MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

ESTUDIO DEL GRADO DE MADUREZ Y/O CONSERVACIÓN DE TOMATES EMPLEANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS MOLECULARES.

Laura Jurado Capel

Julio 2012, Oviedo

ROSANA BADIA LAIÑO, Profesora titular de Química Física y Analítica, adscrita al Departamento Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “ESTUDIO DEL GRADO DE MADUREZ Y/O CONSERVACIÓN DE TOMATES EMPLEANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS MOLECULARES” ha sido realizado por la licenciada LAURA JURADO CAPEL en el Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo, bajo su tutoría, constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autoriza.

Oviedo, a 17 de julio de 2012

Fdo: Rosana Badía Laiño

Agradecimientos

Después de varios meses de constancia y tenacidad, este proyecto llega a su fin y con él, el Máster Universitario en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas que he cursado durante el curso 2011/2012.

En primer lugar, quisiera mostrar mi más profundo agradecimiento a mi tutora del TFM, Rosana Badía Laíño, por haberse involucrado tanto en el proyecto, por haberme prestado su ayuda siempre que lo he necesitado, por haberme aconsejado y por animarme en los momentos más difíciles en los que la presión por ciertas circunstancias en particular casi pudo conmigo, ya que me gusta tenerlo todo controlado de antemano.

Tampoco quisiera olvidarme de otro pilar importante en este trabajo, Alfonso Fernández González, doctor en química y técnico de la Unidad de Espectroscopia molecular y XPS del edificio Severo Ochoa de Servicios Científico Técnicos (SCTs), por echarme una mano y poner a disposición cada uno de los equipos disponibles.

No son menos importantes, todos y cada uno de los profesores y compañeros del máster que han hecho más llevadero el transcurso de este año, además de mis compañeros del laboratorio de investigación del Grupo Analítico de Reconocimiento Molecular (RECOMOL).

A modo personal quisiera expresar mi infinito agradecimiento a todos los familiares y amigos que siempre me han apoyado estos años tanto en la Licenciatura como en el Máster.

Laura Jurado Capel

Índice

OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los frutos y su maduración

1.2. El tomate

1.2.1 Morfología del fruto

1.2.2 Composición nutricional

1.3 Calidad y análisis del tomate

1.4 Espectroscopía molecular aplicada al análisis de tomates

1.4.1 Visible-Ultravioleta

1.4.2 Infrarrojo

1.4.3 Espectroscopía Raman

1.4.4 Fluorescencia molecular

1.4.5 Técnicas de imagen

1.5. Análisis multivariante aplicada a la espectroscopía molecular

1.5.1 Análisis de componentes principales

1.5.2 Análisis clasificatorio

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y reactivos

2.1.1 Muestras y Reactivos

2.1.2 Otros

2.2. Instrumentación

2.2.1 Espectrómetro VIS-UV

2.2.2 Espectrómetro FTIR-ATR

2.2.3 Espectrofotómetro DE FLUORESCENCIA

2.2.4 Espectrómetro FT(NIR)-Raman

2.3 Preparación de muestras

2.3.1 Preparación de pieles de tomate
2.3.2 Preparación de extracto de tomate

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. VIS-UV

3.1.1 Caracterización espectroscópica de patrones: analitos modelo
3.1.2 Caracterización espectroscópica de los extractos metanólicos

3.2. Fluorescencia molecular

3.2.1 Caracterización espectroscópica de patrones: analitos modelo
3.2.1.1 FLUORESCENCIA “CONVENCIONAL”
3.2.1.2 FLUORESCENCIA SINCRÓNICA
3.2.2 Caracterización espectroscópica de los extractos metanólicos

3.3. FTIR-ATR

3.3.1 Caracterización espectroscópica de patrones: analitos modelo
3.3.2 Caracterización espectroscópica de pieles de tomate

3.4. Espectroscopía Raman

3.5. Estudio quimiométrico

3.5.1. Fluorescencia sincrónica derivada
3.5.2. Algoritmos de clasificación y reconocimiento de patrones.

4. CONCLUSIONES

5. BIBLIOGRAFÍA

OBJETIVOS

En la actualidad existe en el ámbito agroalimentario una demanda creciente de metodologías de clasificación que requieran la menor manipulación posible de la muestra. Esta demanda es particularmente importante a nivel de materias primas o de productos agrícolas como consecuencia de que el nivel de maduración de frutos y hortalizas condiciona la calidad de los productos finales manufacturados, como por ejemplo vinos, conservas, mermeladas, etc. o la adquisición directa por parte del consumidor que cada día requiere la mejor calidad de estos productos en su mesa.

En este sentido en el presente trabajo de investigación se han planteado los siguientes objetivos:

- Emplear técnicas de espectroscopía molecular para la clasificación de tomates en función de su madurez. Estas técnicas han sido seleccionadas ya que requieren una escasa manipulación de la muestra o en algunos casos permiten el análisis directo sobre la piel del fruto.

- Estudiar la posibilidad de clasificar distintas variedades de tomates que tengan un mismo grado de madurez, importante en la detección de fraudes en la certificación de la Denominación de Origen.

- Familiarizarse con las herramientas quimiométricas de clasificación y reconocimiento de patrones, y aplicarlas a la problemática planteada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los frutos y su maduración

Los frutos y hortalizas son uno de los grupos de alimentos básicos de la dieta Mediterránea. Dada la gran demanda de frutos y hortalizas, el propio consumidor establece unas exigencias de calidad de manera que presenten unas características organolépticas determinadas en cuanto aroma, sabor, aspecto y madurez. La madurez óptima del fruto es también uno de los objetivos perseguidos por los productores ya que asegura la calidad de sus productos hortícolas y les permite satisfacer las exigencias establecidas.
La buena calidad del producto se obtiene cuando la cosecha tiene lugar en un estado de madurez adecuado. Los frutos cosechados demasiado pronto pueden permanecer verdes durante más tiempo, maduran de forma irregular y por tanto, su calidad es baja.

En los frutos se distinguen dos tipos de madurez: la fisiológica y la hortícola [1]. La madurez fisiológica ("maturation") suele iniciarse antes de que termine el crecimiento celular y finaliza en el momento en que las semillas han alcanzado un estado de madurez que las haga viables mientras que la hortícola, también llamada madurez organoléptica ("ripening"), hace referencia al proceso por el cual las frutas adquieren las características sensoriales que las define como comestible y el fruto posee los pre-requisitos para su utilización por parte del consumidor para un fin particular.

De manera general, la maduración constituye todos aquellos procesos que tienen lugar desde que se inicia el cambio de color hasta que aparecen todas las características que hacen que estos productos sean aptos para su consumo, o alcancen su máxima madurez. Estos procesos bioquímicos actúan sobre los compuestos acumulados durante la etapa de crecimiento y determinan todos los cambios observados debido a su maduración. Generalmente tienen lugar reacciones de hidrólisis: de almidones en azúcares responsables del endulzamiento del fruto y de propectina en ácidos pécticos responsables de la firmeza. Los cambios de coloración de los frutos en este proceso son debidas fundamentalmente a la descomposición de clorofilas y la formación de carotenos y xantofilas. Todas estas transformaciones están influenciadas por actividades básicas como son la respiración y la transpiración, pérdida de agua en forma de vapor de agua siendo la respiración un proceso metabólico fundamental para la obtención de energía para las reacciones celulares ***(ver Figura 1)***

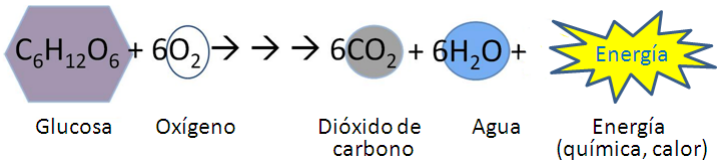

Figura 1: Esquema del proceso de respiración

Los frutos de acuerdo al ciclo respiratorio se pueden clasificar en climatéricos y no climatéricos ***(Tabla 1)*** La velocidad de respiración, medida a través del consumo de O_2 o la

producción de CO_2, puede ser un indicador de la senescencia de un fruto al igual que pudiera serlo también el etileno resultante de la misma [2,3] Actualmente es muy común regular la actividad metabólica de un fruto por aplicación exógena de 1-metilciclopropeno (1-MCP) u otros compuestos análogos del etileno. Su efecto es la remoción del etileno, lo que provoca una alteración química que induce la transcripción en ARNm para la formación de proteínas y enzimas responsables de la maduración [4, 5].

Tabla 1 : Ejemplos de frutos climatéricos y no climatéricos

CLIMATÉRICOS	NO CLIMATÉRICOS
Manzana	Cereza
Albaricoque	Uvas
Plátano	Naranja
Melocotón	Limón
Tomate	Pomelo
Nectarina	Aceituna
Kiwi	Piña
Aguacate	Pepino
Mango	Pimiento
Ciruela	Fresón

En los frutos climatéricos, inicialmente la velocidad respiratoria disminuye hasta alcanzar un mínimo para aumentar hasta un máximo y después volver a disminuir paulatinamente hasta llegar incluso a anularse (Figura 2a). Este proceso se inicia por medio de la producción autocatalítica de etileno. Estos frutos prosiguen su maduración tras su recolección.

En los frutos no climatéricos, la respiración es progresivamente decreciente (Figura 2b). Tras la cosecha no se producen cambios importantes en las frutas y no proporcionan las características óptimas para su consumo. A diferencia de la respiración climatérica, la producción de etileno es menor.

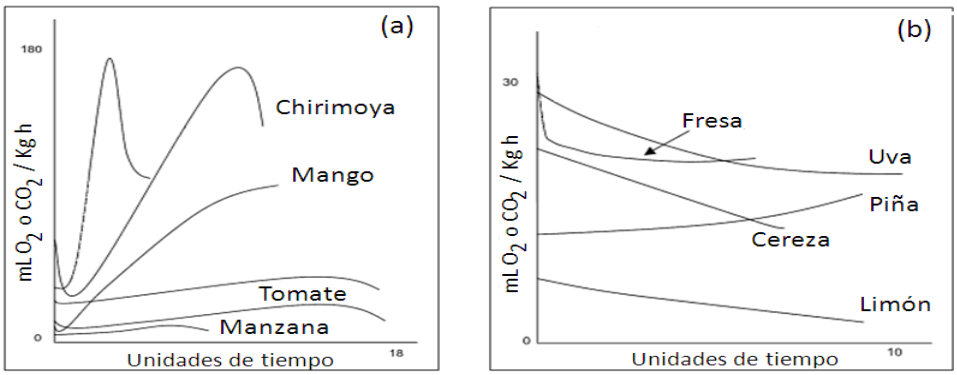

Figura 2: Patrones de respiración durante la maduración de frutas, a) climatéricas y b) no climatéricas.

Un ciclo climatérico presenta 3 etapas o fases:

1- *Preclimaterio o fruto inmaduro*: este proceso ocurre en la planta, se empieza a desarrollar el fruto y adquirir el tamaño deseado, la textura es fuerte, el producto insípido y con una gran variedad de ácidos orgánicos, almidones, enzimas y minerales.

2- *Climaterio o fruto maduro*: aumenta la respiración, se presentan cambios en el fruto, se desarrollan sabores y olores característicos. Esto se pone de manifiesto con la aparición de pigmentos como los carotenos y las antocianinas que dan coloraciones amarillas y rojas

y purpuras y rojas, respectivamente. La textura de la fruta cambia, se reblandece al disminuir la cantidad de ácidos orgánicos y, los almidones se hidrolizan (sacarosa, glucosa, fructosa) y se forman volátiles, lo que proporciona dulzor y aromas al fruto. En esta fase de desarrollo la fruta tiene propiedades que la hacen apta para el consumo (madurez hortícola).

3- *Posclimaterio*: envejecimiento o sobremaduración. Todos los compuestos empiezan a degradarse; los azúcares se descomponen en alcoholes y dióxido de carbono, los ácidos orgánicos se degradan y dan sabores desagradables. Los tejidos se vuelven más blandos favoreciendo su putrefacción.

Las frutas no deben cosecharse en el preclimaterio porque no se han desarrollado y no alcanzará el tamaño adecuado para una calidad óptima. Del mismo modo si la cosecha se realiza durante el postclimaterio el producto es fácilmente degradable.

1.2 El tomate

El tomate (Lycopersicum Esculentum Mill) junto con la patata son las hortalizas de mayor importancia económica y de mayor consumo ya sea en crudo o procesado, como zumos, salsas, purés, etc.

Es originario de la región Andina concretamente Perú y Ecuador, desde donde se extendió al resto de América. Aunque las formas ancestrales del tomate proceden de los Andes, se considera México como el centro de su domesticación. Con la llegada de los españoles se introdujo en Europa en el siglo XVI, aunque en un principio su aceptación como cultivo e inclusión en la cocina fue relativamente lenta utilizándose como planta ornamental. No fue hasta mediados del siglo XVII cuando se empezó a cultivar extendiéndose así por el sur y paulatinamente por el norte de Europa y de ahí a todo el mundo *(Figura 3)*.

Actualmente los principales productores de tomate son China, EEUU, India y Turquía. España se encuentra en el octavo puesto del ranking mundial, el segundo productor de Europa por detrás de Italia.

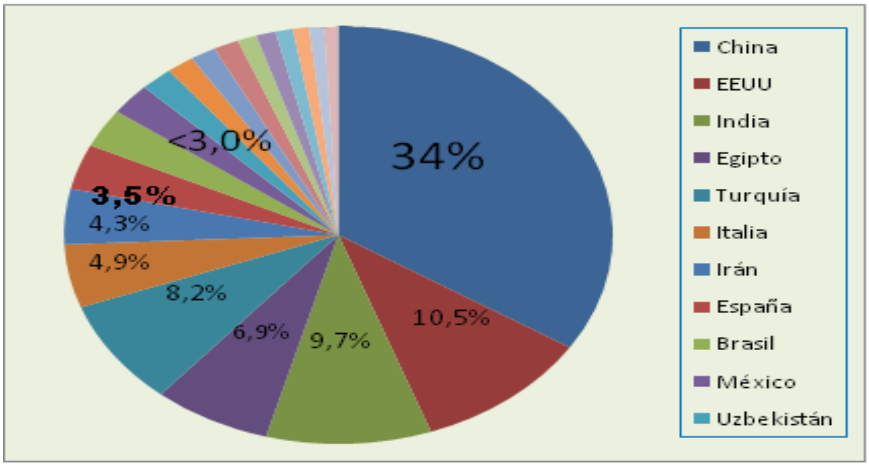

Figura 3: Principales países productores a nivel mundial año 2010 [6]

1.2.1 Morfología del fruto

El fruto de tomate [7] es una baya bi o plurilocular que se desarrolla a partir de un ovario de unos 5-10 mg y alcanza un peso final en la madurez de 5 a 500 g en función de la variedad y las condiciones de desarrollo. El fruto está unido a la planta por medio de un pedúnculo en el epicarpo o piel del mismo.

El fruto adulto de tomate está constituido, básicamente por un pericarpo (epicarpo de pequeño espesor y mesocarpo y endocarpo carnosos) que encierra dos o más lóculos, y una placenta con un tejido carnoso en el eje central y un tejido parenquimático de aspecto gelatinoso que llena parcialmente los lóculos que envuelve totalmente las semillas. Las semillas tienen forma aplanada y lenticular y dimensiones aproximadas de 5x4x2 mm.

Tabla 2: Clasificación USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) de madurez en función de la distribución del color en la superficie del fruto

FASE COLOR	CLASE	DESCRIPCIÓN
1	Verde	Toda la superficie del fruto es verde, con una variación en la tonalidad verde dependiendo de la variedad
2	Breaker	Un color que no sea verde aparece en no más del 10% de la superficie del fruto.
3	Turning	Entre 10-30% de la superficie adquiere un color amarillo pálido, rosa, rojo o una combinación de éstos.
4	Rosa	Entre 30-60% de la superficie muestra un color rosa o rojo.
5	Rojo claro	Entre 60-90% de la superficie es rojo.
6	Rojo	Más del 90% de la superficie del fruto es de color rojo.

La coloración del fruto es variable según el grado de madurez, y está relacionado con la mayor o menor degradación de las clorofilas y el desarrollo de pigmentos carotenoides, especialmente licopeno que da el color rojo característico. El color del tomate se puede estimar visualmente por medio de un cuadro de clasificación (Tabla 2). Sin embargo, resulta subjetivo debido a que el brillo, luminosidad y otras características modifican la percepción de los colores primarios y sus combinaciones.

Posee un sabor típico, agradable, astringente descrito como “sabroso” que recibe el nombre de unami [8,9] cuyos receptores se encuentran en la parte central de la lengua .El sabor unami es característico de alimentos ricos en proteínas. En la naturaleza hay tres sustancias con sabor unami: glutamato sódico (GMS), gluanilato disódico (GMP) e inosin monofosfato (IMP). Su presencia también influye en la maduración del fruto. El glutamato puede encontrarse libre o enlazado a proteínas. Cuando está enlazado proporciona mal gusto al fruto y no el sabor unami característico. Sin embargo, la hidrólisis de las proteínas durante la maduración conduce a la liberación del glutamato libre.

La norma comunitaria de calidad [10] clasifica los tomates por su forma en cuatro grupos: redondos, asurcados, oblongos o alargados, cereza o cherry y cóctel. De estos cuatro grupos se establecen otro tipos comerciales: Larga vida (Long Self Life, LSL, redondo, Daniela, etc.), liso (verde o de ensalada), oblongo (alargado o pera), beef (grueso), rama (racimo o ramillete), asurcado (marmande, raf), cocktail y cherry. También se pueden clasificar según el tamaño en función del calibre o diámetro máximo de la sección ecuatorial del fruto. En el presente trabajo, se han estudiado cinco tipos de tomates: Liso, Pera, Rama, Cherry y Kumato

Tabla 3: Tabla resumen de las características organolépticas [11] de las variedades de tomate objeto de estudio

TIPOS DE TOMATE	FORMA	CARACTERÍSTICAS
PERA	Alargado u oblongo	Piel fina y baya muy carnosa, verde al inicio y rojo-pintón cuando madura.
LISO (de "ensalada)	Redondo	Comercializados en pintón, colores desde verde a naranja. Tomates de maduración rápida de dentro a fuera, sin genes de larga vida. Buena consistencia, jugosos. En maduro (color rojo) son óptimos para salsas y gazpachos.
RAMA (o "tomate de colgar")		No es estrictamente una variedad sino una forma de presentación que conserva mejor sus cualidades ya que en zonas de clima seco se pueden colgar los ramilletes en un sitio ventilado y fresco y duran todo el invierno. Piel de grosor medio y muy jugoso. Carne firme, buen sabor y color rojo o tirando a anaranjado
CHERRY (o "cereza)	Variada (forma de ciruela, de pera, "pezón de Venus"…)	Pulpa de color rojo intensa y piel rojiza (también verdes, amarillos, casi negros, rojos más o menos intensos). Piel fina con tendencia al rajado. Sabor afrutado-ácido, aroma intenso y alta consistencia y muy jugosos.
KUMATO	Redonda	Resultado de técnicas tradicionales de reproducción vegetal y métodos naturales de cultivo (no genéticamente modificados). Semillas comercializadas por Syngenta Seeds.Madurez fisiológica desde el interior al exterior (maduración en la planta). Varía de marrón oscuro a verde dorado. Sabor amargo e intenso pero más dulces (mayor contenido en fructosa)

El tomate puede tener formas muy variadas: plana, esférica, ovalada, cilíndrica, o piriforme. También se pueden clasificar según el tamaño en función del diámetro que depende del tipo de variedad.

La firmeza o consistencia es junto al color otro de los atributos más demandados por el consumidor. Es un atributo textural que se utiliza para establecer el momento óptimo de recolección, la evaluación de calidad durante el almacenamiento, y el momento de comercialización en fresco o el procesado inicial [12]

1.2.2. Composición nutricional

Los tomates básicamente son agua. Presentan un bajo poder calórico dado su escaso contenido en materia seca y grasa y el alto contenido en agua. Tanto el contenido en agua como en los restantes componentes dependen de la variedad, condiciones de cultivo, etc., por lo que es difícil establecer unos valores precisos (Tabla 4).

Los azúcares constituyen la mayor parte de los sólidos solubles. Los azúcares libres más abundantes son la glucosa y la fructosa en proporciones semejantes. La sacarosa se encuentra en una menor proporción (0,1%), salvo algunas especies no comerciales donde la proporción de sacarosa es mayor que la de fructosa y glucosa. La materia seca disminuye con la maduración.

El ácido orgánico predominante en el tomate maduro es el cítrico, seguido del málico, que son los ácidos característicos del tomate. El ácido málico se encuentra en la pulpa y el ácido cítrico en la piel. La acidez del tomate, pH= 4-4,8, así como la relación entre ácido málico y

cítrico, depende de la variedad y está estrechamente relacionado con el contenido en potasio procedente de la fertilización.

