



ENTE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E L'AMBIENTE

Serie Innovazione

308

ANALISI MEDIANTE UTILIZZO DI TECNICHE DI FLUORESCENZA DEI PIGMENTI PRESENTI SULLA SUPERFICIE DI BACCHE DI POMODORO DURANTE LA MATURAZIONE

ANTONIA LAI, ROBERTA FANTONI
ENEA - Divisione Fisica Applicata
Centro Ricerche Frascati, Roma

RT/INN/2000/35

This report has been prepared and distributed by: Servizio Edizioni Scientifiche - ENEA
Centro Ricerche Frascati, C.P. 65 - 00044 Frascati, Rome, Italy

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily those of ENEA.

DISCLAIMER

Portions of this document may be illegible in electronic image products. Images are produced from the best available original document.

ANALISI MEDIANTE UTILIZZO DI TECNICHE DI FLUORESCENZA DEI PIGMENTI PRESENTI SULLA SUPERFICIE DI BACCHE DI POMODORO DURANTE LA MATURAZIONE

Riassunto

Mediante diverse tecniche spettroscopiche, basate sulla emissione di fluorescenza visibile a seguito di eccitazione nella stessa regione o nell'ultravioletto, è stato condotto uno studio su bacche di pomodoro a diversi stadi di maturazione. Lo scopo del lavoro è quello di potere attribuire, attraverso l'analisi degli spettri di fluorescenza dei pigmenti superficiali presenti nel frutto, lo stadio ottimale di maturazione al momento della raccolta.

I risultati ottenuti hanno permesso di distinguere spettri di fluorescenza attribuiti ai principali gruppi di pigmenti fluorescenti presenti nella superficie esterna del pomodoro: antociani, flavonoidi, carotenoidi e clorofilla a. Inoltre si è potuto stabilire la lunghezza d'onda laser da utilizzare per le misure remote con LIF (λ_{exc} 266 nm).

Parole chiave: Pomodoro, stadio di maturazione, fluorescenza indotta da laser (LIF)

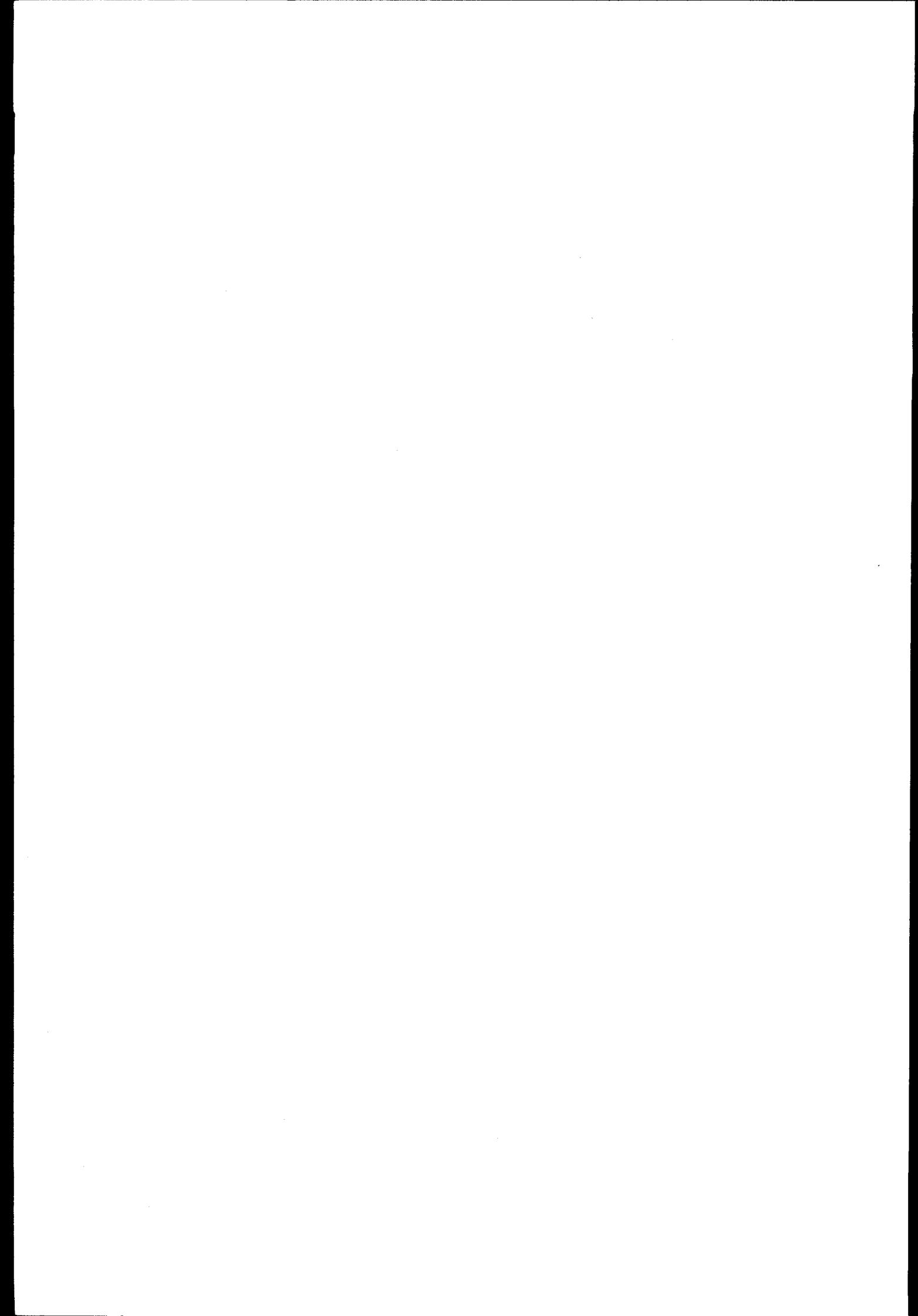
PIGMENTS ANALYSIS ON SKIN TOMATO FRUITS DURING RIPENING BY MEAN FLUORESCENCE TECHNIQUES

