Kg para la etapa amarilla, 34.06 mg/Kg para la etapa naranja, 49.5 mg/Kg para la etapa ligeramente rojo, 119.96 mg/Kg para la etapa rojo intenso suave y por último de 122.2 mg/Kg para la etapa de maduración rojo intenso firme, lo cual corresponde a la tendencia de datos mostrados en este trabajo.

Por otro lado sistema será de gran utilidad a pequeños y medianos productores principalmente, esto debido a que es un sistema que arroja resultados muy aproximados a los análisis de laboratorio con la ventaja de que el costo está por debajo de estos últimos y el tiempo de análisis es mucho ms pequeño (30 muestras por segundo).

# 6 BIBLIOGRAFÍA


Al-Mallahi, A., T. Kataoka, H. Okamoto, and Y. Shibata. 2010. An image processing algorithm for detecting in-line potato tubers without singulation. Comput. Electron. Agric. 70:239–244.

Altera Corporation. 2007. Cyclone III low-cost FPGAs Unlimited possibilities. :8.

Altera Corporation. 2012a. Cyclone III Device Handbook Volume 1. 1.

Altera Corporation. 2012b. Cyclone III Device Handbook Volume 2. 2.

Altera Corporation. 2013. I / O Pin Count , Package Offering and Vertical Migration.

Altera Corporation. 2014. Serial Configuration ( EPCS ) Devices. :1–40.

Biswas, a. K., J. Sahoo, and M. K. Chatli. 2011. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of ??-carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. LWT - Food Sci. Technol. 44:1809–1813. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.017

Candelas, M., M. Alanis, and F. Olague. 2006. Lycopene measurement and other carotenoids in tomato and tomato powder. Rev. Mex. Agronegocios X:2–12.

CYPRESS. 2012. CY7C1370D Datashhet.

Darvin, M., A. Patzelt, S. Gehse, S. Schanzer, C. Benderoth, W. Sterry, and J. Lademann. 2008. Cutaneous concentration of lycopene correlates significantly with the roughness of the skin. Eur. J. Pharm. Biopharm. 69:943–7. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641108000398

Fernández-Ruiz, V., J. S. Torrecilla, M. Cámara, M. C. Sánchez Mata, and C. Shoemaker. 2010. Radial basis network analysis of color parameters to estimate lycopene content on tomato fruits. Talanta 83:9–13.

Festy, D. 2007. Antioxidantes: Guía Práctica. 1st ed. Robinbook, España.

Fish, W. W., P. Perkins-Veazie, and J. K. Collins. 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. J. Food Compos. Anal. 15:309–317. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157502910690

García-Trejo, J. F. 2014. Extracción de carotenoides en frutos por medio UPC2. Querétaro, México.

Gastélum-Barrios, A., R. López-Bórquez, E. Rico-García, M. Toledano-Ayala, and G. Soto-Zarazúa. 2011. Tomato quality evaluation with image processing : A review. African J. Agric. Res. 6:3333–3339.

Gastélum-Barrios, A. 2012. Sistema Basado en Análisis de Imágenes Implementado en FPGA para Estimar el Grado de Madurez y Contenido de Licopeno en Tomate Rojo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Gómez, A. H., A. G. Pereira, and J. Wang. 2007. Using electronic nose technique to monitoring tomato maturity states during shelf live Uso de la técnica de la nariz electrónica para monitorear la madurez del tomate durante su vida en estantería. 16:24–30.

Gultekin, G. K., and A. Saranli. 2013. An FPGA based high performance optical flow hardware design for computer vision applications. Microprocess. Microsyst. 37:270–286. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.micpro.2013.01.001

Hart, D. J., and K. J. Scott. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. Food Chem. 54:101–111. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030881469592669B

HunterLab. 2008. CIE L*a*b* Color Scale. Applications Note.

Ibarra-Manzano, M.-A., and D.-L. Almanza-Ojeda. 2012. An FPGA Implementation for Image Interpretation Based on Adaptive Boosting Algorithm in the Real-Time Systems. Procedia Technol. 3:187–195. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.protcy.2012.03.020

Kalomiros, J. a., and J. Lygouras. 2008. Design and evaluation of a hardware/software FPGA-based system for fast image processing. Microprocess. Microsyst. 32:95–106.

Khachik, F., G. R. Beecher, and N. F. Whittaker. 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem 34:603–616.