Tabla 4: Composición nutricional por 100 g de tomate fresco

Composición nutricional [13]			
CALORÍAS (Kcal)	23	ÁCIDO CÍTRICO	0,20
AGUA (%)	93,5	FIBRA	0.50
MATERIA SECA	6,50	POTASIO	0,25
CARBOHIDRATOS TOTALES	4,70	GLUTAMATO enlazado	238
GRASAS	0,15	GLUTAMATO libre	140
N PROTEICO (g)	0,40		
AZÚCARES REDUCTORES	3,00		
SACAROSA	0,10		
SOLIDOS SOLUBLES TOTALES (°brix)	4,50		
ÁCIDO MÁLICO	0,10		

El contenido en almidón es mayor en frutos maduros que no maduros. Se acumula preferentemente en la placenta y en los lóculos.

El nitrógeno, el fósforo y el potasio representan más del 90% del contenido en minerales. Durante el desarrollo, la proporción de nitrógeno y fósforo de la materia seca disminuye, mientras que el potasio permanece constante. El potasio constituye la mayor parte de los cationes en el fruto y su acumulación es proporcional a la materia seca y a la acidez, de modo que su acumulación incrementa la acidez y el color del tomate. Un déficit de potasio reduce el crecimiento del fruto y se incrementa el máximo de la respiración climatérica, lo que supone un retardo en la maduración.

El tomate es una importante fuente antioxidante. Los antioxidantes más destacados son: ácido ascórbico (Vitamina C), tocoferoles (Vitamina E), compuestos fenólicos y carotenoides [13,14]. La concentración de caroteonides y polifenoles es mayor en la piel que en la pulpa [15]

Tabla 5: lista de compuestos carotenoides en el tomate

CAROTENOIDES	
Licopeno	**α-, β-,** γ- y ζ-**caroteno**
Violaxantina	Neurosporeno
Neoxantina	Fitoeno
Luteina	Fitoflueno
Zeaxantina	Ciclocopeno
α-criptoxantina β-criptoxantina	5,6-epoxi-β-caroteno

El ácido ascórbico (Vitamina C) es un compuesto hidrosoluble y nutriente esencial que juega un papel importante en el retraso de la patogénesis en una variedad de enfermedades degenerativas como enfermedades cardiovasculares, ciertos cánceres, cataratas, además de prevenir mutaciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo [16,17]. La máxima concentración de ácido ascórbico se alcanza en el tomate cuando adopta una coloración amarilla. En una maduración (ripeness) avanzada el contenido tiende a disminuir debido a su función antioxidante ya que absorbe O_2 por el aumento de la velocidad de respiración.

Los α y β- tocoferoles (Vitamina E) presentan el mismo comportamiento que el ácido ascórbico durante la maduración, excepto γ-tocoferoles, cuyo máxima concentración se alcanza en el primer estado de madurez.

Los compuestos carotenoides más importantes a nivel nutricional son el α y β-caroteno y el licopeno (Tabla 5). El α-caroteno y β-caroteno junto con β-criptoxantina tienen actividad pro-vitamina A y por tanto, son precursores de la vitamina A (retinol) previa transformación en retinal. El licopeno es el carotenoide de mayor longitud, es lipófilo y actúa como quencheador de oxígeno (en mayor medida que el β-caroteno y el α-tocoferol), capacidad relacionada con la diferencia de energía entre los orbitales frontera HOMO y LUMO, que a su vez depende de la longitud de la cadena conjugada. La concentración de β-caroteno y de licopeno se incrementa al avanzar la madurez, la rápida acumulación de los pigmentos es lo que proporciona una coloración roja.

Los compuestos polifenoles (flavonoides y no flavonoides) son un grupo muy extenso de compuestos presentes en el tomate (Tabla 6). Los tomates o el jugo de tomate contienen principalmente quercetina, campferol, rutin (flavonoles) y naringenina (flavanona), entre otros incluidos los conjugados [18-20].

Tabla 6 : Lista de compuestos fenólicos detectados en tomates

ACIDOS SIMPLES	FLAVANONA	FLAVONOLES
-Ácido fenólico simple -Derivados (cumárico, cafeico, vanilico..)	- Naringenina - Eriodictiol	**-Quercetina** -Campferol -Rutin - Miricetina -Quercetin-3-rammnosilglucosido (campferol conjugado)

En los tomates verdes predominan clorofilas a y d aunque se detectan flavonoides en muy baja concentración incorporados a las ceras epicuticulares del fruto y una alta acumulación de antocianinas. A medida que transcurre la maduración se van incorporando progresivamente en la cutina hasta la total maduración donde las clorofilas, pero no antocianinas ni flavonoides, desaparecen completamente. En la sobremaduracion, se detecta una acumulación adicional de flavonoides en el fruto almacenado por su naturaleza antioxidante [21].

1.3 Calidad y análisis del tomate

Para asegurar la calidad fisiológica y organoléptica se evalúan una serie de parámetros de calidad (o índices de madurez) que son diferentes según el tipo de fruto. Estos índices de madurez pueden dar información acerca de la calidad externa e interna del mismo. La tabla 7 recoge los índices de madurez a tener en cuenta en la calidad de un fruto extrapolados al estudio del tomate de tipo físico-mecánico o físico-químico junto con los métodos de análisis indicando si son destructivos o no destructivos.

Tabla 7. Índices de calidad más importantes junto con las técnicas empleadas indicando su carácter destructivo sobre la muestra.

PARÁMETROS DE CALIDAD INTERNA: técnicas físico-mecánicas			
PARÁMETRO	**TÉCNICA**	**¿DESTRUCTIVA?**	**REFERENCIAS**
Firmeza	Ensayo de fuerza/deformación (Penetrómetro)	Sí	[22, 23]
	Impacto	Sí	
	Ultrasonidos	No	[12]
Daños por frío, y otros defectos	Ultrasonidos	No	[22]
	Tomografia computarizada (CT) y eléctronica (ET)	No	[24,25]
	RMN	No	[26]

a) PARÁMETROS CALIDAD EXTERNA E INTERNA: técnicas físico-químicas				
PARÁMETRO		**TÉCNICA**	**¿DESTRUCTIVA?**	**REFERENCIAS**
Color		Cartas de color	No	
		Colorimetría (Vis, IR)	No	[27]
	Clorofilas, carotenoides y otros pigmentos	Espectrofluorimetria /LIF	Sí/No	[21]
		Colorimetría en línea		
		Sensores (cámaras CCD: VIS y NIR))	No No	[28] [25] [22]
Humedad / Materia seca		Gravimetría	Sí	
		ATR-FTIR	No	[29]
		Rayos-X	No	
		RMN	No	
Sólidos solubles		° Brix (Refractometría)	Sí	AOAC 932.12
		ATR-FTIR		[29]
Azúcares	Fructosa/sacarosa/glucosa	HPLC(-ICP-AES)	Sí	[30]
		FT-NIR	No	[32]
		ATR-FTIR	NO	[31]
		Lengua electrónica	No	
Acidez titulable	Ácido cítrico	Titulometría	Si	AOAC 942.15
		FITR	No	[33]
Ácidos orgánicos	Ácido málico/Ácido cítrico	HPLC(-ICP-AES)	Sí	[28]
		HPLC/índice de refracción	Sí	
		Lengua electrónica	No	
		FT-NIR	No	[33]
		ATR-FTIR	No	[31]
Volátiles		MHS-SPME-GC-MS	Si	[34]
		Nariz Electrónica	No	[35]
		Lengua electrónica		
Ácido ascórbico		Titulometría	Sí	[15]
		Colorimetría (2,4-dinitrofenilhidrazina)	Sí Sí	[14]
		HPLC (par iónico)-UV		
Pigmentos	Clorofilas a y b	HPLC	Sí	[27]
	Carotenoides	UV-VIS	Sí	
	Flavonoides	FT-IR	No	[36-38]
	Tocoferoles	(FT)-Raman	No	
		Espectrofluorimetría /LIF	No/Sí	[21]

Los sólidos solubles se determinaban fácilmente por refractometría, la materia seca por gravimetría (secado de muestra hasta peso constante), la acidez total por medio de una titulometría con NaOH 0.1M usando fenolftaleína como indicador pero la detección de punto final de una manera exacta es difícil debido al color del tomate. Para la separación y cuantificación de ácidos orgánicos, azúcares y pigmentos se hace uso de HPLC-índice de refracción (ácido málico y cítrico, fructosa, glucosa y sacarosa) y HPLC-MS o HPLC-UV-VIS (carotenoides, polifenoles, tocoferoles) pero se necesita un pretratamiento para la extracción y purificación de los analitos de interés, además de una preconcentración en algunos casos. [39]

La tendencia actual es recurrir al empleo de métodos no destructivos que son menos laboriosos y precisan un menor tiempo al tratarse de medidas con una mínima o ninguna preparación de muestra. Además la instrumentación ha evolucionado tal que se han desarrollado equipos que permitan la medida simultánea continua y rápida de un gran número de muestras dentro de las líneas de control de calidad de rutina de frutas y hortalizas. El presente trabajo hace hincapié en el empleo de técnicas espectroscópicas moleculares dadas sus características no destructivas para la evaluación del grado de madurez a partir de la medida de parámetros de calidad físico-químicos del fruto.

1.4. Espectroscopía molecular aplicada al análisis de tomates [40]

Los métodos ópticos espectroscópicos de análisis se basan en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética tras interacciones profundas con la materia. La figura 4 representa el espectro electromagnético que recoge los intervalos de longitud de onda de mayor interés analítico junto con el tipo de transición que tiene lugar.

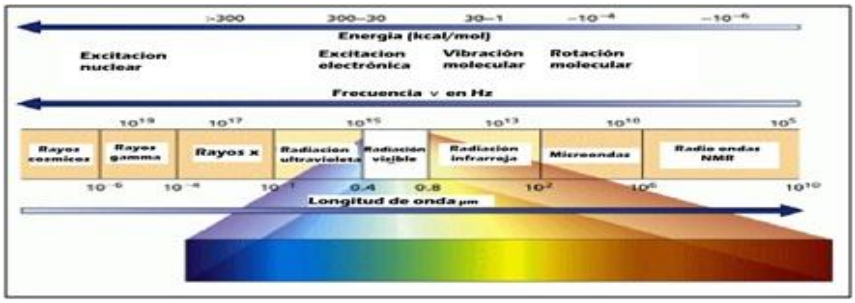

Figura 4: Espectro electromagnético

1.4.1 Visible-ultravioleta

La Espectroscopia de absorción Visible-Ultravioleta (Vis-UV) tiene lugar como consecuencia de transiciones entre niveles electrónicos de la molécula. La absorción molecular por parte de los grupos cromóforos de la especie absorbente está relacionada con la concentración de la misma a través de la Ley de Beer ($A=b\,\varepsilon\,c$).

Los espectros de carotenoides, tocoferoles, polifenoles y otras pigmentos del tomate están fuertemente solapados en la región Vis-UV [25] dado que se tratan de mezclas complejas y existen interacciones entre las especies absorbentes. Sin embargo, los métodos iterativos de regresión lineal múltiple [41] y empleo de redes neuronales [42] resultan útiles para resolver este problema.

1.4.2 *Infrarrojo*

La Espectroscopia de Infrarrojo (IR) se basa en el estudio de transiciones vibracionales y rotacionales que provocan cambios en el estado la molécula (Tabla 8). La región del infrarrojo medio (MID) comprende las longitudes de onda correspondientes a las vibraciones rotacionales fundamentales mientras que sobretonos o bandas de combinación de la transición fundamental se asocian con la región del infrarrojo cercano (NIR).

Tabla 8: Regiones del espectro infrarrojo

REGIÓN	LONGITUD DE ONDA (λ), µm	NÚMERO DE ONDA ($\bar{v}$), cm^{-1}
Cercana	0,78- 2,5	12800 a 4000
Media	2,5-50	4000 a 200
Lejana	50-1000	200 a 10

La Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIR) es la más empleada para la medida de los parámetros de calidad [43], ya que es una técnica rápida, con una precisión y exactitud adecuada. El Nir abarca el rango del espectro electromágnético entre 780-2500 nm y dada su versatilidad se puede registrar el espectro tanto de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. El producto es irradiado con radiación NIR y se mide la radiación reflejada o transmitida tras la absorción de radiación por parte de enlaces tipo –CH, -NH y –OH, siendo el modo transmitancia el más empleado [28]. Sin embargo, la información química proporcionada por este método se ve distorsionada por propiedades físicas de la muestra, por lo que el uso de la espectroscopía NIR requiere la calibración del método por otros métodos de cuantificación de los compuestos de interés.

El agua interfiere menos en el espectro a diferencia del Infrarrojo Medio (MID) donde las bandas intensas de agua en el espectro afectan drásticamente a la exactitud y sensibilidad para análisis cuantitativos [44]. Las bandas de absorción del agua que pueden influir en los espectros son las siguientes: 760 nm (13158 cm^{-1}) y *970 nm (10309 cm^{-1}) correspondientes a la tensión del enlace O-H ("stretching") y al segundo sobretono del agua, 1450 nm (6896 cm^{-1}) correspondiente a la tensión del enlace O-H y primer sobretono) y 1940 nm (5154 cm^{-1}: tensión y flexión del enlace O-H).* Sin embargo, la espectroscopia NIR en algunos casos es menos útil para el análisis cualitativo que la MID por la anchura intrínseca y solapamientos de bandas de absorción aunque apenas se requiera preparación de muestra.

El empleo de radiación infrarroja NIR en modo de transmitancia para el estudio de frutos y hortalizas donde el detector se coloca en posición opuesta atravesando el fruto permite medir las interacciones con las moléculas que lo componen a lo largo del camino óptico, siendo una parte de ella absorbida. La radiación no absorbida pasa de largo y se mide la radiación transmitida. La transmitancia permite conocer las características internas del fruto en su totalidad (desde la piel hasta el núcleo). En el modo reflectancia, donde fuente y detector están dispuestos en un ángulo de 45 ° para evitar reflexión especular, la radiación no absorbida es reflejada y cuantificada. Sólo los primeros milímetros en el interior de la pulpa son atravesados por la radiación y sólo se refleja la luz de la superficie y de zonas próximas a la epidermis del fruto. El modo transflectancia (o doble transmisión) combina reflectancia y transmitancia. Parte

de la luz incidente se refleja en la muestra y la otra parte la atraviesa, siendo reflejada en un material dispuesto en la cara opuesta de la muestra .

Para el análisis ***in situ*** de frutos se han desarrollado equipos NIRS portátiles que permiten recoger espectros antes y durante la cosecha e incluso la tecnología NIRS permite trabajar en continuo en las líneas de producción y clasificación sobre el fruto entero, a diferencia de MID donde la necesidad de molienda del fruto hace imposible su uso en las líneas de clasificación.

Los espectrofotómetros de infrarrojo medio que emplean transformada de Fourier (FTIR) han sido propuestos como una buena alternativa a las técnicas cromatográficas para la detección de componentes individuales en alimentos por la alta relación S/N, el elevado poder de resolución y reproducibilidad y rapidez (análisis multiplexado) (…) El rango de absorción de las vibraciones moleculares en azúcares y ácidos se corresponden a la tensión (stretching) C=O, C-O y C-C y flexión (bending) O-H. En el análisis de ácidos orgánicos en puré de tomate se puede diferenciar entre el ácido málico relacionado con la acidez total (8700, 7223 y 6238 cm-1) y el ácido cítrico (8700, 7223 y 6500 cm-1) [33]. Del mismo modo ocurre con los azúcares [32].

Dada la dificultad que ofrecen los frutos para ser analizados por transmisión en el MID por su alto contenido en agua, las medidas por reflectancia total atenuada en el infrarrojo, ATR-FTIR, ofrecen un creciente interés para el análisis, siendo numerosas las publicaciones que permiten calcular el contenido individual de carbohidratos y ácidos orgánicos, extendiendo su uso al análisis de otros componentes como los carotenoides (licopeno y β-caroteno) [37] La técnica [45] se basa en el hecho de que cuando la radiación electromagnética se propaga con un ángulo de incidencia mayor que el ángulo crítico desde el cristal hasta a un medio menos denso, en este caso la muestra, la radiación es reflejada en su totalidad de modo que se origina una onda evanescente que se propaga cierta distancia hacia el medio con menor índice de refracción. La radiación es atenuada por éste antes retornar a la interfase. La radiación puede experimentar múltiples reflexiones internas a lo largo del cristal antes de alcanzar al detector lo que explicasensibilidad adicional que ofrece esta técnica. (Figura 5) El número de reflexiones depende de la longitud y del espesor del cristal y del ángulo de incidencia. La profundidad de penetración depende de la muestra, ya que cambiar de muestra implica cambios en el índice de refracción. . La onda evanescente sólo penetra unos pocos micrómetros en la muestra (entre 0.5 y 5 micrómetros), por lo que muestra y cristal deben estar en contacto íntimo por aplicación de presión suficiente sobre la muestra

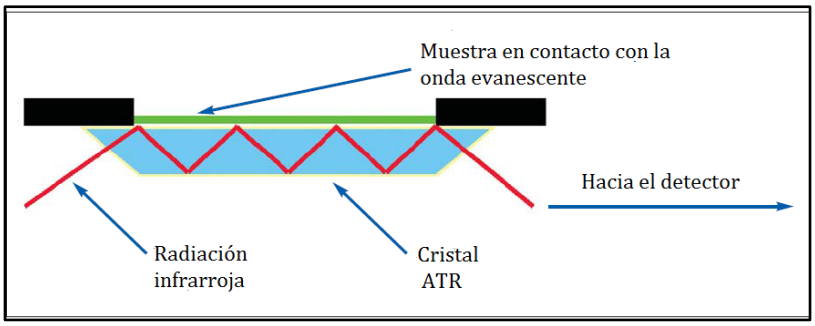

FIGURA 5: Sistema ATR de reflexión múltiple (Perkin Elmer)

Un equipo de ATR-FTIR consiste en un espectrómetro FTIR con un detector de sulfato de triglicina deuterado. El módulo de muestra viene equipado con un accesorio horizontal de ATR con múltiples reflexiones. Está formado por un cristal de ZnSe con un canal poco profundo

sobre el cual se dispone la muestra en contacto directo con el cristal. Aunque hay un gran número de cristales disponibles para ATR como ZnSe y germanio, los cristales de diamante son más robustos, prácticamente inertes y resistentes a la degradación química de los disolventes tras el lavado después de cada análisis a pesar de su alto coste. Esta técnica permite un análisis intacto de la muestra y los espectros se obtienen por acumulación de barridos con una resolución espacial adecuada. Este tipo de dispositivos se han acoplado con éxito al desarrollo de sistemas automatizados de análisis por inyección de flujo (FIA) y el análisis secuencial (SIA), que han resultado especialmente útil en el análisis del aroma en tomates a través de la estimación en azúcares y ácidos orgánicos [46]. Los carotenoides también manifiestan intensas bandas de vibración [37] (RH)-C=C-(RH) a 965 cm^{-1} (β-caroteno) y 960 cm^{-1} (licopeno) que le son característicos. Junto a la banda del β-caroteno puede aparecer una banda satélite (≈950 cm^{-1}) que puede atribuirse a pequeñas cantidades de otro carotenoide. En estándares puros aparecen bandas de deformación simétrica a 1370 cm^{-1} (CH_3) y 1450 cm^{-1} (CH_2) que en una muestra de tomate están enmascaradas por los modos de vibración del agua entre 1635 y 1060 cm^{-1}

1.4.3 Espectroscopía Raman

La Espectroscopía Raman se basa en la dispersión inelástica de la radiación monocromática láser visible o infrarroja. Para que exista dispersión Raman y por tanto una vibración sea activa debe provocar un cambio en la polarizabilidad de la molécula en presencia de un campo eléctrico, cuyos desplazamientos son independientes de la longitud de onda de excitación.

A diferencia de los espectros de infrarrojo, en los espectros Raman el agua no produce interferencias ya que produce una dispersión Raman muy débil, por lo que la la técnica es adecuada para el estudio de muestras acuosas. La principal limitación es la interferencia debida a la fluorescencia propia de la muestra, pudiendo interferir en la observación de los desplazamientos Stokes y no en los Anti-Stokes (menos intensos), que se puede eliminar con el uso de fuentes de láser infrarrojo. La tabla 9 enumera cinco de los láseres más empleados en espectroscopía Raman. El láser Nd:YAG (1064 nm) y de diodos en serie (785 nm) en modo pulsado emiten radiación en el infrarrojo cercano y se ha generalizado su uso como fuentes de excitación porque pueden operar a potencias elevadas sin producir problemas de fotodescomposición y son capaces de minimizar o inhibir la fluorescencia.

Tabla 9: Fuentes láser comunes en espectroscopia Raman [40]

TIPO DE LÁSER	LONGITUD DE ONDA, nm
Ión argón	488,0 o bien 514,5
Ión criptón	530,9 o bien 647,1
Helio-Neón	632,8
De diodos	785 o bien 830
Nd:YAG	1064

Los espectrómetros Raman consisten en una fuente láser monocromática visible o infrarroja, donde la dispersión de la radiación se registra en un ángulo de 90º con respecto al detector para minimizar la radiación de la fuente no dispersada. En la actualidad la mayoría de los espectrómetros Raman comerciales son instrumentos de Transformada de Fourier con detectores de germanio enfriados con N_2 líquido. La mayoría de los equipos están preparados

para un muestreo con sonda óptica utilizando fibras bifurcadas que envían la radiación láser de excitación a la muestra y transfiere las señales Raman al espectrómetro. [36, 47].