Abstract

Different spectroscopic techniques, based on visible fluorescence emission upon excitation in the same spectral region or in the ultraviolet, have been utilized to characterize tomato fruit ripening stages in order to analyze surface pigments which correspond to optimal conditions for fruit harvesting.

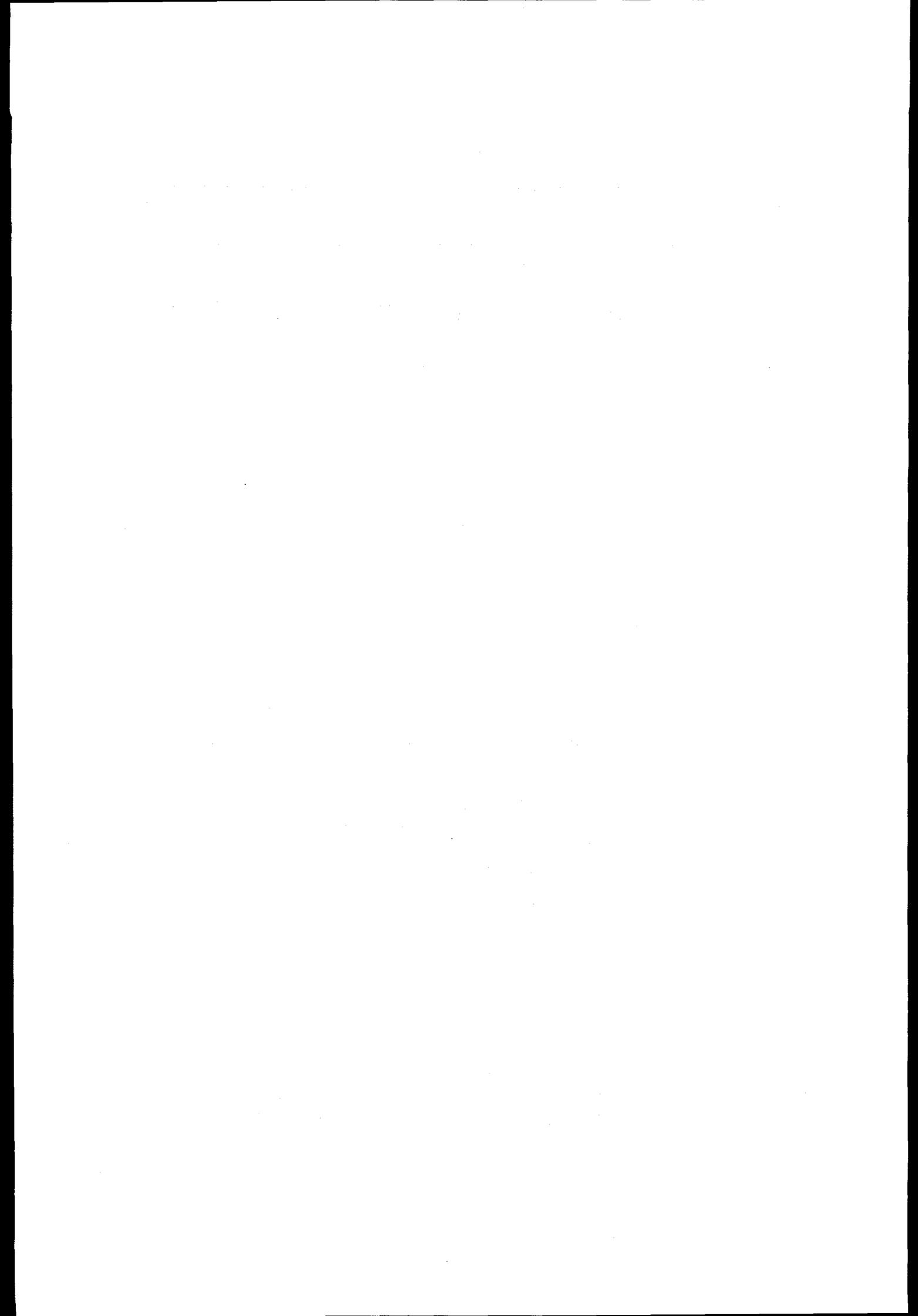
The main fluorescence spectral features belonging to antochyanin, flavonoids, carotenoids and chlorophyll a after excitation of skin tomato pigments at different laser wavelength have been identified. For tomato ripening stage LIF detection, the λ_{exc} 266nm was established as the optimal laser wavelength.

Keywords: Tomato, ripening stage, pigments, laser induced fluorescence



INDICE

1. INTRODUZIONE	p.	7
2. MATERIALI E METODI	p.	9
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	p.	13
4. CONCLUSIONI	p.	24
REFERENCES	p.	28



ANALISI MEDIANTE UTILIZZO DI TECNICHE DI FLUORESCENZA DEI PIGMENTI PRESENTI SULLA SUPERFICIE DI BACCHE DI POMODORO DURANTE LA MATURAZIONE

1. INTRODUZIONE