Krill, B., a. Ahmad, a. Amira, and H. Rabah. 2010. An efficient FPGA-based dynamic partial reconfiguration design flow and environment for image and signal processing IP cores. Signal Process. Image Commun. 25:377–387. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.image.2010.04.005

Licón-Gutiérrez, J. A., O. A. Zamudio-Ramírez, J. C. Tapia-Cisneros, and D. A. Licón-Gutiérrez. 2012. Design of electronic cards for FPGA devices.

Liming, X., and Z. Yanchao. 2010. Automated strawberry grading system based on image processing. Comput. Electron. Agric. 71:S32–S39. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816990900204X

Mercado-Luna, A., E. Rico-García, A. L.-H. G. Soto-Zarazúa, R. O.-V. R. Guevara-González, G. Herrera-Ruiz, and I. Torres-Pacheco1. 2010. Nitrogen determination on tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). African J. Agric. Res. 9:5326–5332.

Min, M., W. S. Lee, T. F. Burks, J. D. Jordan, A. W. Schumann, J. K. Schueller, and H. Xie. 2008. Design of a hyperspectral nitrogen sensing system for orange leaves. Comput. Electron. Agric. 63:215–226.

Nesreen, M., I. Hamman, S. Mohd, and M. Sulaiman. 2010. A phase frequency detector. 102:18.

Piñeiro, Z., C. García, and M. Palma. 2005. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. Puerto Real, España.

Qin, J., K. Chao, and M. S. Kim. 2012. Nondestructive evaluation of internal maturity of tomatoes using spatially offset Raman spectroscopy. Postharvest Biol. Technol. 71:21–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.04.008

Ramos-Arregún, C. A., J. C. M. Morales, J. M. Ramos-Arregu'n, J. C. Pedraza-Ortega, S. Tovar-Arriaga, M. A. A. Fernandez, and J. D. J. Rangel-Magdaleno. 2012. FPGA Open Architecture Design for a VGA Driver. Procedia Technol. 3:324–333.

Rodriguez-Amaya, D. B. 2001. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods.

Rosati, C., R. Aquilani, S. Dharmapuri, P. Pallara, C. Marusic, R. Tavazza, F. Bouvier, B. Camara, and G. Giuliano. 2000. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. Plant J. 24:413–419.

Sowmya, B., and B. Sheela Rani. 2011. Colour image segmentation using fuzzy clustering techniques and competitive neural network. Appl. Soft Comput. J. 11:3170–3178. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.asoc.2010.12.019

Stinco, C. M., F. J. Rodríguez-Pulido, M. L. Escudero-Gilete, B. Gordillo, I. M. Vicario, and A. J. Meléndez-Martínez. 2013. Lycopene isomers in fresh and processed tomato products: Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. Food Res. Int. 50:111–120. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.011

Tavares, C. A., and D. B. Rodriguez-Amaya. 1994. Carotenoid Composition of Brazilian Tomatoes and Tomato Products. LWT - Food Sci. Technol. 27:219–224. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643884710450

Terasic. 2011. Multek 9928DPTL070H-01.

TOSHIBA. 2008. TCM8230MD Datasheet.

Vazquez-Cruz, M. a., S. N. Jimenez-Garcia, R. Luna-Rubio, L. M. Contreras-Medina, E. Vazquez-Barrios, E. Mercado-Silva, I. Torres-Pacheco, and R. G. Guevara-Gonzalez. 2013. Application of neural networks to estimate carotenoid content during ripening in tomato fruits (Solanum lycopersicum). Sci. Hortic. (Amsterdam). 162:165–171. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.023

Velioĝlu, H. M., S. H. Boyaci, and Ş. Kurultay. 2011. Determination of visual quality of tomato paste using computerized inspection system and artificial neural networks. Comput. Electron. Agric. 77:147–154.

Walji, H. 2007. Vitaminas y Minerales. 3rd ed. Edaf, Madrid, España.

Waters®. 2015. ACQUITY-UPLC-PDA-Detector. Available from: http://www.xn--waters-nja.com/Waters®/en_US/ACQUITY-UPLC-PDA-Detector/nav.htm?cid=514225

Yang, H.-Y., X.-Y. Wang, Q.-Y. Wang, and X.-J. Zhang. 2012. LS-SVM based image segmentation using color and texture information. J. Vis. Commun. Image Represent. 23:1095–1112. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jvcir.2012.07.007

Yusuf, M., R. a. Khan, M. Khan, and B. Ahmed. 2012. Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted ??-carotene nanoparticles. Int. J. Nanomedicine 7:4311–4322.

Zamudio-Ramírez, O. A. 2013. Sistema Embebido Aplicando Procesamiento de Imágenes para Determinar la Madurez y Cantidad de Licopeno en Jitomate Rojo. Universidad Autonoma de Querétaro.