En la espectroscopía Raman de Resonancia se incrementa la sensibilidad y selectividad por las siguientes razones:

a)Las líneas de Resonancia Raman son más intensas que las de dispersión normal porque la excitación tiene lugar con longitudes de onda próximas a la del pico de absorción electrónico

b)Se necesita que exista un cromóforo y por eso el aumento de resonancia sólo se limita a las bandas Raman asociadas con el cromóforo dando lugar a espectros con menos líneas que el de Raman "normal"; de ahí, la mayor selectividad.

FT-Raman con excitación NIR (1064 nm Nd:YAG) permite distinguir carotenos a través de la banda de vibración asimétrica V_1 (licopeno (1510 cm-1); β-caroteno (1520 cm-1) en tomates) pero no es posible con FT-Raman con excitación visible [36,37]. Los tomates anaranjados muestran mayor intensidad de la banda 1520 cm^{-1} correspondiente a mayores cantidades de β-caroteno. Adiccionalmente los carotenides presentan otras dos bandas de Stokes características a: ν_2=1156 cm^{-1} y ν_3=1005 cm^{-1} (componentes metilo). La banda Raman ν_1 tiende a desplazarse a menores número de ondas con el aumento del número de conjugaciones de la cadena mientras que la ν_2 disminuye con la longitud de la cadena central conjugada por acoplamiento electrón-fotón.

También es posible de estudiar la degradación de la clorofila a través de sus bandas Raman a 1606 cm-1 (Clorofila A) y 1650 cm-1 (clorofila d).

1.4.4 Fluorescencia molecular

Los pigmentos del tomate aparte de ser fuertes dispersores Raman, también presentan propiedades fluorescentes. Su análisis tanto cualitativo como cuantitativo se puede llevar a cabo aprovechando dicha propiedad nativa sobre la piel del fruto. Se emplean espectrofluorímetros o equipos de tecnología láser o LIF (fluorescencia inducida por laser) para análisis *in situ* de la muestra intacta [21].

- Los espectrofluorímetros constan de una fuente de excitación de radiación continua, generalmente una lámpara de arco de xenón de alta presión de 75 a 450 W, dos monocromadores de red de excitación y emisión y un sistema de detección a 90º respecto a la fuente para evitar la emisión de la propia fuente. El espectro de emisión de un extracto orgánico se obtiene fijando una λ_{exc} y el de excitación fijando la λ_{em}.

- Los instrumentos LIF emplean láseres pulsantes como fuente de excitación en lugar de lámparas de radiación continua (láser de nitrógeno pulsante, láser Nd:YAG). Después de la excitación por una radiación laser monocromática no coherente de baja intensidad, que no ocasiona daños sobre el fruto, la radiación fluorescente dispersada por dicha superficie es enfocada por un sistema óptico hacia el detector a través del monocromador. La medida de fluorescencia se lleva a cabo adquiriendo el espectro en una ventana temporal abierta al final del pulso.

Las medidas de fluorescencia permiten el estudio de pigmentos producidos como consecuencia de la maduración (flavonoides, antocianinas, carotenoides) con excitación tanto

en el ultravioleta para los dos primeros como en el visible, así como la degradación de la clorofila como consecuencia de la maduración a partir de la disminución en la intensidad de la banda de *excitación que posee un máximo a 355 nm y un máximo de emisión a 680 nm*. En el espectro también se observar dos picos de absorción a *435 nm (clorofila a) y 470 nm (clorofila d)*.

La tabla 10 recoge las bandas fluorescentes de interés para el análisis espectrofluorimétrico de los diferentes pigmentos presentes en el tomate.

Tabla 10 : Bandas espectrales de los pigmentos característicos del tomate (λexc y λem)

PIGMENTO	λ_{exc} (nm) (monocromático)	λ_{em} (nm)
Antocianinas (cloruro de palargonidina)	266	335
Flavonoides (quercitina)	266	435
Carotenoides	355	525
Clorofila a	355	672

De manera indirecta, un seguimiento de la evolución de estos pigmentos, pueden dar información de la madurez en base a los cambios de color experimentados y comparados con la clasificación USDA del color.

En la tabla 11 se resumen los pretratamiento de muestra más representativos que se requiere para el análisis de distintos analitos, relacionados con el estado de madurez del fruto, empleando técnicas espectroscópicas moleculares. Con fines comparativos se incluyen también dos ejemplos correspondientes al empleo de técnicas de separación.

Tabla 11: Pretratamiento de muestra de tomate según la técnica de análisis empleada

TÉCNICA	ANALITO	TRATAMIENTO DE MUESTRA	Referencias
HPLC	-Carotenoides (*[1])	-Vortex (5min) de tomate en metanol en buffer tris-HCl y extracción en CCl4	
	-Tocoferoles	-Saponificación previa por reflujo en KOH metanólico	[14]
	-Ácido ascórbico	-Agitación mecánica de mezcla de tomate en ácido metafosfórico 2% (15 min) y filtración (-20ºC)	
HPLC	-Azúcares	-Dilución previa y clarificación con reactivo Carriez ($K_4Fe(CN)_6$ + $Zn(OAc)_2$)	[44]
	Materia seca	Secado de muestra hasta peso constante	[39]

UV-VIS	-Carotenoides (licopeno, β-caroteno)	-Mismo procedimiento que en el HPLC	[14,38]
IR (NIR)		Centrifugación de puré de tomate (4000 rpm, 20 min) y filtración (separación partículas dispersas)	[32,33,36]
FT-IR			
(FT)-Raman		-Tomate intacto o puré de tomate (productos derivados)	[36,37,46]
FT-ATR	Carotenoides Azúcares solubles (D-glucosa, D-fructosa)	-Tomate intacto sobre el cristal de ZnSe	
Fluorescencia	Carotenoides Antocianinas Flavonoides Clorofilas	-Extracción de pigmentos en metanol (piel+ 1ª capa pericarpo). Congelar 2 h -20ºC. Homogenizacion (1 mm en metanol y filtración final. *(Espectrofluorimetría)* -Muestra intacta *(LIF)*	[21]

En la tabla 12 se resume las características espectrales de componentes típicos del tomate para las distintas técnicas de espectroscopía molecular.

Tabla 12: Características espectroscópicas de compuestos típicos del tomate

TÉCNICA	ANALITO	DATOS ESPECTRALES
UV-VIS	Licopeno Azúcares solubles	420, 444, **470, 500 nm** (420, 444 nm interferidos por α-caroteno y luteína) [38]
	Clorofila	435 nm (clorofila a), 470 nm (clorofila d)
NIR/ FIT-IR	Acidez total/Ácido málico Ácido cítrico Azúcares solubles [48]	8700, 7223 y 6238 cm^{-1} 8700, 7223 y 6500 cm^{-1} } [33] Glucosa: 1587 nm (6307 cm-1), 2121 nm (4714 cm^{-1}), 2271 nm (4403 cm^{-1}) Fructosa: 1583 nm (6317 cm^{-1}), 2123 nm (4710 cm^{-1}), 2271nm (4403 cm^{-1}) Sacarosa: 1584 nm (6313 cm^{-1}), 2120 nm (4717 cm^{-1}), 2274 nm (4398 cm^{-1})
FT-Raman	Licopeno β-caroteno	V2=1156 cm-1 V3=1005 cm-1 V1=**1510 cm^{-1} (licopeno)**; **1520 cm^{-1} (β-caroteno)** [36,37]
Fluorescencia [21]	Antocianinas (cloruro de palargonidina)	λexc= 266 nm λem=335 nm
	Flavonoides (quercitina)	λexc=266 nm λem=435 nm
	Carotenoides	λexc=355 nm λem=525 nm
	Clorofila a	λexc=355 nm λem=672 nm

1.4.5 Técnicas de imagen

Proporcionan información sobre la distribución espacial de los constituyentes en toda la extensión del fruto, ya sea en la superficie como en el interior del mismo. El análisis por procesamiento de imagen consta de las siguientes etapas: (1) operaciones de adquisición de imagen, (2) operaciones de pre-procesamiento para la mejora de la imagen obtenida de las mismas dimensiones que la original, (3) segmentación de la imagen para dividirla en regiones inconexas no superpuestas, (4) medida de características (tamaño, forma, color, textura) y (5) clasificación para la identificación.

Tras el procesamiento de imágenes se puede caracterizar el peso del fruto tomando imágenes de un área determinado del fruto, defectos relacionados con la textura, definir la forma en base a su curvatura, entre otros [49].

El uso de **cámaras de visión CCD**, de imagen de resonancia magnética (RMI), tomografía computarizada de rayos X (CT) o eléctrica (ET) están ampliamente extendidos para la obtención de imágenes de alimentos ([22,24]. Las camáras CCD proporcionan información sobre atributos externos como defectos superficiales para la clasificación en manzanas y la forma del fruto tal como Beyer et al., 2002 evaluaron en cerezas [50,51]. Aplicado al tomate las cámaras CCD (VIS e IR) son de gran utilidad en la cadena de producción para obtener una imagen nítida del fruto para determinar forma, diámetro y color e incluso defectos externos [26]

Para el pre-procesamiento del color se utilizan sistemas de referencia de color aceptados a nivel internacional:

- RGB (rojo, verde y azúl)
- Método triestímulo XYZ de la CIE Yxy (Commision Internationale de l´Eclairage) basado en la percepción simultánea de los tres colores fundamentales, rojo (X), verde (Y) y azúl (Z).
- Espacio de color L*a*b* CIE: proporciona más diferencias en el color en relación a la percepción humana. El espacio de color viene definido por una esfera definidad por la luminosidad L* (blanco=100-negro=0) y las direcciones del color a* (eje rojo-verde) y b* (eje amarillo-azúl). El centro de la esfera representa el gris acromático, el tono se localiza alrededor de la circunferencia y la saturación se define por la distancia desde el centro

La principal limitación de las cámaras CCD es su baja capacidad para ofrecer imágenes de estructuras internas del fruto relacionadas por ejemplo con el contenido en agua en tejidos y la presencia de defectos. Para ello se recurre a técnicas especiales de adquisición: MRI, CT, ET e incluso técnicas mecánicas como ultrasonidos.

La **tomografía computarizada de rayos X** se basa en la diferencia en la velocidad de atenuación que sufren los rayos X al atravesar un fruto debido a la presencia de los distintos tejidos , dependiendo de su densidad, efecto que se emplea para la adquisición de secciones de tejidos y estructuras. Entre las publicaciones que han empleado CT dentro del área hortícola destaca la determinación del contenido en agua en manzanas [52], la evaluación de los cambios de textura exhibidos en nectarinas al separarse del hueso [53] y el estudio de madurez en tomates [24].

Por otro lado, las técnicas de **tomografía eléctrica (ET)** mide diferencias en propiedades eléctricas del material lo que permite distinguir 3 modalidades: tomografía de

resistencia eléctrica o impedancia (ERT o EIT), tomografía de capacitancia eléctrica (ECT) y tomografía de inductancia electromagnética (EMT). La principal desventaja es su baja resolución espacial.

La generación de imágenes de resonancia se controla a partir de la secuencia del pulso de radiofrecuencia empleada para la excitación de los espines nucleares. El fundamento de la **resonancia magnética nuclear** es la interacción entre las onda radio (2-200 MHz) y los núcleos atómicos (protones) sometidos a la acción de un campo magnético. En los materiales biológicos, como frutas y vegetales, son el principal componente del agua y azúcares. Por eso, una de sus aplicaciones en el tomate es la determinación del contenido en humedad y su migración en la región locular y el análisis de carbohidratos relacionado con la evaluación de la madurez. En otros frutos se ha empleado para detectar defectos internos, daños por insectos y hongos, magulladuras, toma de imágenes de semillas y huesos como medio de clasificación [26] .A diferencia de los rayos X, el análisis por RMN resulta inocuo para el ser humano, la fruta y el ambiente. Aunque tienen un gran potencial para el estudio de la calidad interna, en los laboratorios agroalimentarios de rutina carecen de utilidad práctica ya el equipo es caro, difícil de manejar y requiere personal especializado.

1.5.Quimiometría aplicada al análisis espectroscópico [54]

1.5.1. Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) estudia la información existente a partir de las interrelaciones entre variables y reduce las dimensiones de la matriz de datos (reducción de variables) mediante un reconocimiento de pautas no supervisado. Con el PCA se persigue maximizar la información de la varianza presente en el conjunto de datos y representarla en el menor número de dimensiones posible, utilizando como base la rotación propia de los ejes para conformar nuevos ejes denominados componentes principales.

Las componentes principales se definen como combinaciones lineales de las variables originales que describen cada muestra. Se representan por ejes ortogonales independientes e incorrelacionados entre sí y se seleccionan en orden decreciente de la cantidad de varianza explicada basándose en las correlaciones entre las variables iniciales y las mismas.

La primera componente principal (CP_1) se orienta en la dirección de máxima variación (dispersión) de los puntos, es decir, es la componente con la mayor variabilidad del conjunto de datos [55] De este modo, las coordenadas de las muestras sobre la CP_1 preservan al máximo la estructura original de los datos. El segundo eje, CP_2, también se orienta en la dirección de la máxima dispersión; pero, como debe ser perpendicular al primer eje, sigue la dirección de la máxima dispersión residual que no ha sido explicada por la CP_1, y recoge la información que no ha podido recoger la CP_1. El tercer eje (CP_3) se orienta siguiendo el mismo criterio que los dos ejes anteriores: perpendicular a ellos y en la dirección de la máxima dispersión. Esta tercera coordenada explica la información residual no explicada por los dos primeros y así sucesivamente. Por tanto, si existe correlación entre las variables, el número de componentes principales útiles será mucho menor que el número de variables originales.

1.5.2 Análisis clasificatorio

Los métodos clasificatorios permiten construir modelos para pronosticar la pertenencia de un objeto a una categoría en base a las características propias del objeto.

Los métodos de clasificación pueden ser de dos tipos según permita un reconocimiento de pautas supervisado o no supervisado, es decir, se tengan en cuenta o no la pertenencia de los objetos a las distintas categorías conocidas o supuestas.

1. Clasificación no supervisada: Análisis de Clúster

El análisis de clúster consta de varios pasos, el primero, consiste en determinar la similitud entre objetos. Las cuatro vías principales que son empleadas para la similitud son : el cálculo de coeficientes de correlación entre muestras, obtención de la distancia Euclidiana, la obtención de la distancia de Manhatan o de la distancia de Mahalanobis, siendo la distancia Euclidiana Cuadrada la empleada en el presente trabajo. El siguiente paso está relacionado con la interconexión entre objetos y agrupación de los mismos (clúster por aglomeración o dendograma). Como método de conexión de las muestras se utiliza el cálculo de los vecinos más cercanos y como medida de similitud, los coeficientes de correlación.

2. Clasificación supervisada

Estos modelos se construyen a partir de un modelo de entrenamiento, es decir, un conjunto de objetos cuya categoría y cuyos valores de las variables predictoras sean conocidas. El conjunto de entrenamiento se utiliza posteriormente para predecir a qué categoría pertenecen otros objetos de los que se conocen los valores de las variables predictoras.

Para construir un modelo adecuado se deben cumplir dos condiciones:

- El conjunto de entrenamiento debe estar formado por un mínimo de 4 o 5 objetos independientes de cada categoría.
- Las variables predictoras deben contener información discriminante intra-categorias.

Además todos los objetos a clasificar deben pertenecer a alguna categoría (asignación exhaustiva) y ninguno de ellos debe pertenecer a más de una (asignación mutuamente exclusiva).

La validación de un modelo de clasificación consiste en establecer sus capacidades de reconocimiento y de predicción, así como su estabilidad o robustez. La capacidad de reconocimiento es el porcentaje de objetos de un conjunto de entrenamiento clasificados correctamente mientras que la capacidad de predicción es el porcentaje de objetos del conjunto de predicción clasificados correctamente.

Existen diferentes tipos de técnicas clasificatorias: Análisis Discriminante Lineal (ADL) o Cuadrático (ADC) según las combinaciones de las variables sean lineales o cuadráticas, Método de los k-vecinos y Método de las redes neuronales artificiales. Para construir el modelo para la clasificación de las variedades de tomate se hace uso de la técnica de Análisis Discriminante Lineal (ADL), cuyos fundamentos se explican a continuación.

El análisis discriminante es una técnica estadística multivariante que permite pronosticar la pertenencia de un objeto a una categoría buscando combinaciones lineales (análisis discriminante lineal) que maximicen la varianza entre categorías y minimicen las varianzas

intra-categorias. De esta manera se establecen funciones discriminantes lineales que sean capaces de predecir la pertenencia de objetos a una u otra categoría en función de su probabilidad de pertenencia. Un objeto queda clasificado dentro de la clase para la que se obtiene mayor probabilidad.

Una función discriminante lineal viene expresada por la expresión siguiente:

$$f= a_1x_1 + a_2x_2 +\ldots+ a_nx_n$$

donde “a” representa los coeficientes de la función discrimininante y x, las variables.

Las funciones discriminantes se construyen de una en una buscando aquellas direcciones del espacio que maximicen la siguiente expresión:

$$\lambda' = SC_D/SC_1$$

donde SC_D es la suma de los cuadrados de las distancia Euclídeas entre los objetos que pertenecen a distintas clases, en la dirección que indica la función discriminante y SC_1 es la suma de los cuadrados de las distancias Euclideas entre los objetos que pertenezcan a la misma clase, también en la dirección de la función discriminante. A partir de q clases se obtienen q-1 funciones discriminantes, en orden decreciente de su valor de λ´ y manteniendo la ortogonalidad entre ellas.

Una vez determinada la función discrimininante se establecen fronteras explicitas que separan las regiones del espacio que pertenecen a cada categoría modelado en torno a su centroide mediante una distribución normal de probabilidad. La probabilidad disminuye por igual en todas las direcciones del espacio m-dimensional de las variables originales, siendo alta en puntos situados cerca del centroide de cada categoría, y baja para puntos alejados y las probabilidades de pertenencia se igualan en la región crítica o frontera.

2. EXPERIMENTAL

2. 1 Materiales y Reactivos

2.1.1 Reactivos y muestras

•**β-caroteno (provitamina A) purum 97,0% Sigma Aldrich** (Mr($C_{40}H_{56}$)=536,87 g/mol; sólido rojo-púrpura; almacenamiento a -20°C)

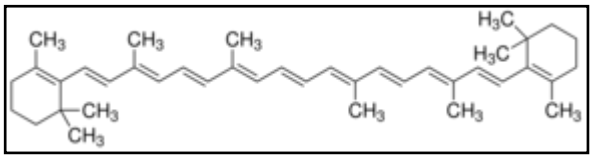

Figura6: ß-caroteno

•**(±)- α-tocoferol (vitamina E o DL-all-rac-α-tocoferol)Sigma Aldrich** (líquido viscoso amarrillo (d=0,950 g/ml); Mr($C_{29}H_{50}O_2$)=430,71 g/ml; almacenamiento a 2-8°C)

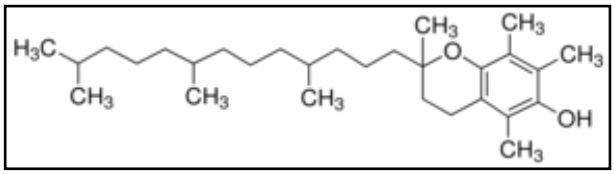

Figura 7: (±)- α-tocoferol

•**Quercetina dihidratada Sigma Aldrich** (sólido en polvo amarillo claro; Mr($C_{15}H_{10}O_7.2H_2O$)=338,27 g/ml; almacenamiento a temperatura ambiente 15-30°C)

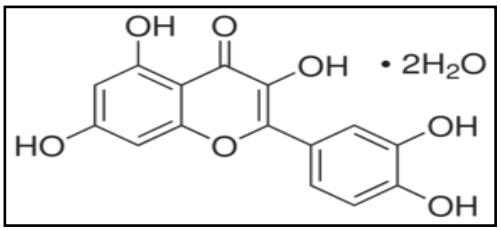

Figura 8: Quercetina dihidratada

•**Glutamato sódico monobásico (sal sódica del L-ácido pentanoico) Panreac (**sólido cristalino incoloro; Mr(C5H8NNaO4.H2O)=187,13 g/mol; almacenamiento a temperatura ambiente)

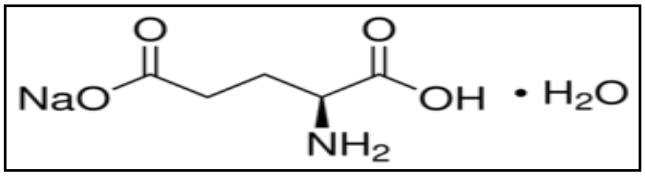

Figura 9: Glutamato sódico monobásico

Se han preparado disoluciones patrones de quercetina dihidratada, ß-caroteno, α-tocoferol y glutamato monosódico en metanol de concentración 1.10^{-4} M para la quercetina y 1.10^{-3}M para las restantes. El resto de disoluciones a preparar se lleva a cabo por dilución de los patrones. El glutamato sódico monobásico también se caracteriza en estado sólido.