Il pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), pianta perenne ma quasi dappertutto coltivata come annuale, è una angiosperma dicotiledone appartenente alla famiglia delle Solanacee. Il frutto è una bacca che a maturazione assume un colore rosso intenso. Originario del Perù, è stato introdotto in Europa nel XVI secolo. A causa dell'appartenenza botanica alla stessa famiglia della Mandragora e della Belladonna era ritenuta una pianta velenosa, questo non ne ha permesso la sua coltivazione fino al 1800. Da allora l'importanza del pomodoro si accrebbe nel tempo fino ad essere oggi uno degli ortaggi di più largo consumo.

E' l'alimento base della dieta mediterranea che ha acquistato una notevole importanza sia da un punto di vista alimentare che per la salute umana. Il suo alto contenuto in licopene (carotenoide ad azione antiossidante) sembra avere una funzione protettiva nei confronti delle malattie cardiovascolari oltre che ostacolare la proliferazione delle cellule tumorali (E. De Stefani *et al* 2000; Bramley P.M. 2000).

Circa 54 mg/100g dell'epicarpo del frutto è costituito di licopene; questo carotenoide è associato alla fibra insolubile (la quantità presente nella polpa è di 11 mg/100g) ed è distribuito nei cromoplasti sotto forma di strati paracrillini. (Addams T. 1998).