Todas las disoluciones se han de mantener protegidas de la luz dado el carácter fotosensible y antioxidante de los mismos. Los compuestos carotenoides son intrínsecamente inestables al tratarse de compuestos altamente insaturados y se degrada como consecuencia de diversos factores [56]. En su entorno natural son inestables; sin embargo, extraídos en disolventes orgánicos se vuelven más lábiles y se pueden degradar por medio de procesos oxidativos y producirse reacciones de decoloración, estos cambios afectan a la absorción de radiación e incluso a la fluorescencia intrínseca de los compuestos. Por otro lado, aunque el tomate es un alimento rico en tocoferoles y vitamina C éstos compuestos contribuyen a la conservación del ß-caroteno, lo que justifica la autoxidación por la acción del oxígeno molecular al inactivar formas reactivas como el oxígeno singlete. Por lo tanto, las disoluciones deben ser protegidas de la luz y conservadas en refrigerador.

Son compuestos liposolubles, es decir, poco solubles o insolubles en agua (0,0006 g/l (25°C), 0,5 mg/l para ß-caroteno y α-tocoferol, respectivamente) y solubles en disolventes orgánicos.

- **Metanol Baker Analyzed HPLC, JT Baker**

- **Muestras de tomate** de distinta variedad (Liso o Ensalada, Pera, Rama, Cherry tipo pera y Kumato) y madurez.

2.1.2 Otros

- Matraces aforados (10, 25 ml)
- Vaso de precipitados 100 ml
- Frascos de vidrio
- Filtros de jeringa certificados Olimpeak by Teknokroma con membrana de difluoruro de polivinildeno (PDVF) y carcasa de polipropileno (PP) con tamaño de poro de 0,45 µm, 25 mm Ø pk/100
- Pipeta MLB 10 ml (±0,04)
- Pipetas automáticas de volumen variable LabMATE 20-200 µl y 100-1000µl.
- Balanza analítica Mettler Toledo AE 163
- Ultrasons Medi-II J.P Selecta

2.2. Instrumentación

La instrumentación empleada para las distintas medidas analíticas se encuentra distribuida entre el laboratorio de investigación del Grupo Analítico de Reconocimiento Molecular de la Facultad de Química y la Unidad de Espectroscopia Electrónica, Fotoelectrónica, UV-Visible e IR de los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo. Las medidas espectroscópicas se llevaron a cabo en las condiciones de trabajo especificadas en la descripción de los equipos, salvo las particularidades que se indiquen. También se registraron espectros de patrones y espectros promedio para réplicas de tomates independientes.

2.2.1 Espectrómetro NIR-VIS-UV

Es un espectrómetro UV-Vis-NIR de doble haz que consta de una lámpara de wolframio-halógeno y deuterio como fuente de excitación, un sistema óptico de reflectancia recubierto de sílice con un monocromador de red de difracción holográfica con 1400 lineas/mm en el VIS-UV. Alternativamente un sistema “chopper” hace llegar el haz de referencia y el haz de muestra alternativamente a un Fotomultiplicador R6872 de alta energía en todo el rango de longitudes de onda del UV/VIS. Los espectros se registran a una velocidad de barrido de 750 nm/min en el rango espectral de 280-600 nm con una anchura de rendija de 1,50 nm y un tiempo de integración de 0,04 s.

***Figura 10**: Espectrómetro Perkin Elmer Lambda 900 UV/VIS/NIR*

2.2.2 Espectrómetro FTIR-ATR

Consiste en un FTIR con un accesorio de ATR Varian 670-IR acoplado horizontalmente. Está formado por un cristal de diamante con un canal poco profundo sobre el cual se dispone la muestra en contacto con el cristal. El cristal es más robusto y resistente que otros materiales y prácticamente inerte. Con este equipo se ha llevado a cabo el análisis de piel de tomate. Aunque también es posible el análisis de muestras líquidas, hay que tener precauciones especiales en el caso de que sean acuosas, dado que el alto contenido en agua interfiere en los espectros, como es el caso de estos frutos. La necesidad de muestra es limitada, basta con cubrir la pequeña superficie del cristal de diamante, con un área aproximadamente de 1,5 mm^2. Para la medida de la absorbancia se han promediado 16 espectros con una resolución de 8 cm-1 en el rango espectral 4000-600 nm. Previamente se realiza un blanco tomando el aire como referencia.

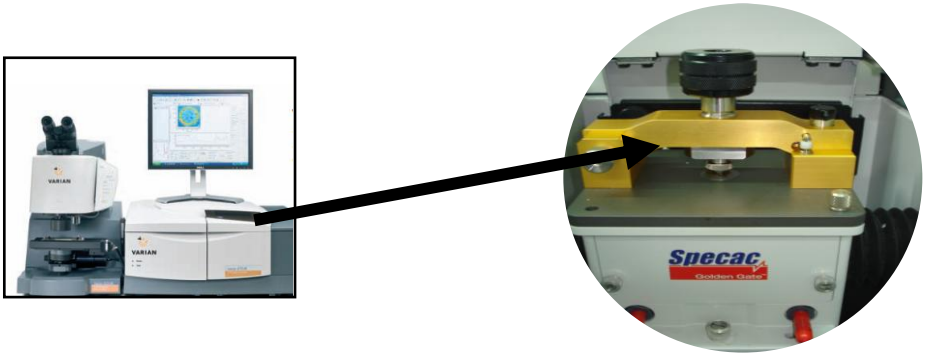

Figura 11: *Espectrómetro FT-IR acoplado a un microscopio con sistema de formación de imágenes (Varian 620-IR y Varian 670-IR) y un accesorio de ATR (mostrado en la ampliación)*

2.2.3 Espectrofotómetro de fluorescencia

Figura 12*: Espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse*

El espectrofotómetro Varian Cary Eclipse que consta de una lámpara de arco de xenón y un detector constituido por un tubo fotomultiplicador sensible al rojo (hasta 900 nm). Permite trabajar con alta sensibilidad y relación señal/ruido en distintos modos de operación: fluorescencia, fosforescencia, quimi/biolumniscencia y fluorescencia resuelta en el tiempo. Sin embargo, para el presente trabajo se opera en modo fluorescencia, concretamente en modo sincrónico. Los parámetros de operación se indican para caso particular.

2.1.4. Espectrómetro (NIR)-Raman

Deltanu Advantage NIR (Figura 13) es un espectrómetro Raman (Figura 13) es un espectrómetro Raman equipado con un láser de diodos en serie (785 nm; hasta 60 mW) como fuente de excitación, con un detector de germanio enfriado con N2 líquido. Este equipo está adaptado para el análisis de muestras líquidas. En la ampliación de la figura 13 se muestra el soporte para celdas de 8 mm de diámetro interno. Los espectros Raman se han registrado en el rango espectral 200-2000 nm promediando tres barridos con un tiempo de integración de 30 segundos cada uno.

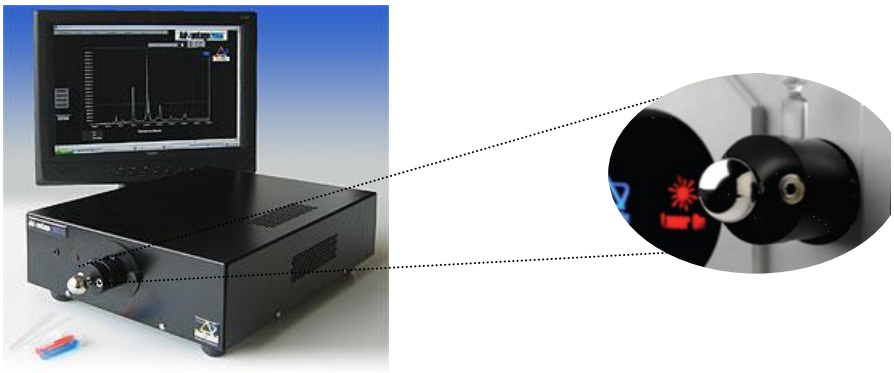

Figura 13: *Espectrómetro FT-Raman Deltanu Advantage NIR con una ampliación del compartimento de celda(Φ=8 mm).*

2.3 Preparación de muestra

De acuerdo con las metodologías analíticas empleadas para abordar el análisis de la muestra, . El tratamiento de la muestra se realiza según el procedimiento descrito por A.Lai et al., 2005 [21] con ligeras modificaciones.

2.3.1 Preparación de pieles de tomate

- Lavado abundante de la pieza de fruta con agua del grifo seguido de un último lavado con agua destilada.

- Con un papel impregnado en metanol se limpia la superficie.

- Se deja secar al aire hasta que se evapore el metanol. Se cubre con papel de aluminio hasta su uso posterior.

- Muestreo aleatorio en distintos puntos de la piel del tomate dada su alta heterogenidad. El volumen de muestra de piel extraída es de aproximadamente 1 cm x 1 cm x 1 mm de espesor.

2.3.2 Preparación de extractos de tomate

-Se toma una sección del tomate (aproximadamente 0.05 g) de modo que abarque la piel y la primera capa bajo el epicarpo.

-Se añaden 10 ml de metanol, se cubre con parafilm y se esperan 2 minutos.

-Se homogeniza por ultrasonidos durante 10 min obteniéndose un extracto amarillento.

Finalmente se filtra con un filtro de jeringa 0,45 µm.

El proceso se realiza por triplicado y para 3 tomates por variedad. Se muestrearon los siguientes puntos: parte superior en una zona próxima del pedúnculo del fruto, la base y parte central del mismo.

Los extractos, al igual que los patrones, se protegen de la luz conservándolos en el refrigerador en frascos ámbar o en su defecto recubiertos con papel de aluminio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Visualmente se pueden establecer claras diferencias entre variedades del fruto de acuerdo a la morfología del fruto. Atendiendo al color se clasifican en dos grupos: tomates con tonalidad roja (Ensalada, Pera, Rama y Cherry) y verde oscuro (Kumato). La forma característica de cada uno de ellos permite clasificar los tomates rojos, que por sí mismo no son distinguibles a través de esa cualidad, en: redondos (Ensalada o Liso y Rama) y oblongos o alargados (Pera y Cherry). Por otro lado, la variedad Pera es de mayor calibre que la variedad Cherry. Sin embargo, el calibre no es suficiente para diferenciar las variedades Cherry, Ensalada y Rama.

Figura 14*:* Imágenes de variedades maduras de tomate (orden de arriba abajo y de izquierda a derecha): Ensalada, Rama, Pera, Cherry y Kumato

Los distintos tomates de ensalada de madurez variable se pueden clasificar de acuerdo a los criterios de la USDA que permite establecer tres grupos diferenciados. Por un lado, se distinguen tomates verdes y tomates maduros dado que la mayor parte de la superficie es verde o roja. Por otro lado, los tomates restantes, que presentan madurez intermedia, no son fácilmente distinguibles debido a la limitaciones en la percepción visual de la coloración de la superficie. En la segunda imagen de la figura 15, el fruto aún presenta grandes zonas con coloración verde. En las tres fotografías siguientes van adoptando una coloración amarilla-anaranjada, cuya extensión en la superficie tiende a disminuir hasta que el fruto es totalmente rojo.

Figura 15: Imágenes de tomates variedad ensalada con diferente grado de madurez

Teniendo en cuenta las limitaciones en la percepción sensorial de estos atributos organolépticos hay que recurrir a técnicas físico-químicas, complementadas en algunos casos con métodos derivativos y tratamientos quimiométricos, para la identificación de variedades y para plantear un adecuado sistema de clasificación en relación al grado de madurez de los tomates. Concretamente se han empleado cuatro técnicas espectroscópicas moleculares (VIS-UV, FTIR-ATR, FTIR-Raman y Fluorescencia Molecular) y se ha comparado la viabilidad de cada una para la resolución del problema analítico en cuestión a través de los espectros resultantes de la caracterización espectroscópica del fruto.

Basados en la búsqueda bibliográfica se han seleccionado tres analitos modelo, quercetina, α-tocoferol y β-caroteno, para ver si a través de su variabilidad en la muestra, puede ser posible la identificación de la variedad y el grado de madurez del tomate.

3.1. VIS-UV

3.1.1 Caracterización espectroscópica de patrones: analitos modelo

En primer lugar en las figuras 16 a-c, se muestran los espectros VIS-UV de los compuestos puro junto con las características analíticas recogidas en la tabla 13, para su identificación en los extractos. La intensidad relativa es función del coeficiente de absortividad molar y de la concentración de la especie absorbente.

Tabla 13: Resumen de las características analíticas de los patrones a caracterizar.

PIGMENTO	Bandas de absorción (nm)	ε (mol^{-1} l cm^{-1}) (MeOH)	LD (mol/l)
β-Caroteno	450 475	1710±70 (450 nm) 1895 ±82 (475 nm)	1.10^{-6}
Quercetina	373	35120±236	$2,5.10^{-6}$
α-Tocoferol	290	2848±19	1.10^{-6}

La quercetina, un polifenol, al igual que la mayoría de los flavonoides exhiben al menos dos bandas: banda I (240-280 nm) y banda II (300-400 nm). En este caso, el patrón de quercetina sólo manifiesta la banda II (373 nm) porque la banda I se encuentra enmascarada por la banda del disolvente (ver figura 16c)

Generalmente el espectro UV-VIS de compuestos polifenólicos se atribuye a transiciones electrónicas entre orbitales moleculares tipo Π que están más o menos deslocalizados por el esqueleto molecular.

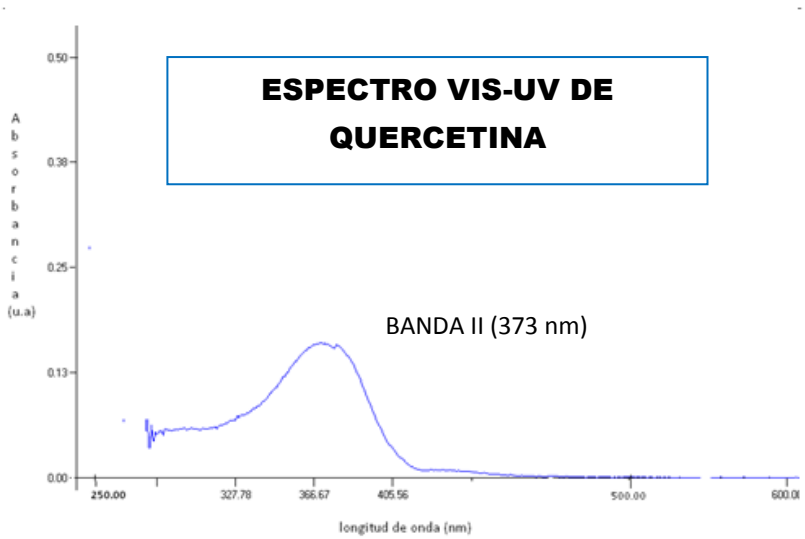

Figura 16a: Espectro UV de una disolución metanólica de quercetina 1.10^{-5} M

El espectro Vis-UV se compone de dos bandas [57]. La banda de absorción a alta longitudes de odna, o de baja energía (banda II), se debe a los anillos B y C de la molécula responsables de la transición HOMO → LUMO desde el estado singlete más bajo S1. Los orbitales HOMO y LUMO están altamente deslocalizados, cuya conjugación explica el color amarillo del compuesto. La banda de absorción de baja energía (banda I) se atribuye al anillo A y se debe a la transición HOMO→ LUMO + 1 (Figura 17).

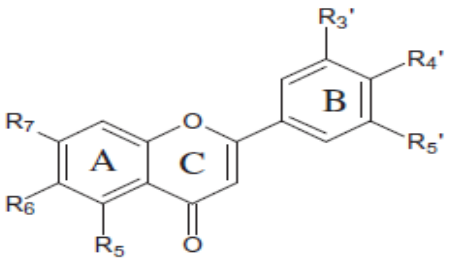

***Figura 17**:* Estructura tipo de una flavona donde se muestran los anillos A, B, C responsables de las bandas de absorción

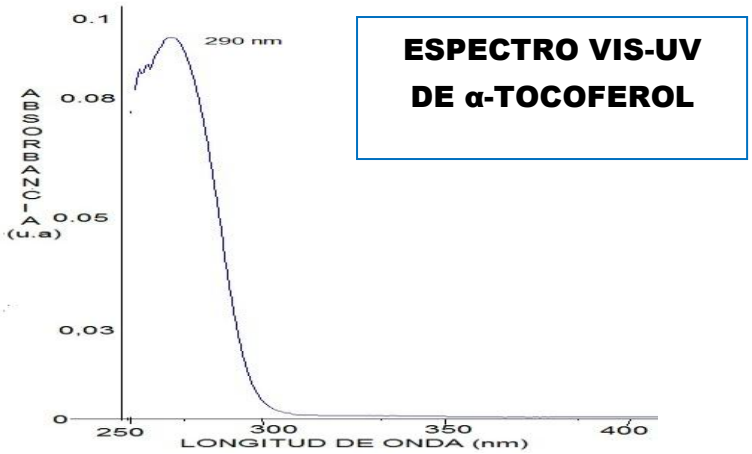

Figura 16 b:Espectro UV de la disolución metanólica de α-tocoferol 1.10^{-5}M

El α-tocoferol a pesar de ser un pigmento con un coeficiente de absortividad molar alto (ε=35120 mol^{-1} l cm^{-1}) absorbe en la región ultravioleta y su valor analítico es limitado debido a que en esta región las muestras biológicas presentan un fondo muy intenso. Atendiendo al perfil del espectro se observa una única banda de absorción a 293 nm debida a transiciones σ-n*.

El patrón de caroteno presenta dos bandas de absorción a 450 y 475 nm características del todo-trans-β-caroteno, además de otras bandas a 420 y 444 nm que no se encuentran perfectamente resueltas. Estas bandas permiten una identificación inequívoa respecto al isómero cis cuyo espectro presentaría una banda adicional [58]. La absorción del β-caroteno es debida a transiciones Π-Π* del sistema altamente conjugado del esqueleto hidrocarbonado (ver figura 6)

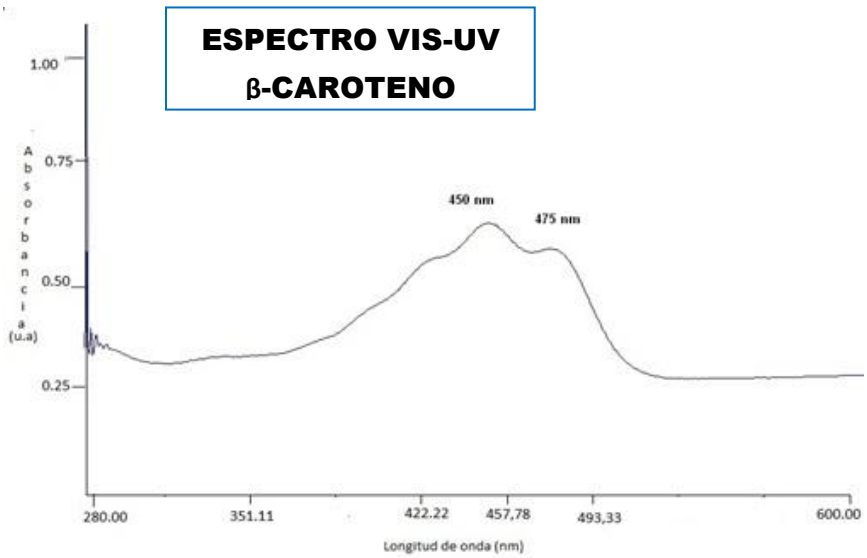

Figura 16c*:* Espectro Visible de disolución patrón de β-caroteno 1.10-5M

3.1.2 Caracterizacion espectroscópica de los extractos metanólicos

Para el extracto metanólico de la piel de las distintas variedades de tomate se han obtenido los espectros Vis-UV promediados de las distintas réplicas muestreadas que se muestran en la figura 18.

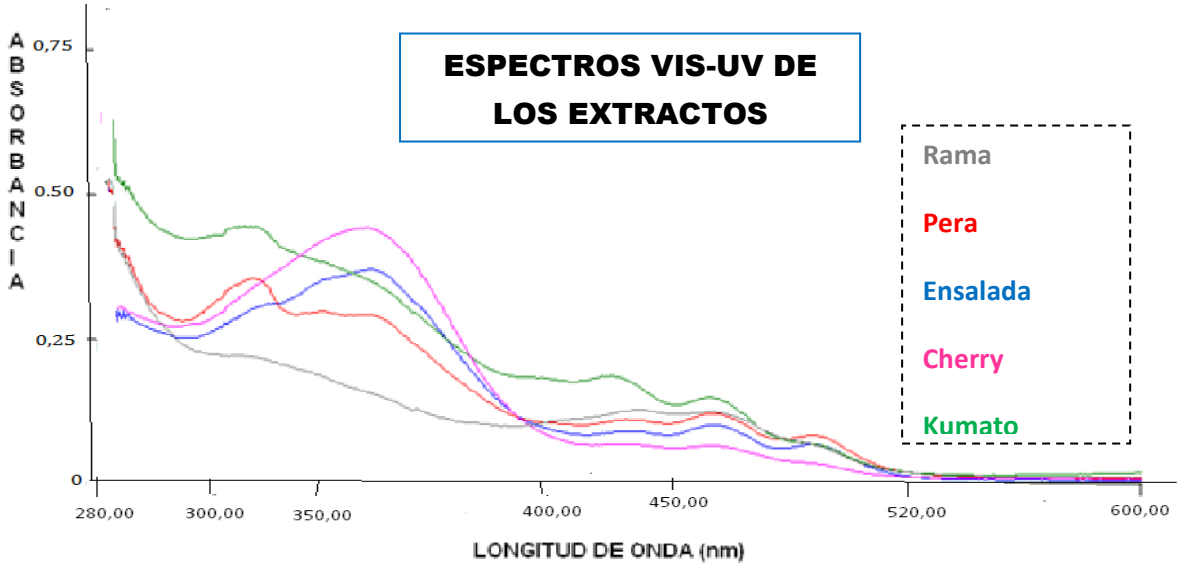

Figura 18: Espectro Vis-UV de cada variedad

En los espectros obtenidos para las distintas variedades se observa que las bandas de absorción de los analito modelo seleccionados, carotenoides, tocoferoles, polifenoles y otros pigmentos del tomate están fuertemente solapadas en la región VIS-UV, ya que se trata de una mezcla compleja y existen interacciones entre las especies absorbentes. En los espectros se observan 4 bandas de absorción a 363, 437, 464 y 501 nm. La banda de absorción a 363 nm no se corresponde con ninguna de los compuestos de interés, ni siquier la quercetina (λ=373 nm) ya que debido a la complejidad de la muestra puede tratarse de otro compuesto presente en el tomate. Del mismo modo el espectro no muestra evidencias suficientes para identificar la vitamina D, ya que en los espectros de los extractos no se observan las correspondientes bandas de absorción.

En la región del visible están presentes y absorben todo tipo de compuestos carotenoides e incluso clorofilas, por ejemplo, el licopeno, los isómeros α-caroteno y γ-caroteno, luteína, etc. Debido al mayor contenido de licopeno en la piel que de β-caroteno no es posible identificar el compuesto de interés.

Por tanto, la espectroscopía de absorción Vis-UV dada su baja sensibilidad y resolución es inadecuada para la caracterización espectral como consecuencia de que el tomate es un muestra muy compleja en la que están presentes numerosas especies absorbentes que contribuyen al solapamiento con las bandas de absorción de los analitos de interés. Permite una identificación semicuantitativa de gurpos de compuestos pero no el análisis cuantitativo de un compuesto en particular. Para resolver esta mezcla compleja se requieren otras técnicas, lo cual nos lleva al empleo de la espectroscopía de fluorescencia, ya que a diferencia del UV-Vis presenta una excitación selectiva, además de FTIR-ATR y Espectroscopía Raman.

3.2. FLUORESCENCIA MOLECULAR

Para la resolución del extracto por fluorescencia se hace uso de la espectroscopía de fluorescencia de excitación sincrónica [59,60]. Consiste en la aplicación de una velocidad de barrido constante para ambos monocromadores cuya longitud de onda de excitación y emisión se varia simultáneamente de manera que $\Delta\lambda=\lambda em-\lambda em$ se mantiene constante.

A diferencia de la fluorescencia convencional ,la utilización de técnicas sincrónicas [59] permite obtener bandas espectrales más estrechas, simplificar el espectro de emisión al incrementar selectivamente la intensidad de los picos más intensos empleando un $\Delta\lambda$ adecuado, minimizar distorsiones espectrales debidas a interacciones intermoleculares o procesos de desactivación estático o dinámico y mejorar la resolución. Se caracteriza por su simplicidad operativa al poder realizarse un barrido simultáneo de excitación y emisión. Para una mezcla compleja con más de 4 o 5 compuestos, como es el caso del tomate, la identificación cualitativa de los componentes individuales no es sencilla mediante el empleo de espectros sincrónicos ya que las bandas se pueden presentar solapadas. La aplicación de herramientas matemáticas como es la derivada segunda del espectro sincrónico, obtenida por diferenciación electrónica directa, proporciona mayor selectividad, sensibilidad, rapidez y sobre todo, una resolución superior a la obtenida a través el sincrónico directo. De esta manera se obtiene la huella dactilar de muestras complejas.

3.2.1.Caracterización espectroscópica de los patrones: analitos modelo

3.2.1.1 FLUORESCENCIA "CONVENCIONAL"

En la figura 19 se muestran los espectros de fluorescencia de los patrones, donde se asignan las longitudes de onda de los máximos de las bandas de fluorescencia, que se resumen en la tabla 14, de los analitos modelo estudiados para establecer el grado de madurez. Tanto el α-tocoferol como la quercetina presentan bandas de emisión definidas en el visible y en el ultravioleta cercano, respectivamente. El espectro de emisión de β-caroteno está constituido por una ancha banda entre 420-580 nm (λex= 355 nm), que se debe a que el β-caroteno es una molécula altamente conjugada (11 dobles enlaces conjugados) lo que da lugar a transiciones electrónicas, mayoritariamente $\pi \rightarrow \pi^*$, de diferente energía contribuyendo de este modo a un ensanchamiento de la banda de fluorescencia de emisión.

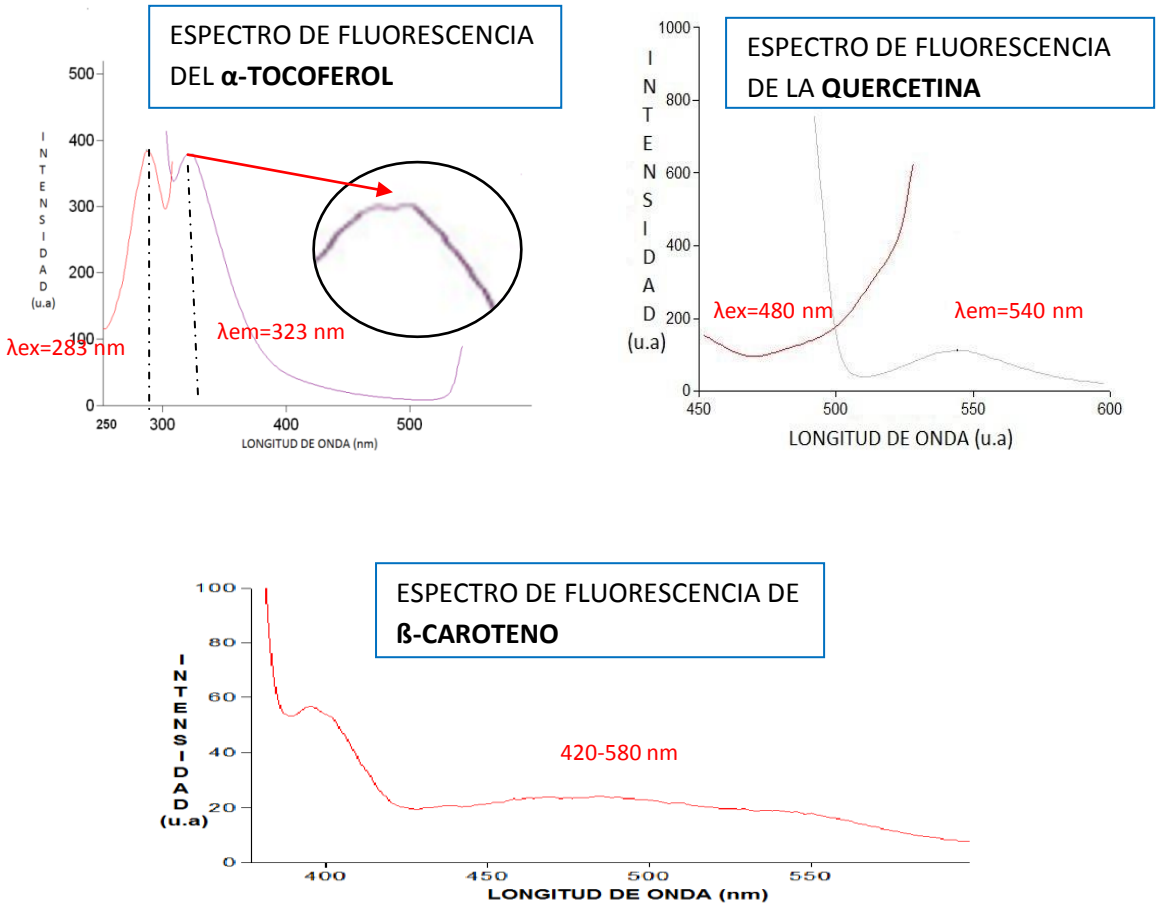

Figura 19: *Espectros excitación y emisión de fluorescencia molecular convencional de disoluciones de a) α-tocoferol, b)quercetina y c) ß-caroteno de concentración 1.10^{-7}, 1.10^{-5} y 1.10-6 M, respectivamente*

Tabla 14: Bandas de fluorescencia de los pigmentos utilizados para el análisis espectrofluorimétrico

PIGMENTO	BANDA DE EXCITACIÓN (λexc)	BANDA DE EMISIÓN (λem)	
α-Tocoferol	283 nm	323 nm	
β-Caroteno	355 nm	420-580 nm	Banda ancha
Quercetina	480 nm	542 nm	

3.2.1.1 FLUORESCENCIA SINCRÓNICA

El espectro sincrónico del β-caroteno presenta tres bandas definidas a 297, 399 y 527 nm; la primera de ellas es bastante intensa. Sin embargo, no es sencilla la identificación cualitativa de la quercetina y el α-tocoferol (Figura 20) porque los espectros sincrónicos presentan mala resolución con una baja relación señal/ruido.

Los datos espectrales de fluorescencia sincrónica para cada patrón se describen en la tabla 15, donde se recogen las bandas sincrónicas con mayor resolución y mejor relación señal/ruido de cada compuesto.

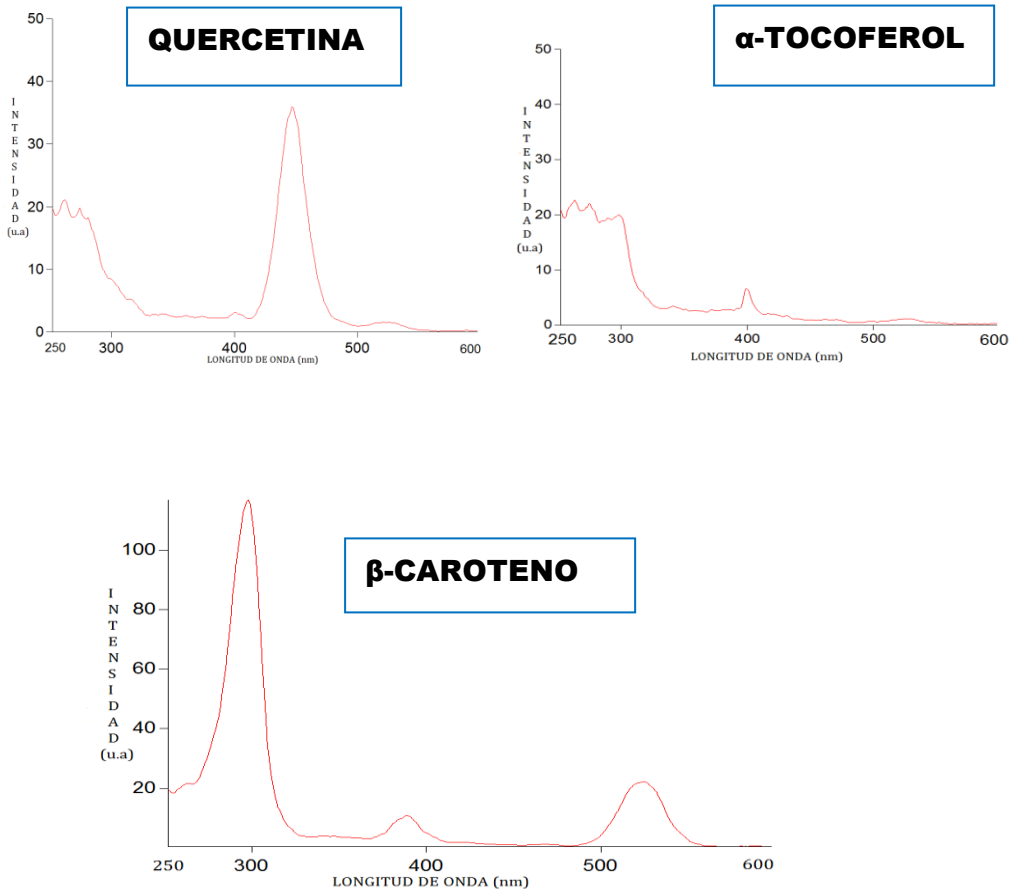

Figura 20*:* Espectros de fluorescencia sincrónica de disoluciones de α-tocoferol, quercetina y ß-caroteno de concentración 1.10^{-5}, 1.10^{-5} y 1.10^{-6} M, respectivamente. Barrido=250-600 nm; Δλ=20 nm; anchura de rendijas (emisión/excitación)= 10 nm

Tabla 15: Bandas de fluorescencia sincrónica de los pigmentos utilizados para el análisis espectrofluorimétrico.

	Condiciones: 250-600 nm; Δλ=20nm; Anchura de rendijas de emisión y excitación=10 nm			
PIGMENTO	**BANDAS SINCRÓNICAS (nm)**			**Resolución**
α-Tocoferol	399			Baja
Quercetina	446			Baja
ß-Caroteno	297	388	527	Alta

3.2.2.Caracterización espectroscópica de los extractos metanólicos

Considerando que la sensibilidad de fluorescencia depende de la concentración, y de la eficiencia cuántica del proceso, los analitos modelo propuestos y caracterizados por

fluorescencia convencional no se pueden identificar y cuantificar en los extractos. Por consiguiente, experimentalmente se ha comprobado que la fluorescencia convencional no tiene utilidad analítica en la caracterización de los extractos de piel de tomate. Por tanto, haciendo uso de la técnica de fluorescencia sincrónica se miden los extractos preparados en 3.3.B. Previamente hay que tener en cuenta que la intensidad de fluorescencia sincrónica se incrementa al aumentar Δλ y en el mismo sentido empeora la resolución. Para la medida de los espectros sincrónicos en primer lugar hay que seleccionar el valor óptimo de Δλ buscando un compromiso entre resolución e intensidad de fluorescencia entre todas las especies estudiadas. La selección de Δλ se ilustra a través de los espectros sincrónicos obtenidos al aplicar un barrido de longitudes de onda entre 250 y 600 nm sobre un extracto de tomate cherry utilizando rendijas de excitación y emisión de una anchura de 10 nm que se ejemplifica en la figura 21. Para diferencias de longitud de onda de excitación y emisión entre 10 y 20 nm se obtiene una buena resolución para la variedad cherry llegándose a observar dos bandas de emisión que no son capaces de resolverse entre sí para Δλ superiores de 20 nm. Sin embargo, cuando Δλ=10 nm también se observa ruido espectral por encima de 330 nm. Para el resto de variedades la resolución es menor; de hecho también incluso cuando se emplea un Δλ=20 nm tal como muestra los espectros sincrónicos comparativos de la figura. A pesar de ello las medidas de fluorescencia sincrónica para cada una de las variedades se realizan con una diferencia de longitud de onda de emisión y excitación única de 20 nm tras haberse buscado una situación de compromiso entre resolución y sensibilidad para todas las variedades.

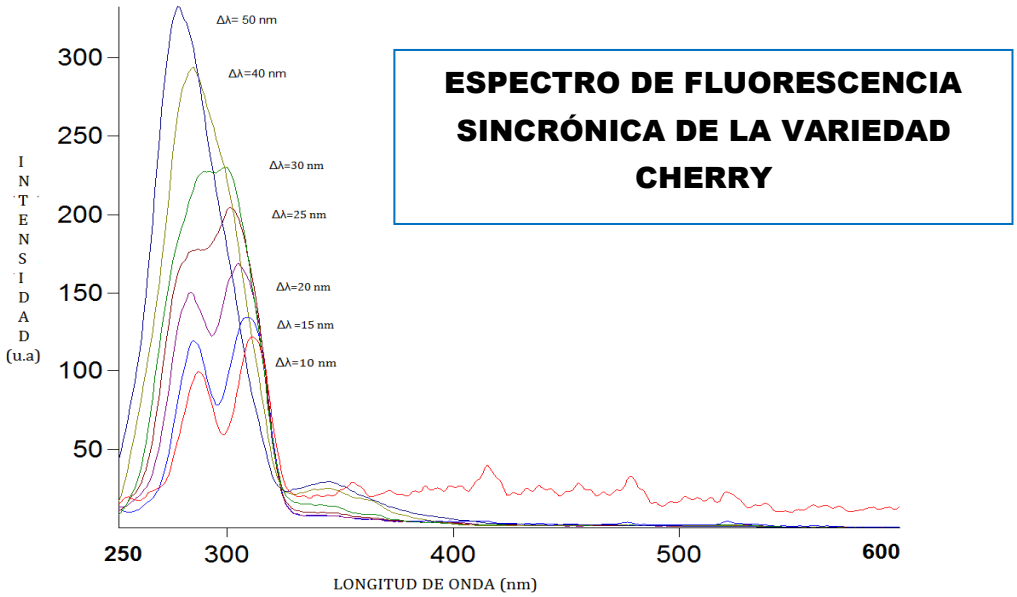

Figura 21 : Espectros de fluorescencia sincrónica de tomates cherry a distintos valores de Δλ

Bajo las condiciones de trabajo previamente establecidas se obtuvieron los espectros de fluorescencia sincrónica normalizados que se muestran en la figura 22. Todos ellos presentan 2 bandas sincrónicas a 293 nm y 525 nm, exceptuando la variedad cherry en donde está manifiesta una tercera banda a 301 nm, destacando así la mayor resolución para esta clase de tomates en las condiciones de trabajo establecidas. Esta banda sincrónica extra que no aparece resuelta en las variedades restantes de lugar a una primera categorización, es decir, a través del espectro sincrónico normalizado se puede diferenciar los tomates cherry.

Como se ha visto durante la caracterización de los patrones, la fluorescencia sincrónica tampoco mejora la resolución del espectro debido a la complejidad de la muestra, por lo que las bandas sincrónicas de los pigmentos tampoco pueden ser identificados en los espectros sincrónicos de los extractos.

Estas observaciones justifican la necesidad de combinar la fluorescencia sincrónica con técnicas de segunda derivada con el objeto de mejorar las características espectrales obteniendo así la huella dactilar de los extractos, además de verificar si es útil para resolver mezclas complejas para la identifciación de los analitos caracterizados y la distinción entre extractos.

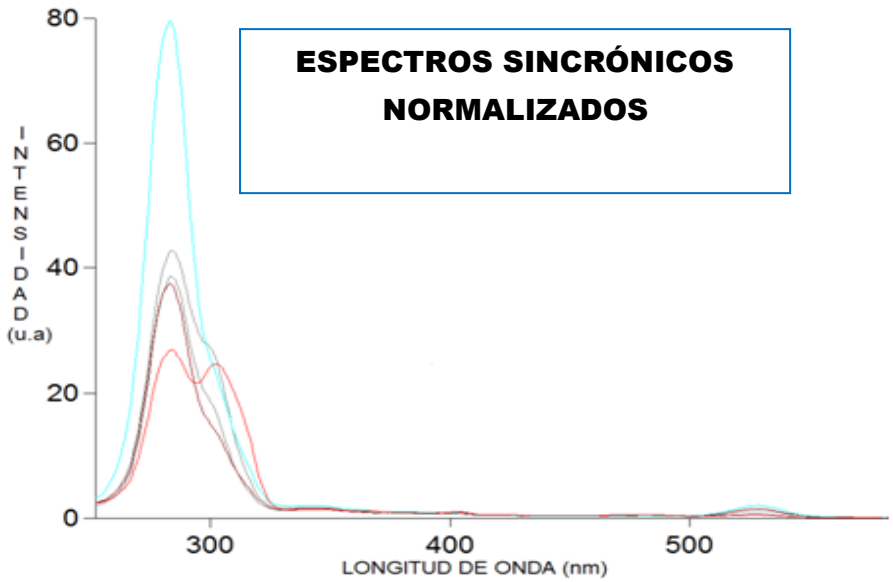

Figura 18: Comparativa de los espectros promedio de fluorescencia sincrónica directa normalizados de los extractos (Barrido=250-600 nm; Δλ=20 nm; Anchura rendijas (excitación/emisión)= 10 nm

3.3. FTIR-ATR

Como primera aproximación al estudio de los espectros FTIR-ATR se realizó la caraterización espectroscópica de los analitos modelo en estado sólido y disolución. Para el caso de la quercetina se utilizó una disolución acuosa de 1.10-5M y quercetina pura, el producto comercial, que se depositaron sobre el cristal de diamante (Figura 22). Espectro del patrón en disolución carece de interés analítico ya que las bandas de vibración del compuesto son enmascaradas por las bandas del disolvente, perdiéndose gran parte de la información cualitativa. Por este motivo, en los estudios posteriores la técnica sólo se emplea para la medida de los compuestos puros y las pieles de tomate, no para los extractos.