Durante la maturazione del frutto, soprattutto nella fase di cambiamento del colore, il licopene aumenta notevolmente e può raggiungere gli 80-100 µg/g di peso fresco nella fase rossa (Addams T. 1998). La temperatura di maturazione ha un forte effetto sulla sintesi di licopene quella ottimale è tra i 16°C e i 21°C.

Nel pomodoro, oltre ai carotenoidi, sono presenti altri composti chimici come antociani e flavonoli. Tali composti appartengono ad una classe di metaboliti secondari di natura fenolica che giocano un importante ruolo nell'interazione delle piante con il loro ambiente. La concentrazione di tali composti varia in relazione allo stadio di sviluppo della pianta ed è influenzato da fattori ambientali. Si trovano nei vacuoli delle cellule epidermiche e subepidermiche ed aumentano in seguito a radiazioni UV grazie ad un enzima chiamato fotorecettore blu. La loro funzione, oltre quella di conferire colori utili per attirare gli animali per la dispersione del polline e dei semi (gli antociani p.e. sono responsabili del colore rosso, porpora, blu) è quella di proteggere le cellule vegetali da un eccesso di radiazioni UV. I flavonoli, che si trovano anche nelle parti verdi delle foglie, svolgono la stessa funzione anche se non sono visibili all'occhio umano.

Anche questi composti presentano riconosciute proprietà farmacologiche, infatti hanno attività antiossidante, antinfiammatoria, vasoprotrettrice e regolatrice della permeabilità vasale. (Melegari M. e Benvenuti S. 1998).

A livello Europeo esistono progetti che hanno intrapreso iniziative per incrementare e preservare il livello di antiossidanti nella trasformazione industriale (Addams T. 1998)

Il pomodoro è diffuso nei cinque continenti e assicura da solo più del 15% della produzione mondiale degli ortaggi; viene coltivato in pieno campo o in serra in rotazione con altre colture. In Italia la coltura del pomodoro è la più importante tra quelle orticole e, per le caratteristiche trasformate del prodotto, si pone tra i primi posti a livello mondiale per qualità e pregio (Siviero P. 1999). La produzione viene assorbita per il 75% dall'industria conserviera, principalmente per la preparazione di concentrati, pelati e succhi, e per il restante 25% utilizzato direttamente. Dopo gli Stati Uniti, il nostro paese è il secondo produttore mondiale di pomodoro da industria. La resa media regionale è di circa 80-100 t/ha, ma raggiunge e supera le 120 t/ha dove esistono aziende con maggiore specializzazione. Il 50% della produzione è assicurata dalla Puglia seguita dall'Emilia Romagna (30%), dalla Maremma tosco-laziale e dalla Campania (10%) (Siviero P. 1999).

Il pomodoro destinato alla trasformazione, al momento dell'arrivo all'industria deve avere le seguenti caratteristiche:

- le bacche devono essere di colore rosso porpora e di dimensione omogenea

- il prodotto deve essere fresco; tra la raccolta e l'arrivo nello stabilimento non devono passare più di 24 ore
- non ci debbono essere né bacche acerbe né bacche marce
- i frutti non debbono avere residui di trattamenti antiparassitari

Una volta arrivato nello stabilimento, il primo processo che subisce il pomodoro è il lavaggio delle bacche a cui fa seguito l'allontanamento di quelle non ritenute idonee e dei corpi estranei presenti dopo la raccolta. Questo è uno dei primi punti cruciali del processo di trasformazione che, nella maggior parte delle aziende, è affidato alla esperienza e capacità di personale addetto che manualmente allontana i prodotti che presentano danni o che non si trovano ad un grado di maturazione idoneo. Si intuisce come, per cercare di ottimizzare la produzione del trasformato e aumentare la competitività sul mercato, è necessario definire metodiche che, sia in fase di raccolta, che in fase di selezione non siano affidate a valutazioni soggettive.

Nell'ambito del progetto DAMA, per il controllo della qualità dei prodotti immessi nella catena di trasformazione, vengono messe a punto diverse tecniche non distruttive con lo scopo di distinguere lo stadio ottimale di maturazione del frutto al momento della raccolta.

Fra le tecniche ottiche considerate, quelle basate sulla fluorescenza visibile a seguito di eccitazione nella stessa regione o nell'ultravioletto, consentono di rivelare efficacemente la presenza di pigmenti, identificati dalle proprie caratteristiche bande di assorbimento e fluorescenza. Lo studio è stato eseguito attraverso l'analisi degli spettri di fluorescenza dei pigmenti superficiali presenti nella bacca a tempi diversi di maturazione.

In una fase successiva si vuole inoltre studiare l'emissione dell'ormone vegetale in fase gassosa quale è l'etilene, che viene messo nelle diverse fasi della maturazione della bacca. Il monitoraggio di tale ormone permette di individuare il miglior momento di maturazione e quindi di raccolta del frutto.

Per caratterizzare la forma e la regolarità della superficie delle bacche è previsto anche l'utilizzo di tecniche di visione, a scansione o stereo.

2. MATERIALI E METODI

2.1 - I campioni

Da una stessa pianta di pomodoro tipo Marmande, sono state prelevate 6 bacche a 6 diversi stadi di maturazione, da completamente immaturo fino a completa maturazione, con

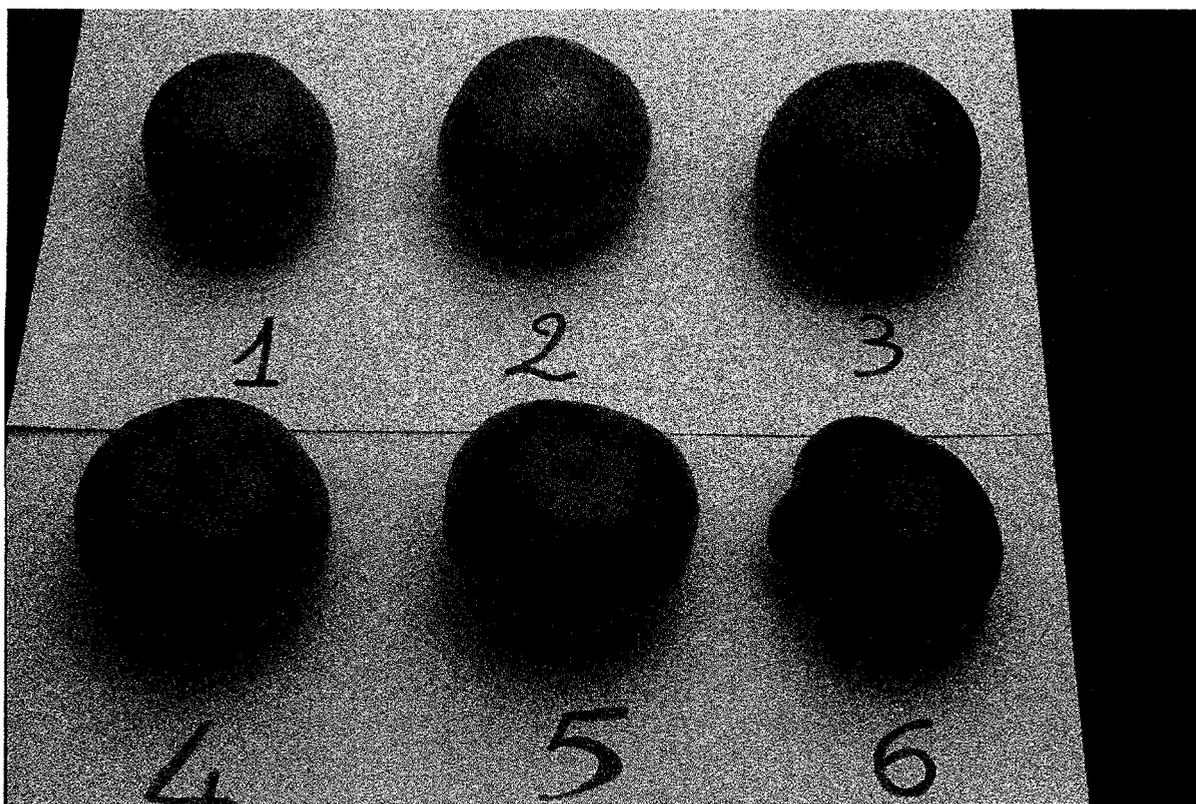


Fig. 1 – Bacche di pomodoro a diverso grado di maturazione (N° 1 frutto immaturo; N° 6 frutto completa maturazione)