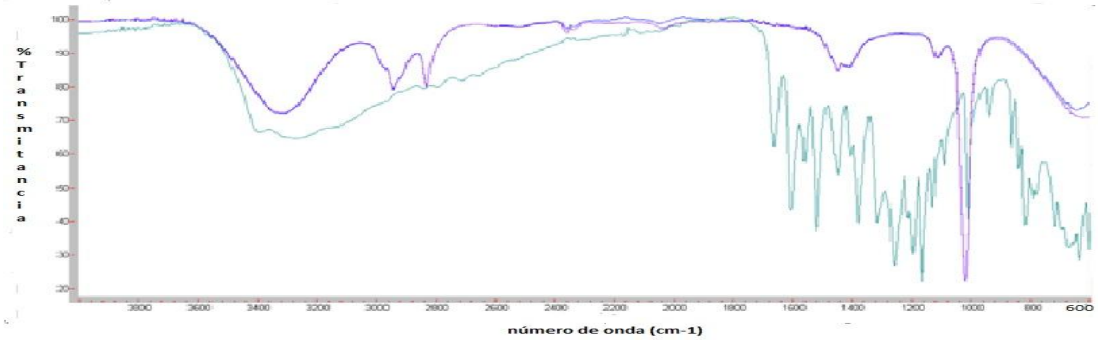

Figura 22: Espectros de infrarrojo comparativos de quercetina pura, en disolución metanólica y metanol

3.3.1 Caracterización espectroscópica de los patrones

En las figuras 23 a-d se pueden observar los espectros de infrarrojo de los distintos analitos modelo en los cuales se han relacionado las distintas bandas con las vibraciones propias de la molécula, conforme a su estructura, datos que se resumen en la tabla

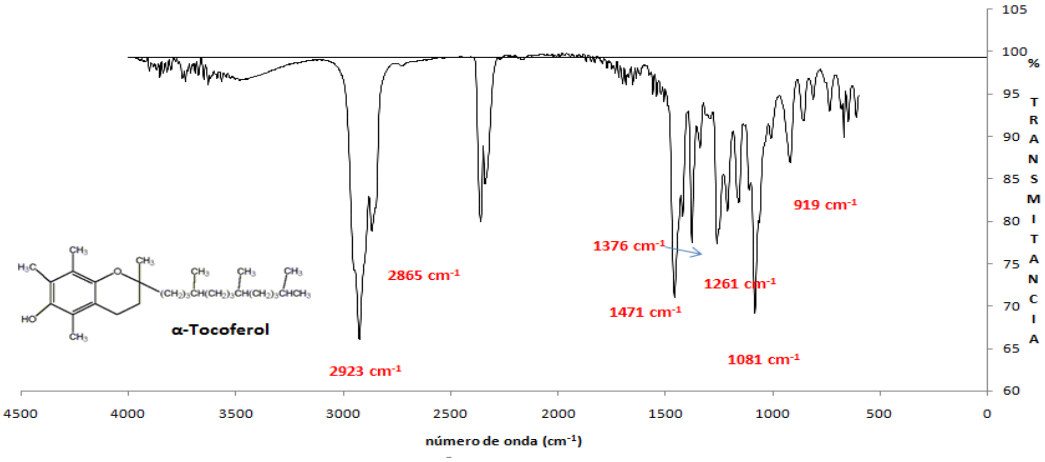

Figura 23a: Espectro infrarrojo del α-tocoferol

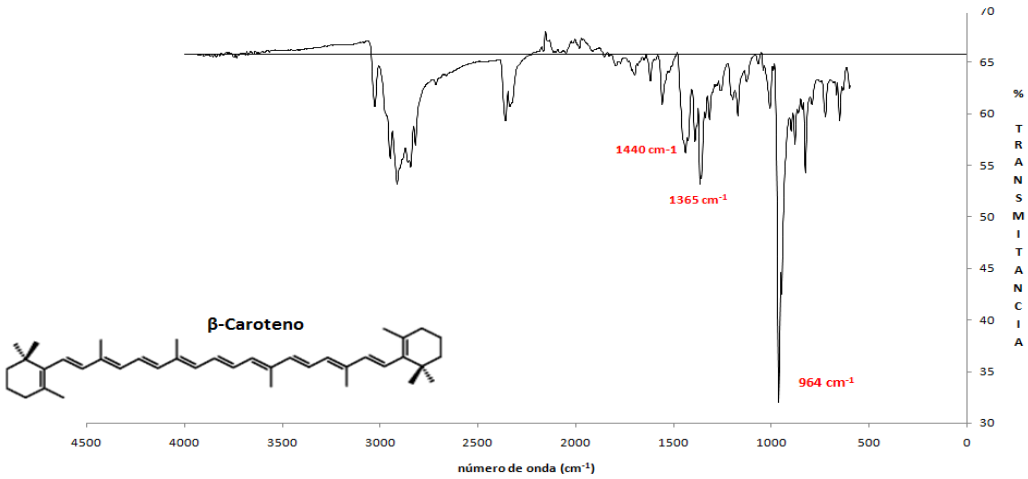

Figura 23b: Espectro infrarrojo del β-caroteno

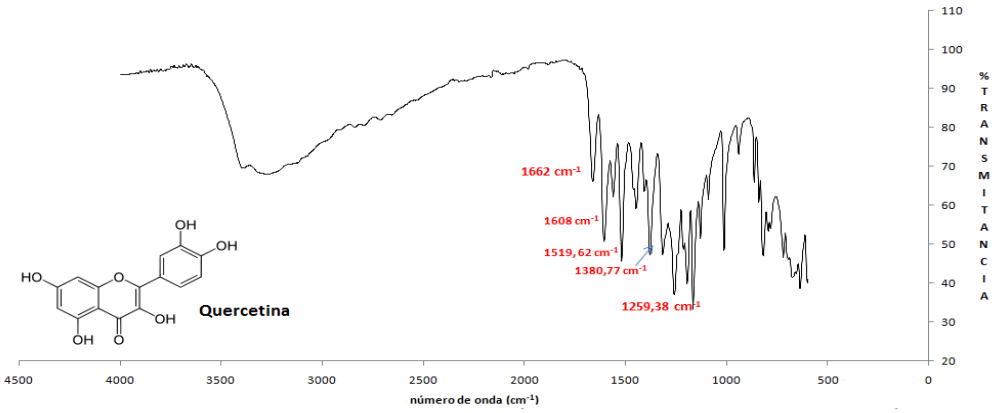

Figura 23c: Espectro infrarrojo de la quercetina

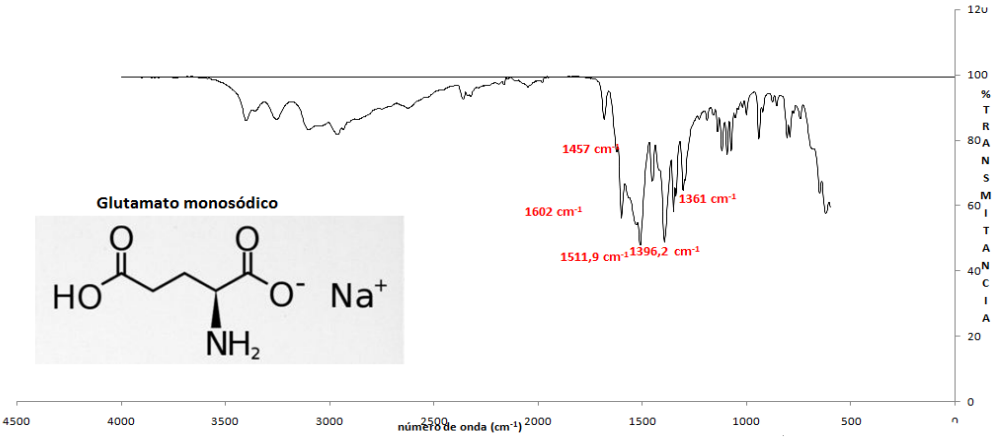

Figura 23d: Espectro infrarrojo del glutamato monosódico (GMS)

Tabla 16: Bandas de vibración características de cada analito modelo

COMPUESTO	PRINCIPALES BANDAS DE VIBRACIÓN
α-Tocoferol	**2923; 2865 cm^{-1}** (Tensión C-H(sp_3) (as; sim CH2)); **1471 cm^{-1}** (Tensión C=C); **1376 cm^{-1}** (Flexión simétrica CH_2); **1083 cm^{-1}** (flexión fenil en el plano); **919 cm^{-1}** (flexión fuera del plano **trans=CH_2**)
β-Caroteno	**1440 cm^{-1} (**flexión simétrica δsim CH_2); **1365 cm^{-1}** (Flexión asimétrica δas CH_2); **964 cm^{-1}** (Vibración "wagging" (RH)-C=C(RH))
Quercetina	**3500-2500 cm^{-1}** (tensión O-H); **1662 cm^{-1}** (Tensión C=O); **1608; 1519 cm^{-1}** (Tensión C=C); **1380 cm^{-1}** (Flexión C-O-C); **1259 cm^{-1}** (Flexión C-O-H)
Glutamato monosódico	**Banda ancha 2000-3000 cm^{-1}** (tensión N-H); **1602 cm^{-1}** (Tensión asimétrica C=O); **1511 cm^{-1}** (flexión NH^{3+}); **1396 cm-1** (Tensión simétrica C=O)

3.3.2. Caracterización espectroscópica de los extractos

En la figura 21 se muestran los espectros infrarrojo comparativos de las pieles de los tomates maduros de las distintas variedades, obtenidos como promedio de cada una de las medidas realizadas para cada variedad. Se muestrean 20 puntos por tomates y 4 tomates por categoría.

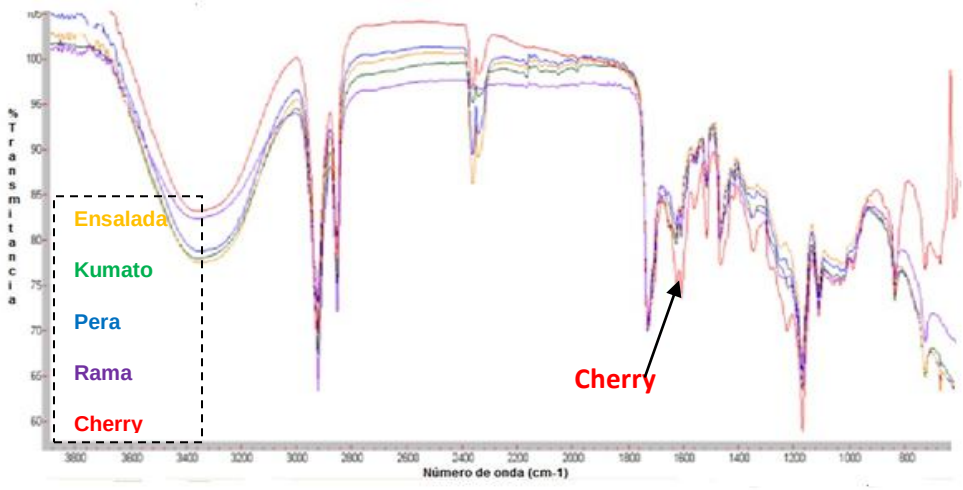

Figura 24: Espectro promedio infrarrojo (expresado en %transmitancia) de cada variedad de tomate (rango espectral: 4000-600 cm^{-1})

La complejidad de la muestra limita el análisis cualitativo. Los espectros infrarrojo (en % de transmitancia) obtenidos son bastante complejos. Están constituidos por numerosas bandas de absorción, muchas de las cuales se corresponden con otros compuestos diferentes de los de interés cuyos patrones se han caracterizado previamente. La influencia del agua en este tipo de frutos también es un factor crítico que junto con la diversidad de compuestos presentes hacen complicada la identificación.

Tampoco existen diferencias aparentes entre los espectros de las cinco variedades que permita clasificarlas, exceptuando los tomates Cherry. El espectro de la variedad Cherry. El espectro de la variedad Cherry presenta características diferentes, especialmente en la región espectral 1600-1200 cm^{-1} donde los picos presentes a 1606, 1623, 1344 y 1219 cm^{-1} tienen un aspecto diferente a los observados en el resto de variedades que podrían ayudar a diferenciarlos. Sin embargo, es necesaria la aplicación de algoritmos matemáticos para la clasificación de los mismos en función de los espectros de ATR de sus pieles.

Los espectros infrarrojo de tomates con diferente grado de maduración también son complejos (Figura 25). Estos espectros se han obtenido por muestreo de 40 puntos por tomate y un tomate por grado de maduración y obteniéndose los espectros en el rango espectral comprendido entre 1300 y 600 cm^{-1}. Este rango espectral se corresponde con la zona de la huella dactilar del extracto que contiene los picos más intensos y es la zona donde absorben los compuestos responsables de la maduración de los tomates. Los espectros no presentan diferencias significativas que permita diferenciar el estado de maduración de los tomates sin ningún tratamiento de datos.

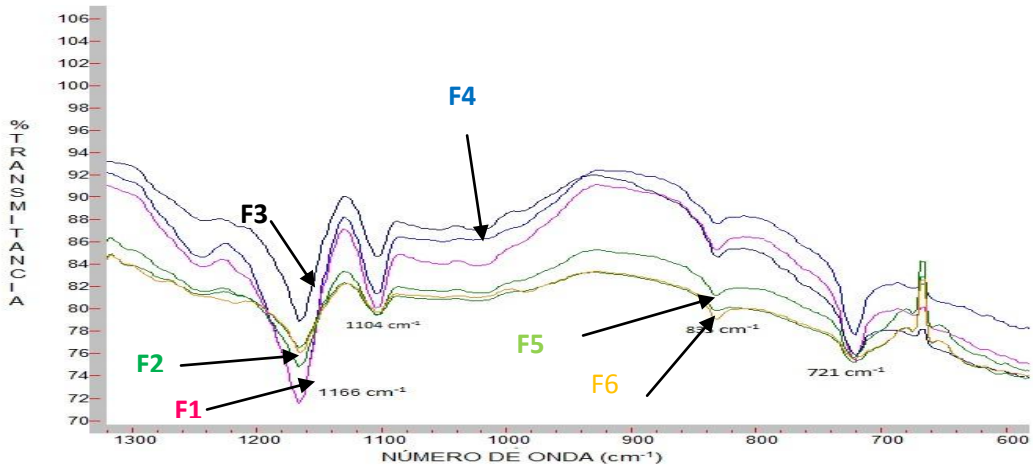

Figura 25: Espectro infrarrojo de tomates de variedad ensalada con distinto grado de madurez de acuerdo a la clasificación USDA (desde F1 hasta F6 en orden creciente de madurez)

3.4. FT-RAMAN

Al igual que ocurre en FTIR-ATR, en disolución no es posible identificar las bandas Raman características de patrones y extractos debido al predominio prácticamente exclusivo de las bandas del metanol (481, 1034, 1370 cm^{-1}); en el caso del agua no produce interferencia alguna debido a la débil dispersión Raman propia del compuesto.

Por tanto las condiciones de trabajo no son las óptimas para la identificación de los espectros Raman de los patrones ya que al igual que en los extractos, las bandas de quercetina y α-tocoferol se encuentran solapadas por las del metanol (Figura 27) mientras que es posible identificar al ß-caroteno a través de su espectro Raman (Figura 26). En él se pueden identificar las bandas de Stoke V_2 a 1154 cm^{-1} y V_3 a 1008 cm^{-1}, así como la banda de vibración asimétrica V_1 a 1513 cm^{-1}

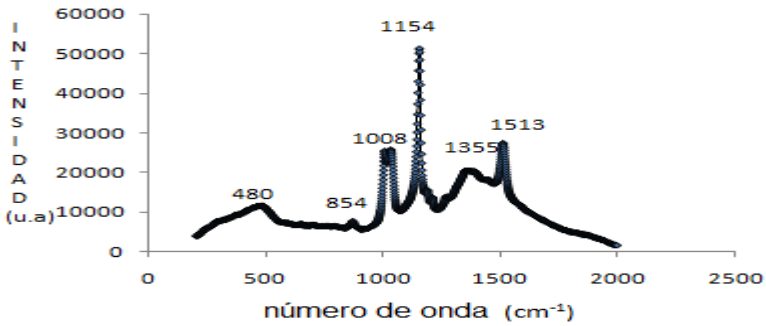

Figura 27: Espectro Raman del β-caroteno

El motivo de la baja sensibilidad de los espectros no es debida a la propia naturaleza de la técnica, ya que la espectroscopía Raman a diferencia de la espectroscopia de reflectancia

atenuada no es una técnica superficial, sino que es consecuencia del tratamiento de muestra y preparación de los patrones.

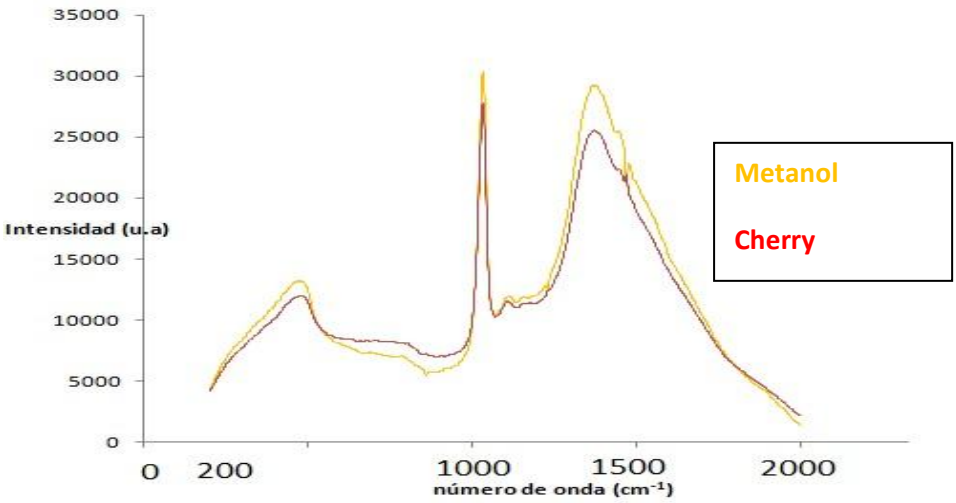

Figura 26: Espectros FTIR-Raman promedio de a) extractos de tomate cherry y b) metanol

Los extractos resultantes del tratamiento de la muestra se encuentran demasiado diluidos; y sus bandas no presentan diferencias significativas con las del espectro del disolvente, tal como se puede observar en la figura 26 en donde se compara el espectro de los extractos Cherry con el del metanol. Se obtienen resultados similares con las variedades restantes. Teniendo en cuenta esta limitación espectral no es posible establecer una discriminación entre variedades de tomates (Figura 28).

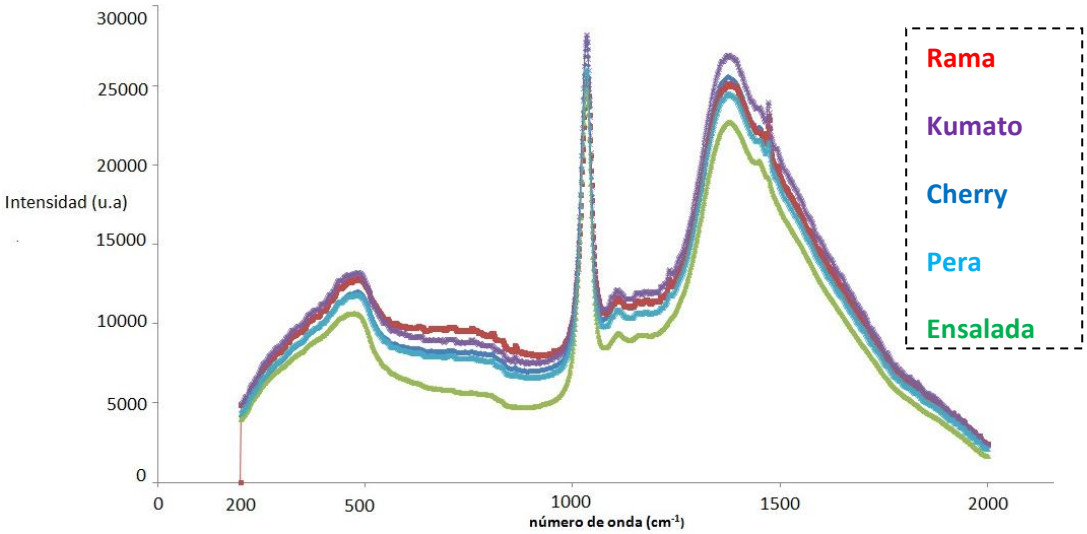

Figura 28: Espectros FTIR-Rama promedio de extractos rama, kumato, cherry, pera y ensalada

Por otro lado, debido a características técnicas del equipo tampoco son posibles medidas en estado sólido. Por tanto, el empleo de la espectroscopia Raman carece de utilidad para los objetivos planteados.