gradazione di colore dal verde brillante al rosso intenso (Fig. 1). La nomenclatura utilizzata per caratterizzare tutte le fasi di maturazione di ogni bacca è data da un numero progressivo da 1 a 6 preceduta dalla lettera F(=frutto) (F1=bacca immatura, F6=bacca matura). Si è voluto inoltre analizzare il contenuto dei pigmenti su frutti in avanzato stato di maturazione (F7); a questo scopo una bacca è stata esposta per 30 gg ad una T 28°C.

Per le analisi effettuate con lo spettrofluorimetro, si è reso necessario procedere all'estrazione in metanolo dei pigmenti dell'epicarpo; da ciascuna bacca precedentemente lavata con acqua MilliQ e poi asciugata, sono state prelevati 10 g di epicarpo, utilizzando una lama bisturi e prestando attenzione a non prelevare anche la polpa sottostante. Il campione è stato immerso in 100 ml di metanolo e quindi omogeneizzato per 10 minuti (Waring commercial Blendor).

Allo scopo di confrontare la differenza di emissione di fluorescenza dei pigmenti estratti tra campioni filtrati e non filtrati, 50 ml del campione omogeneizzato sono stati filtrati attraverso doppio strato di garza, mentre 50 ml sono stati misurati senza filtrazione. 5 ml di entrambi i campioni, sia filtrato che non, sono stati posti in una cuvette di 1 cm di lato e quindi è stata misurata la fluorescenza degli estratti.

Per poter assegnare ad ogni picco di fluorescenza un composto chimico presente nella superficie del frutto, diversi standard (Sigma, UK) associati a composti come antociani (pelargonidina cloridrato), flavonoli (quercetina), carotenoidi (β -carotene) e clorofilla *a* sono stati dissolti in metanolo e quindi misurati nelle stesse condizioni del campione.

Per le misure di fluorescenza non invasiva (LIF) sono stati analizzati due frutti in condizioni di maturazione tra loro estreme: frutto immaturo verde brillante (F1) e frutto sovrammaturo (F7). Per ciascun frutto sono stati rilevati i pigmenti superficiali *in situ*.

2.2 - Lo spettrofluorimetro

I campioni così ottenuti sono stati analizzati allo spettrofluorimetro (PTI Quantamaster) il cui schema è riportato in Fig. 1. Il sistema è formato da un dispositivo per l'eccitazione a lunghezza d'onda variabile, un compartimento contenenti le ottiche e l'alloggiamento del campione e da un terzo dispositivo per l'analisi della fluorescenza emessa. In tabella 1 sono riportate le caratteristiche principali dello strumento.

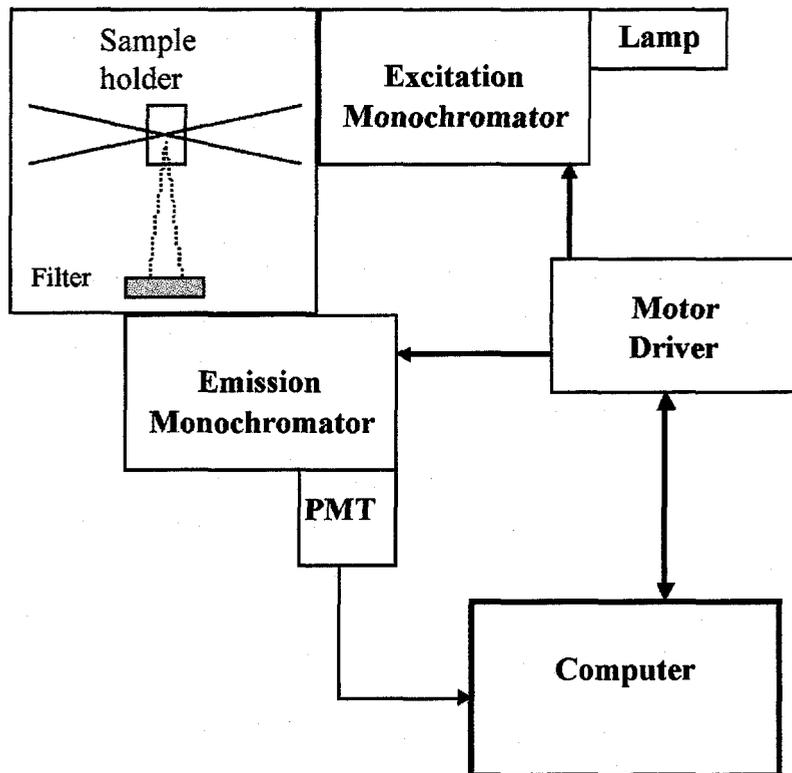


Fig. 2 - Spettrofluorimetro PTI Quantamaster

Tabella 1. Caratteristiche principali del sistema spettrofluorimetrico

Strumento	Tipo	Caratteristiche
Xenon Lamp	75 W	Emission Band 240-1000 nm
Monochromator	Czerny-Turner	0.2 m - f/4
Excitation	300 gr/mm	Bandpass = 5 nm
Emission	300/500 gr/mm	Bandpass = 5 nm
Fotomoltiplicatore	R928P	Hamamatsu

Il sistema controlla i due monocromatori tramite una interfaccia con i motori installata nel calcolatore. Lo strumento permette di acquisire sia gli spettri di emissione eccitati ad una fissata λ_{exc} , che gli spettri di eccitazione rivelati ad una fissata λ_{em} . Eseguendo successive scansioni di spettri di emissione al variare della lunghezza d'onda di eccitazione è possibile ricostruire mappe bidimensionali di fluorescenza in tutta la zona dell'UV visibile. Il protocollo di misure programmate dall'operatore viene eseguito in maniera automatica tramite funzioni macro che utilizzano il software dello strumento (FELIX).

2.3 - Il sistema LIF

Allo scopo di eseguire misure di fluorescenza non invasive su frutto intero sono state scelte due bacche a diversi gradi di maturazione: molto acerba (F1) e ad uno stadio di maturazione avanzato (F7). Ciascun frutto è stato messo su di una superficie piatta e quindi, con sistema LIF (Fig. 2) sono stati analizzati *in situ* i pigmenti superficiali. La misura, eseguita senza danneggiare in alcun modo la superficie del frutto, ha rivelato la fluorescenza emessa dalla superficie stessa a seguito dell'eccitazione con una radiazione monocromatica laser di bassa intensità e non focalizzata.

Nella figura 2 è riportato lo schema del sistema LIF da laboratorio usato per questo tipo di misura. Le lunghezze d'onda di eccitazione disponibili, fissate dal tipo di laser utilizzato sono 532 nm (visibile) e 355 nm o 266 nm (ultravioletto). La sorgente laser è pulsata e la misura di fluorescenza viene eseguita acquisendo lo spettro sull'analizzatore multicanale in una finestra temporale (300 ns) che si apre al termine dell'impulso laser. Il laser opera a 10 Hz e tipicamente le misure vengono mediate su 100 impulsi laser.

Il sistema realizzato è disponibile anche in un versione per utilizzo remoto, in tale caso il segnale viene raccolto, invece che sulla fibra ottica che funge da probe, da un telescopio e opportunamente focalizzato sul rivelatore.