3.5. ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS

Para el análisis de los espectros de fluorescencia sincrónica se han utilizado técnicas derivativas, concretamente la deriva segunda, llevado a cabo con el software propio del equipo.

3.5.1 Fluorescencia sincrónica derivada

Se realiza la derivada segunda sobre cada uno de los espectros promedio normalizados tanto de patrones como de extractos. Se prueban distintos filtros de derivación con un suavizado Savitzky-Golay (N=19), seleccionado como valor de compromiso entre una buena resolución y el menor ruido posible.

Los pigmentos caracterizados (quercetina, ß-caroteno y α-tocoferol) se pueden identifican a través de la derivada segunda de sus espectros sincrónicos (Figura 29); sin embargo, no es posible identificarlos en los extractos. El espectro derivado de los extractos de los tomates para ensalada consta de 5 bandas mientras que el de las variedades restantes presenta seis, de manera que la fluorescencia sincrónica derivada sólo permite diferenciar una clase de tomates (Figura 30).

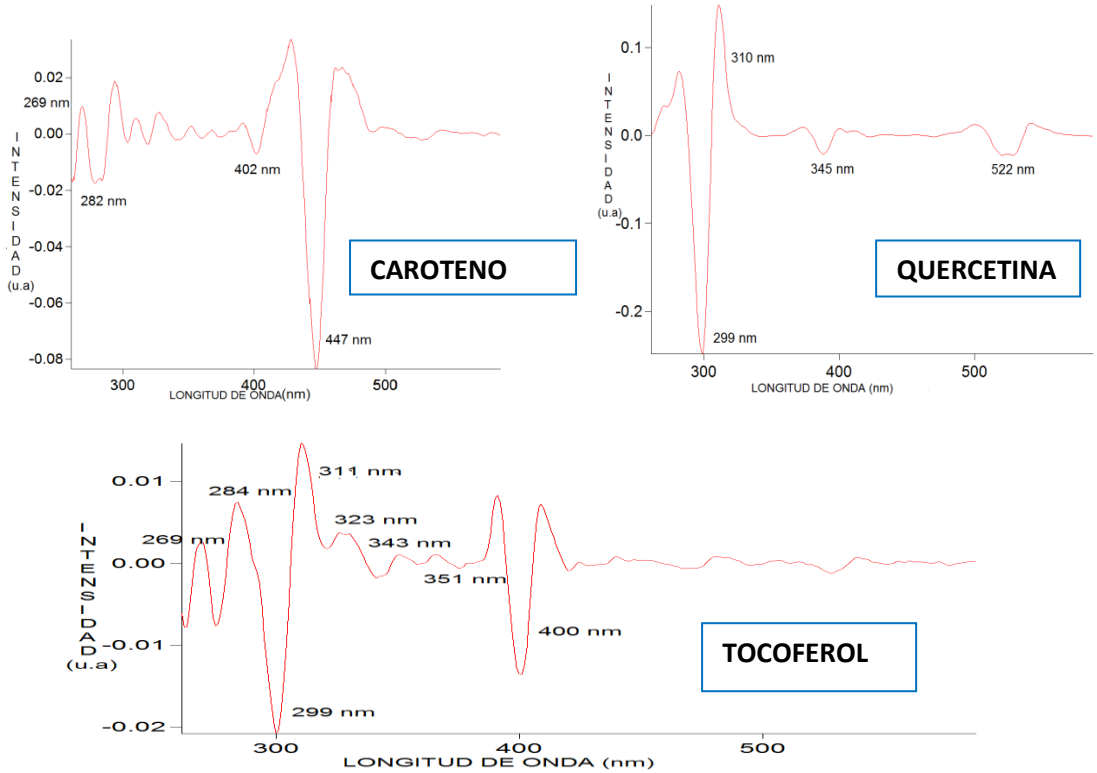

Figura 29: Espectros de fluorescencia sincrónica con derivada segunda de los patrones

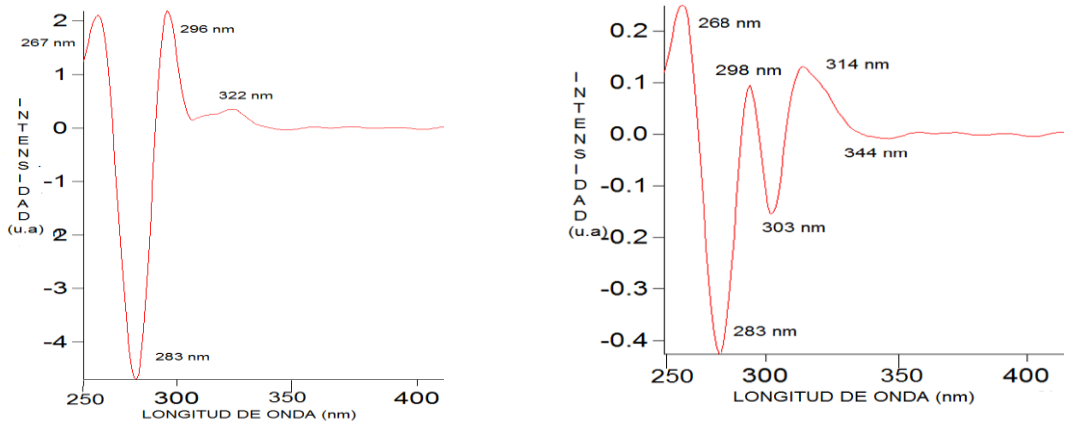

Figura 30: Espectros de fluorescencia sincrónica derivada del tomate ensalada (a) y las cuatro variedades restantes ilustradas a través del espectro del tomate kumato.

3.5.2. Algoritmos de clasificación y reconocimiento de patrones

En las técnicas espectroscópicas no siempre existe una respuesta lineal a los cambios de concentración debido a causas instrumentales, físicas y/o químicas que pueden provocar desplazamientos en la posición de las bandas y/o cambios en la anchura de banda debido a dispersiones a altas densidades ópticas o a variaciones en la línea base producidas por ejemplo por la dispersión física de la radiación por partículas sólidas. Dada la facilidad de registro de la señal multiparamétrica (absorbancia o transmitancia a distintas longitudes de onda) de las técnicas espectroscópicas moleculares y la relativa complejidad de los espectros es posible recurrir a la aplicación de herramientas de tratamiento de datos multivariantes, como Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis Discriminante Lineal (LDA), para la clasificación de los tomates

El análisis de datos se ha llevado a cabo con el programa Statgraphics Centurion XVI, con la aplicación de herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos multivariantes de los espectros infrarrojos (FTIR-ATR) como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y algoritmos de clasificación, concretamente Análisis Discriminante Lineal (LDA). Para el tratamiento quimiométrico de los espectros infrarrojos será necesario describir las bases teóricas que fundamentan los métodos multivariados [54].

<u>Clasificación de tomates de distinta variedad</u>

Teniendo en cuenta el volumen de datos y el tamaño de las matrices derivadas de los espectros de infrarrojo resultantes de los estudios, se ha definido una matriz de datos de partida de menores dimensiones. Esta matriz de datos se ha diseñado de manera que para una misma línea base estable se diseña una plantilla formada por 17 picos (% transmitancia en el infrarrojo para cada longitud de onda) tomados de total de los picos presentes en los espectros promedio de cada clase, tratamiento que se aplica a cada uno de los 399 espectros individuales. A su vez, el conjunto de datos experimentales se divide en un conjunto de entrenamiento formado por 320 muestras y un conjunto de predicción constituido por 79 muestras.

Previa a la aplicación del algoritmo de clasificación se ha de llevar a cabo un análisis exploratorio de la matriz de datos multivariantes (representación de % transmitancia en función de las distintos número de ondas de los espectros obtenidos) que permita una visualización previa al análisis clasificatorio, con el objetivo de evaluar la calidad y consistencia de los datos y verificar si existen semejanzas y diferencias entre muestras.

Un análisis multivariante inicial sobre el conjunto de entrenamiento permite definir que variables siguen una tendencia gaussiana según sesgo y curtosis estandarizados dentro del rango de -2 a +2, de manera que se pueden realizar las siguientes distinciones:

- Variables con curtosis estandarizada dentro del rango esperado: **λ_4=990 cm^{-1}; λ_7=1105 cm^{-1}; λ_8=1165 cm^{-1}; λ_9=1219 cm^{-1}; λ_{10}=1344 cm^{-1}; λ_{16}=2850 cm^{-1}; λ_{17}=2920 cm^{-1}**
- Variables con sesgo estandarizado dentro del rango esperado**: λ_7=1105 cm^{-1}; λ_8=1165 cm^{-1}; λ_{11}=1459 cm^{-1}; λ_{15}=1725 cm^{-1}**
- Variables con sesgo y curtosis estandarizados dentro del rango esperado: **λ_7=1105 cm^{-1}; λ_8=1165 cm^{-1}**

Cada tomate es un punto en el espacio multidimensional, dependiendo del número de variables iniciales, lo cual es imposible de visualizar. Una representación de las variables por grupos a través de gráficos de dispersión de dos variables supondría numerosas combinaciones de variables con un total de 2^{17} gráficos de dispersión y espacios hiperdimensionales complejos. Un análisis exploratorio de cajas y bigotes para cada variable no permite una categorización de las mismas, lo que hace pensar en la existencia de correlaciones entre variables que aportan información redundante. Un diagrama de cajas y bigotes de dos variables seleccionadas aleatoriamente (1604 cm^{-1}, 1344 cm^{-1}) permite justificar este hecho, aparte de observarse datos anómalos que son difíciles de identificar en una matriz de datos de estas dimensiones, lo que lleva a no eliminar ningún dato anómalo dada la dificultad para localizarlo. El reconocimiento de pautas no supervisado por medio del análisis de conglomerados ya sea con todas las variables como con aquellas cuyo sesgo y curtosis estandarizada individual como conjuntos estén dentro del rango esperado tampoco permite establecer claras agrupaciones al no observarse correlaciones o relaciones de similitud entre las 320 observaciones del sistema de entrenamiento.

En definitiva, el volumen de datos dificulta el reconocimiento de pautas y relaciones entre variables, de modo que el análisis exploratorio es útil pero insuficiente para poner de manifiesto y describir en toda su magnitud las estructuras presentes. Mediante un Análisis Factorial o Análisis de Componentes Principales se analiza toda la información existente a partir de las interrelaciones entre variables y se reduce las dimensiones de la matriz de datos, disminuye el número de variables y se extrae aquellas componentes principales en las direcciones de mayor variabilidad con rotación de los ejes (Varimax). El empleo de todas las variables en el análisis PLR sin discriminación alguna de sesgo y curtosis permite extraer cuatro componentes principales, combinaciones lineales de las 17 variables con autovalor superior a 1 que en conjunto explican el 85,936% de la variabilidad de los datos originales, con respecto al análisis factorial llevado a cabo a partir de un menor número de variables de partida discriminando aquellas variables que no sigan una distribución gaussiana de acuerdo a los criterios de sesgo y curtosis estandarizados establecidos (Tabla 17).

Tabla 17: Comparación del número de componentes principales extraídas y el % de varianza acumulada explicada según el número de variables discriminadas en el análisis exploratorio inicial

Nº VARIABLES DE ESCALA	Nº COMPONENTES EXTRAIDOS (con autovalor >1)	% VARIANZA ACUMULADA
Todas las variables	**4**	**85,936%**
Curtosis estandarizada dentro del rango (8 variables)	2	82,699%
Sesgo y curtosis estandarizados dentro del rango (2 variables)	1	77.903%
Sesgo estandarizado dentro del rango (4 variables)	1	72.415%

Por lo general, si hay correlación entre las variables, el número de componentes principales útiles ha de ser mucho menor. Sin embargo, 1 o 2 componentes principales no son suficientes para explicar la variabilidad de la matriz de datos en contraste con la mayor variabilidad explicada con 4 componentes principales, lo cual repercutirá en la capacidad de reconocimiento y predicción del sistema de clasificación a construir.

De manera detallada en la tabla 18 se muestran los autovalores de cada componente junto con la varianza explicada, donde se resalta las cuatro componentes principales con autovalor superior a 1. El gráfico de autovalores (figura 31) también permite seleccionar el número óptimo de componentes principales.

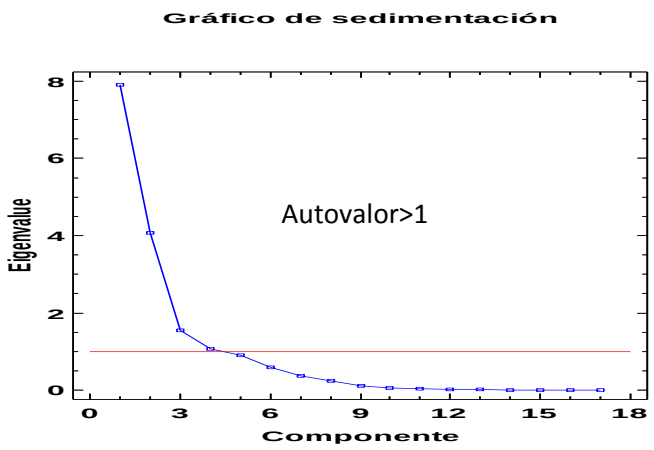

Figura 31*:* Gráfico de autovalores para la selección de las componentes principales

Tabla 18*: Tabla de componentes principales incluyendo valores propios y % varianza y % varianza acumulada*

Componente		*% varianza*	% varianza explicada	%varianza
Número	*Valor propio*	*explicada*	acumulada	residual

1	7,90341	46,491	46,491	53,509
2	4,08121	24,007	70,498	29,502
3	1,55704	9,159	79,657	20,343
4	1,06742	6,279	85,936	14,064
5	0,900736	5,298	91,234	8,766
6	0,586607	3,451	94,685	5,315
7	0,377028	2,218	96,903	3,097
8	0,235188	1,383	98,286	1,714
9	0,122895	0,723	99,009	0,991
10	0,063052	0,371	99,380	0,620
11	0,0368073	0,217	99,596	0,404
12	0,0266979	0,157	99,754	0,246
13	0,020172	0,119	99,872	0,128
14	0,012898	0,076	99,948	0,052
15	0,00600371	0,035	99,983	0,017
16	0,00194898	0,011	99,995	0,005
17	0,000881493	0,005	100,000	0,000

La caracterización de cada muestra por las puntuaciones o proyección de de las muestras sobre el plano de las 2 o 3 primeras componentes principales tampoco permite establecer claras agrupaciones tal como muestran las gráficas de puntuación 2D y 3D de las figura 32 a-b. Tanto en la gráfica de puntuación 2D como 3D las muestras aparecen juntas, tal como denota la nube de puntos.

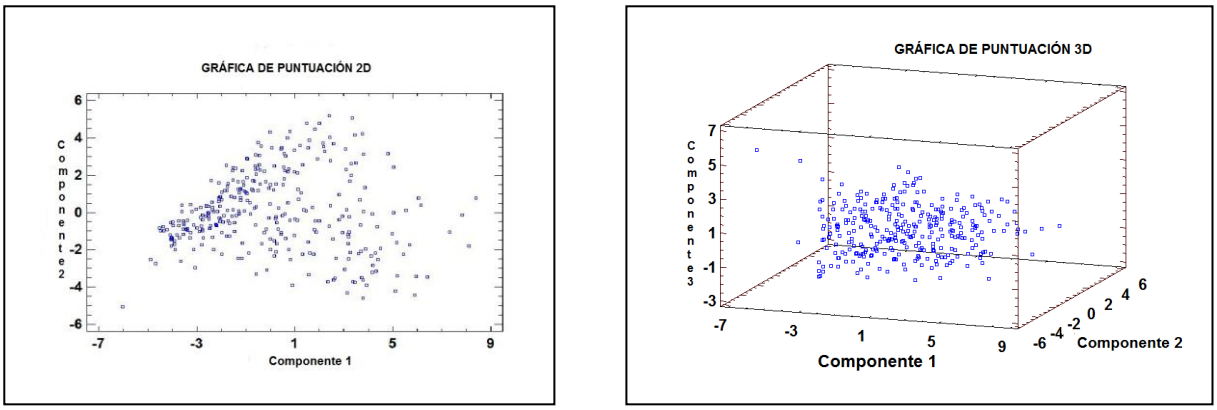

Figura 32: *Gráficas de puntuación a)2D y b)3D de cada muestra.*

Viendo el bajo éxito de las técnicas de análisis no supervisado y el análisis factorial, se recurre a algoritmos de clasificación supervisada para la búsqueda de funciones discriminantes lineales, que tal como se indicó en el apartado 5.1 minimicen las varianzas intra-categorias y maximicen las varianzas entre categorías. La tabla 19 representa las 4 funciones discriminantes lineales resultantes junto con los valores propios y la varianza relativa explica de

Tabla 19 : *Parámetros estadísticos de las funciones discriminantes (a) y las funciones derivadas (b)*

FUNCIÓN DISCRIMINANTE	VALOR PROPIO	%VARIANZA RELATIVA	CORRELACIÓN CANÓNICA
1	15,1449	68,57	0,96854

2	3,76604	17,05	0,88892
3	2,51088	11,37	0,84568
4	0,665955	3,02	0,63225

FUNCIÓN DERIVADA	LAMBDA DE WILKS	Chi-CUADRADO	DF	P-VALUE
1	0,00222191	1881,6911	68	0,0000
2	0,0358727	1024,9563	48	0,0000
3	0,170971	544,0093	30	0,0000
4	0,600256	157,2027	14	0,0000

Las funciones discriminantes son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (valor-p≈0<0,5) suficiente para desarrollar un modelo que permita discriminar las 320 muestras del sistema de entrenamiento entre los 5 niveles de variedad a partir de las 17 variables predictoras. Teniendo en cuenta que los valores propios de las tres primeras funciones discriminantes describen el 97,99% de la variabilidad de los datos, y que además existe una alta correlación entre las mismas según indican los valores de correlación canónica, serían suficientes para clasificar las muestras de tomate. Además de acuerdo con el estadístico Lambda de Wilks que mide las desviaciones que se producen dentro de cada grupo respecto a las totales sin distinción de grupo, para las dos primeras funciones discriminantes derivadas, que presentan valor de Lambda de Wilks próximas a 0, la variabilidad total es debida mayoritariamente a diferencias entre grupos y por tanto diferencian más entre variedades. Sin embargo, para las otras dos funciones discriminantes el valor de Lambda de Wilks aumenta, llegando a aproximarse a 1 para la última función discriminante, de modo que los grupos están más mezclados y la capacidad de reconocimiento para la misma es menor, aunque ésta se considere estadísticamente significativa.

Tabla 20: Funciones discriminantes de las pieles de tomate

VARIABLES	FUNCIONES DISCRIMINANTES			
λ	1	2	3	4
668 cm^{-1}	0,3325	0,343298	-0,340192	0,610297
725 cm^{-1}	6,53666	3,05824	-1,66752	0,341965
831 cm^{-1}	8,13744	2,97394	-1,79792	0,377873
990 cm^{-1}	-1,10844	0,527006	-0,122125	-0,00172764
1026 cm^{-1}	0,301009	-0,12788	-0,369119	-1,4931
1051 cm^{-1}	0,111616	-0,00141346	-0,533628	0,642936
1105 cm^{-1}	-1,06654	0,60675	0,617757	2,02864
1165 cm^{-1}	2,49024	-1,29341	-0,264794	0,471668
1219 cm^{-1}	1,00363	-0,993787	0,972703	0,960427
1344 cm^{-1}	0,859409	0,05015	-1,12286	-1,77841
1459 cm^{-1}	-2,47517	3,10679	-2,57116	0,159336
1514 cm^{-1}	-3,80133	-2,21068	1,01571	-0,174346
1604 cm^{-1}	-0,431498	0,0504774	1,67416	0,735367
1623 cm^{-1}	-0,670487	0,148657	-0,582909	0,851773
1725 cm^{-1}	-1,43415	0,499942	-1,32714	-2,26075
2850 cm^{-1}	-3,00495	5,87714	-5,76452	5,98906
2920 cm^{-1}	6,9639	-7,86101	8,53235	-5,47393

COEFICIENTES DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES

Las funciones canónicas o discriminantes de las variables predictoras se representan en la tabla 20 donde los coeficientes que se muestran son los coeficientes de las funciones discriminantes derivadas.

El valor medio que alcanzan las funciones discriminantes en una variedad representan el centroide en torno al cual se agrupa la misma. Estos valores medios se recogen en la tabla 21. En este caso hay 4 funciones discriminantes y 5 variedades, por lo que habrá 5 centroides, cada uno de ellos definido por dos coordenadas, una correspondiente a cada función discriminante.

Tabla 21: *Centroides o valores medios para cada una de las 5 variedades en cada una de las 4 funciones discriminantes*

	FUNCIONES DISCRIMINANTES			
GRUPO	**1**	**2**	**3**	**4**
KUMATO	-2,75576	2,45792	-2,13975	0,0748127
PERA	-2,56772	-2,35755	-0,254328	-1,15425
ENSALADA	-2,30837	-1,6373	0,572241	1,35166
CHERRY	7,41474	-0,471442	-0,781411	0,0585781
RAMA	0,217113	2,00837	2,60325	-0,33081

Los centroides en torno al cual se agrupan las variedades Kumato, Pera, Ensalada, Rama presentan coordenadas similares respecto a los ejes discriminantes, es decir, los centroides están próximos entre sí. Entonces estas variedades no ofrecen un distanciamiento sustancial que evidencia su correcta clasificación, especialmente las variedades Pera y Ensalada cuya discriminación es mínima ya que se observan mezcladas. Al contrario, para la variedad Cherry existe un mayor poder de discriminación encontrándose aislado del resto de clases ya que los tomates de esta categoría se agrupan en torno de un centroide totalmente separado de los demás.

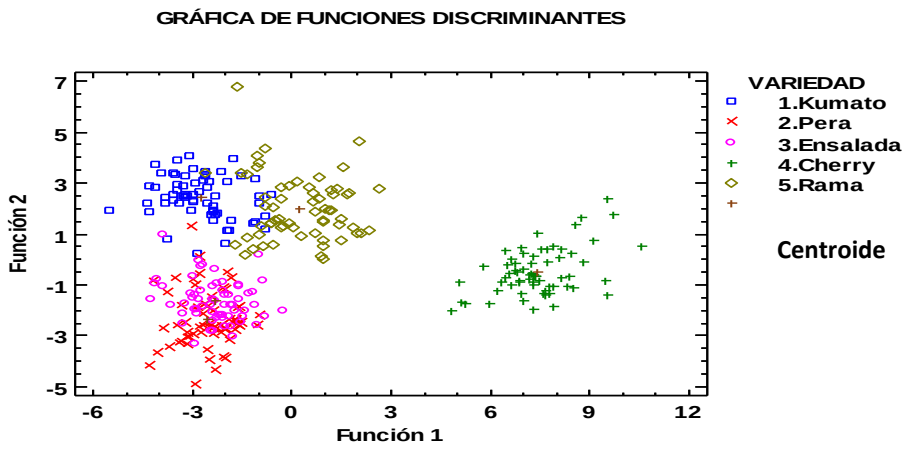

Figura 33: Gráfica de funciones discriminantes derivadas para la clasificación exhaustiva y mutuamente exclusiva en las 5 variedades objeto de estudio

El resultado es un modelo de clasificación con una elevada capacidad de reconocimiento **(95,63%)** justificado por las premisas anteriores. Este modelo de clasificación constituido por 17 variables predictoras es aquel con el que se consigue la mayor capacidad de reconocimiento que se reduce conforme disminuye número de variables predictoras, de manera que las

capacidades de reconocimiento son las siguientes: 82.19% (8 variables predictoras), 75,94% (4 variables predictoras), 40.00% (2 variables predictoras). Con estas funciones discriminantes derivadas encontradas tan sólo se clasifican erróneamente 14 de las 320 muestras que constituyen el conjunto de entrenamiento. Tanto en la tabla de clasificación (Tabla 22) como la gráfica de funciones discriminantes derivadas (Figura 33) se refleja que los tomates Pera y Ensalada son las variedades en las que existen mayores errores de clasificación y las que peor se discriminan entre sí con este algoritmo.

VARIEDAD REAL	TAMAÑO GRUPO	VARIEDAD CLASIFICADA				
		KUMATO	**PERA**	**ENSALADA**	**CHERRY**	**RAMA**
KUMATO	64	**64**	0	0	0	0
		(100,00%)	(0,00%)	(0,00%)	(0,00%)	(0,00%)
PERA	64	0	**57**	6	0	1
		(0,00%)	**(89,06%)**	(9,38%)	(0,00%)	(1,56%)
ENSALADA	64	1	5	**58**	0	0
		(1,56%)	(7,81%)	**(90,63%)**	(0,00%)	(0,00%)
CHERRY	64	0	0	0	**64**	0
		(0,00%)	(0,00%)	(0,00%)	**(100,00%)**	(0,00%)
RAMA	64	1	0	0	0	**63**
		(1,56%)	(0,00%)	(0,00%)	(0,00%)	**(98,44%)**

Capacidad de reconocimiento=95,63%

A continuación el análisis discriminante se aplica al conjunto de predicción constituido por 79 muestras, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 23).

Tabla 23: *Tabla de clasificación del conjunto de predicción (%acierto)*

		VARIEDAD ASIGNADA				
VARIEDAD REAL	**TAMAÑO GRUPO**	**KUMATO**	**PERA**	**ENSALADA**	**CHERRY**	**RAMA**
KUMATO	16	**16**				
PERA	15		**14**	1		
ENSALADA	16		1	**15**		
CHERRY	16				**16**	
RAMA	16					**16**

Capacidad de predicción= 97,5%

Tal como muestra la tabla 23, el modelo de clasificación se ajusta con éxito para el conjunto de predicción, especialmente para tres de las variedades con 100% de acierto. Sin embargo, la capacidad de predicción se ve reducida para las variedades Pera y Ensalada donde el porcentaje de tomates clasificados correctamente es superior al 93 %, lo cual es evidente de acuerdo al comportamiento observado en el conjunto de entrenamiento.

Reconocimiento del estado de maduración

Siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior se lleva a cabo un análisis discriminante lineal para el reconocimiento del estado de maduración pero esta vez sobre una matriz formada por 240 columnas (muestras) y 6 filas (intensidad de pico a cada longitud de

onda). Las bandas de vibración seleccionadas son las siguientes: 1244, 1166, 1104, 1026, 835, 721 cm^{-1}. El conjunto de entrenamiento está formado por 200 muestras y el de predicción, por 40. Como resultado se obtiene un modelo de clasificación con una capacidad de reconocimiento del 79,63% y una capacidad de predicción del 79,2% (Tabla 24)

Tabla 24: Tabla de clasificación del conjunto de predicción

		MADUREZ ASIGNADA					
GRADO DE MADUREZ	**TAMAÑO GRUPO**	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**
F1	4	**4**					
F2	4	1	**2**		1		
F3	4		1	**2**			1
F4	4		1		**2**	1	
F5	4				1	**3**	
F6	4				1		**3**

Capacidad de predicción:79,2%

El modelo clasifica correctamente los tomates con madurez F1 (o verdes) y tiene problemas para clasificar aquellos tomates con madurez intermedia (F2, F3, F4) según puede verse en la tabla 24 y en la gráfica de funciones discriminantes, figura 34. Los tomates aparecen juntos en la gráfica de funciones discriminantes (Figura 34) formando una nube de puntos en torno a los centroides concentrados en el cuadrante inferior izquierdo.

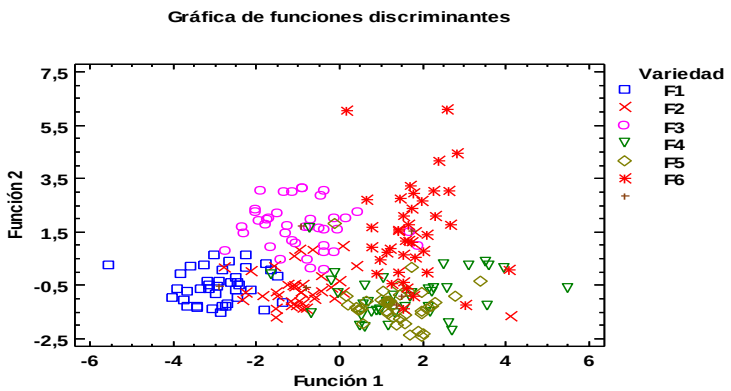

Figura 34: Gráfica de funciones discriminantes derivadas para la clasificación exhaustiva y mutuamente exclusiva de los estados de madurez de los tomates ensalada

A la vista de los resultados, se podrían utilizar un conjunto de entrenamiento mayor o bien otros algoritmos de clasificación como el método de los k vecinos o el método de redes neuronales para mejorar los porcentajes de éxito de clasificación en la matriz de madurez. El bajo éxito de este modelo puede deberse a una mala elección de las variables predictoras o incluso a un error inicial de muestreo ya que tras el análisis exploratorio lineal no se observa tendencia gaussiana alguna en las variables, ni el análisis de componentes principales explica

una alta varianza del conjunto de datos . También se podría aplicar el método de k vecinos o de redes neuronales al primer modelo para mejorar la capacidad de reconocimiento y predicción, 95.63, 97.5%, respectivamente, con el fin de discriminar mejor entre las variedades Pera y Ensalada que aparecen mezcladas en la gráfica de funciones discriminantes.

4. CONCLUSIONES

- El análisis de tomates por ATR permite la clasificación de los mismos en cuanto a la variedad a la que pertenece el grupo con alta fiabilidad, de manera rápida y sin tratamiento de muestra.

- No ha sido posible diseñar un modelo de clasificación adecuado para el estudio de la maduración en tomates de una misma variedad. Sin embargo es posible que profundizando en los estudios quimiométricos, mediante el empleo de un conjunto de entrenamiento mayor o bien de otros algoritmos de clasificación, se pueda mejorar de las capacidades de reconocimiento y predicción e incluso la estabilidad del modelo.

- La fluorescencia sincrónica no ha cumplido con las expectativas esperadas de acuerdo a sus características analíticas debido a la complejidad estructural.

- La combinación de estas técnicas espectroscópicas (Fluorescencia, molecular, espectroscopía Vis-UV y espectroscopía Raman) con una etapa previa de separación como es el empleo de técnicas cromatográficas permitiría separar los indicadores de madurez previo al análisis cualitativo y así mejorar las características analíticas en cuanto sensibilidad, selectividad y resolución.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] K.P.Sudheer & V.Indira, 2007; Tecnología del Manejo de Postcosecha de Frutas y Hortalizas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (OEA)

[2] F. Calegario, Ricardo G. Cosso, Fernanda V.Almeida, Anibal E. Vercesi, Wilson F. Jardim; *Determination of the respiration rate of tomato fruit using flow analysis*. Postharvest Biology and Technology 22 (2001) 249-256

[3] J. Andrews. *The climacteric respiration rise in attached and detached tomato fruit*. Postharvest Biology and Technology 6 (1995) 287-292

[4] Juan Pablo Zoffoli; *Una novedosa técnica alternativa para prolongar la conservación de frutas: inhibidores de la acción del etileno*. Mundo Alimentario 2009.

[5] Chris B. Watkins, *The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables*. Biotechnology Advances 24 (2006) 389-409

[6] http//faostat.fao.org. Consulta 22/2/2012

[7] F.Nuez. *El cultivo del tomate*, Ed-Mundi-Prensa 2001, Cap 2

[8] S.Jinap, P. Hajeb. *Research review: Glutamate. Its applications in food and contribution to health.* Appetite 55 (2010) 1-10

[9] Feng Zhang, Boris Klebansky, Richard M. Fine, Hong Xu, Alexey Pronin, Haitian Liu, Catherine Tachdjjan and Xiadong Li. *Molecular mechanism for the unami taste synergism.* PNAS 106 (2008) 52 20930-20934

[10] Tipos comerciales y calibrado en tomates. http://tomatebroker.com. Consulta 16/6/2012

[11] http://kumato.com. Consulta 16/6/2012

[12] Barreiro ,P ; Ruiz-Altisent,M *Propiedades mecánicas y calidad de frutos. Definiciones y medidas instrumentales*. ETSIA Dpto. Ingeniería Rural. Fruticultura Profesional, 1996 nº77

[13] J.L. Guil- Guerrero, M.M.Rebolloso Fuentes, *Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (Lycopersicon esculentum) varieties*. Journal of Food Composition and Analysis 22 (2009) 123-129

[14] A.Abushita, Emhemed A. Hebshi, Hussein G. Daood, Péter A. Biacs. *Determination of antoxidant vitamins in tomatoes.* Food Chemistry, 60 (1996) 2 207-212

[15] B. George, Charanjit Kaur, D.S Khurdiya, H.C. Kapoor. *Antioxidants in tomato (Lycopersium esculentum) as a function of genotype.* Food Chemistry 84 (2004) 45-51

[16] Lutsenko, E.A., Carcamo, J.M., Golde, D.W., *Vitamin C prevents DNA mutation*

induced by oxidative stress. Journal of Biological Chemistry 277 (2002) 16895–16899.

[17] Ana María Adalid, Salvador Roselló, Fernando Nuez. *Evaluation and selection of tomato accessions (Solanum section Lycopersicon) for content of lycopene, β-carotene and ascorbic acid.* Journal of Food Composition and Analysis, 23 (2010) 613-618

[18] Amanda J. Stewart, Sophie Bozonnet, William Mullen ,Gareth I. Jenkins, Michael E. J. Lean, Alan Crozier. *Ocurrence of Flavonols in tomatoes and tomato-based products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (2000) 2663-2669

[19] Anna Vallverdú Queralt, Olga Jáuregui, Guiseppe Di Lecce, Cristina Andrés Lacueva, Rosa M. Lamuela Raventós.. *Screening of the poyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF).* Food Chemistry 129 (2011 877-883

[20] Anna Vallverdú Queralt, Olga Jáuregui, Alexander Medina Remon, Rosa M: Lamuela Raventós. 2012. *Evaluation of a method to characterize the phenolic profile of organic and conventional tomatoes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry ;60 (2012) 13 3373-3380

[21] A.Lai, E. Santangelo, G.P. Soressi, R. Fantoni. *Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (Lycopersicon esculentum, Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques.* Postharvest Biology and Technology 43 (2007) 335-342

[22] A. Abbott, *Quality measurement of fruits and vegetables*. Postharvest Biology and Technology 15 (1999) 207-225

[23] Amos Batu. *Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes*. Journal of Food Engineering 61 (2004) 471-475

[24] Jeffrey K. Brecht. *Using X-ray-computed Tomography to nondestructively determine maturity of green tomatoes*. HortScience 26 (1991) 1 45-47

[25] Cheng-Jin Du, Da-Wen Sun. *Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation*. Trends in Food Science & Technology 15 (2004) 230-249

[26] Aristizábal Torres, I.D, *La Resonancia Magnética y sus aplicaciones en la agroindustria, una revisión*. Fac. Nal. Agr. Medellin, 60 (2007) (2) 4037-4066

[27] Rubio-Diaz, Daniel E.; Francis, David M.; Rodríguez-Saona, Luis E. *External calibration models for the measurement of tomato carotenoids by infrared spectroscopy.* Journal of Food Composition and Analysis 24 (2011) 121-126

[28] García Ramos, F. Javier; Ruiz Altisent, Margarita. *Medida de la calidad interna de frutas y hortalizas en línea.* Vida Rural 1 de septiembre 2001

[29] Iwona Scibisz, Maryse Reich, Sylvie Bureau, Barbara Gouble, Mathilde Causse, Dominique Bertrand, Catherine M.G.C Renard. *Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato.* Food Chemistry 125 (2011) 1390-1397

[30] E. Paredes, M.S. Prats, S.E. Maestre, J.L. Tolodí. *Rapid analytical method for the determination of organic and inorganic species in tomato sample through HPLC-ICP-AES coupling*. Food Chemistry 111 (2008) 469-475

[31] Katrien Beullens, Dmitriy Kirsanow, Joseph Irudayaraj, Alisa Rudnitskaya, Andrey Legin, Bart M. Nicolaï, Jeroen Lammertyn, *The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes*, Sensors and Actuators B, 116 (2006) 107-115

[32] Lijuan Xie, Xingquian Ye, Donghong Liu, Yibin Ying. *Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS.* Food Chemistry 114 (2009) 1135-1140

[33] Lijuan Xie, Xingqian Ye, Donghong Liu, Yibin Ying. *Prediction of titratable acidity, malid acid, and citric acid in bayberry fruit by near-infrared spectroscopy.* Food Research International 44 (2011) 2198-2204

[32] Serrano, E; Beltrán, J; Hernández, F; *Application of multiple headspace-solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to quantitative analysis of tomato aroma components*. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 127-133

[35] Antihus Hernández Gómez, Guixian Hu Jun Wang, Annia García Pereira. *Evolution of tomato maturity by electronic nose*. Computers and Electronics in Agriculture 54 (2006) 44-52

[36] Prakash Bhosale, Igor V. Ermakov, Maia R. Ermakova, Werner Gellermann, Paul S. Bernstein. *Resonance Raman quantification of nutritionally important carotenoids in fruits, vegetables, and their juices in comparison to high-pressure liquid chromatography analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 3281-3285

[37] M. Baranska, W. Schütze, H. Schulz. *Determination of lycopene and β-carotene content in tomato fruits and related products: comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy.* Analytical Chemistry 78 (2006) 8456-8461

[38] I.R Bunghez, M. Raduly, S. Doncea, I. Aksahin, R.M.Ion, *Lycopene determination in tomatoes by different spectral techniques (UV-Vis, FTIR and HPLC).* Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 6 (2011) 3 1349-1356

[39] AOAC. Official methods of analysis (16 ed.) Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. (AOAC International) aoac.org

[40] Skoog, Holler, Nieman, Principios de Análisis Instrumental. McGraw-Hill/ Interamericana de España S.A.U 2001 5ªEd, Madrid

[41] Michael Pflanz, Manuela Zude. *Spectrophotometric analyses of chlorophyll and single carotenoids during fruit development of tomato (Solanum lycopersicum L. by means of iterative multiple linear regression analysis*. Applied Optics, 47 (2008) 32

[42] Torrecilla José S.; Montaña Cámara ; Fernández-Ruiz, Virginia; Guiomar Piera, Jorge O. Cáceres. *Solving the spectroscopy interference effects of β-carotene and lycopene by neural networks*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2008) 6261-6266

[43] Bart M. Nicolaï, Katrien Beullens, Els Bobelyn, Ann Peirs, Wouter Saeys, Karen I. Theron, Jeroen Lammertyn. *Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review*. Postharvest Biology and Technology 46 (2007) 99-118

[44] André M.K Pedro, Marcia M.C. Ferreira, *Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration.* Analytical Chemistry 77 (2005) 2505-2511

[45] www.perkinelmer.com (Perkin Elmer precisely. Technical Note FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)).

[46] Steven Vermeir, Katrien Beullens, Péter Mészáros, Evgeny Polshin, Bart M. Nicolaï, Jeroen Lammertyn. *Sequential injection ATR-FTIR spectroscopy for taste analysis in tomato.* Sensor and Actuators B 137 (2009) 715-721

[47] Jianwei Qin, Kuanglin Chao, Moon S. Kim. *Investigation of Raman chemical imaging for detection of lycopene changes in tomatoes during postharvest ripening*. Journal of Food Engineering 107 (2011) 277-288

[48] F.J.Rambla, S. Garrigues, M. de la Guardia. *PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices*. Analytica Chica Acta 344 (1997) 41-53

[49] Gerhard Jahns, Henrik Moller Nielsen, Wolfgang Paul. *Measuring image analysis attributes and modeling fuzzy consumer aspects for tomato quality grading*. Computers and Electronics in Agriculture 31 (2001) 17-29

[50] Li, Q. Z., Wang, M.H., & Gu, W.K. *Computer vision based system for apple surface detection defect detection. Computers and Electronics in Agriculture*, 36 (2002) (2-3) 215-223

[51] Beyer, M., Hahn, R.Peschel, S., Harz, M., & Knoche, M. *Analysis fruit shape in sweet cherry (Prunus avium L.)*. Scientia Horticulturae, 96 (2002) (1-4) 139-150

[52] Tollner E.W, Hung Y.C, Upchurch B.L, Prussia E.E, *Relating X-ray absorption to density and water content in apples*. Transactions of the ASAE, 35 (1992) 1921-19

[53] Sonego L, Ben-Ane, R.Raynal, J., Pech, J.C, *Biochemical and physical evaluation of textural characteristics of nectarines exhibiting wooly breakdown NMR imaging, X-ray computed tomography and pectin composition*. Postharvest Biology and Technology 5 (1995) 187-198

[54] Guillermo Ramis Ramos; Mª Celia García Álvarez-Coque. Ed Síntesis Madrid 2001

[55] Ricard Boqué, Joan Ferré, *Análisis de componentes principales aplicado a la representación de datos multidimensionales.* Técnicas de laboratorio, 290 (2004) 214-219

[56] *Antonio J. Meléndez-Martínez, Isabel M. Vicario, Francisco J. Heredia. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos.* Archivos latinoamericanos de nutrición 54 (2004) 2

[57] El Hassane Anouar, Johannes Gierschner, Jean-Luc Duroux, Patrick Trouillas. *UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent densitiy functional theory study.* Food Chemistry 131 (2012) 79-89

[58] Benoît Schoefs, *Chlorophyll and carotenoids analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis*. Trends in Food Science & Technology 13 (2002) 361-371

[59] S. Rubio, A, Gómez-Henz, M. Valcarcel*, Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy.* Talanta 33, 8 (1986) 633-640

[60] Tuan Vo-Dinh. Synchronous Luminiscence Spectroscopy: Methodology and Applicability. Applied Spectroscopy 36 (1982) 576-581