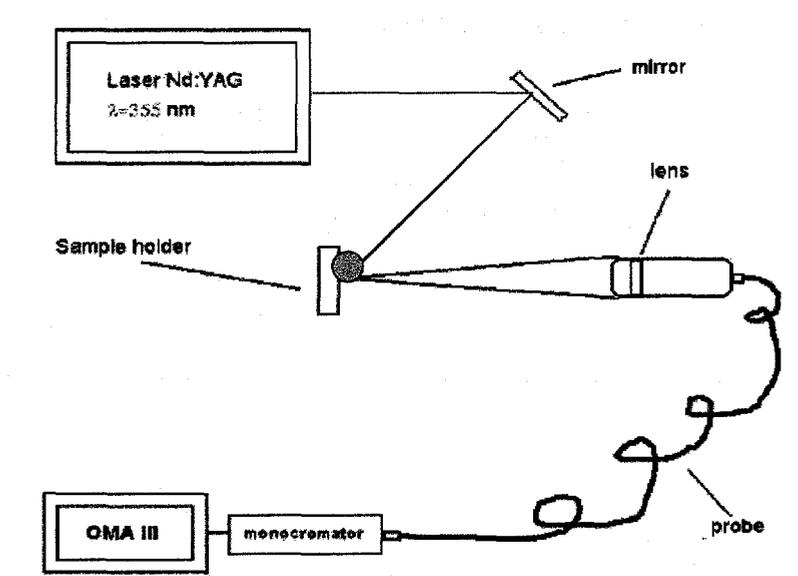


Fig. 3 - Sistema LIF in configurazione da laboratorio

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Misure di Fluorimetria

In figura 4 è mostrato lo spettro di fluorescenza del solvente utilizzato (metanolo). Ad ogni λ_{exc} si ha un caratteristico picco Raman dell'OH.

In figura 5 sono riportati i risultati dell'intensità di emissione di fluorescenza del campione filtrato a confronto con quello non filtrato. Non si osservano significative differenze tra le due tesi; tuttavia la qualità degli spettri, è migliore per il campione filtrato nel quale sono minimizzati gli effetti di assorbimento e di scattering del particolato. I risultati riportati nel seguito si riferiscono a misure effettuate su campioni sottoposti a filtrazione su doppia garza. Solo per le analisi di correlazione sono stati utilizzati i risultati ottenuti anche su campioni non filtrati.

In figura 6 sono riportati gli spettri di fluorescenza dei pigmenti eccitati a varie lunghezze d'onda dall'UV al visibile, esaminati per gli estratti dalle bacche a diversi stadi di maturazione, da F1 a F6. Si osserva che per ciascuno stadio di maturazione del frutto i composti chimici principali responsabili delle diverse bande sono costantemente presenti, quello che cambia nei differenti casi è l'intensità relativa dei picchi. Pertanto la concentrazione relativa dei pigmenti fluorescenti cambia col progredire della maturazione.

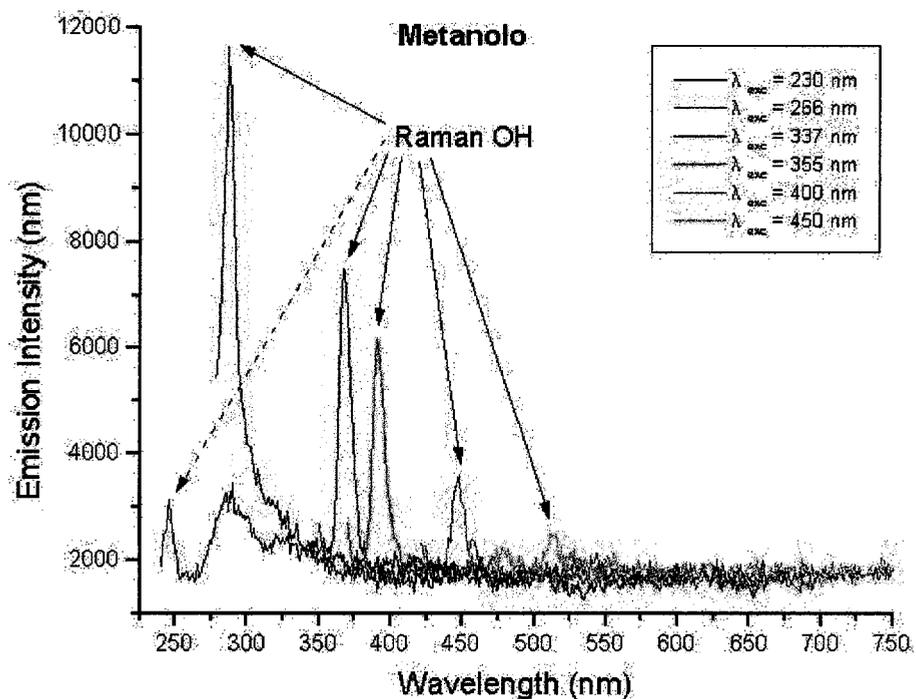


Fig. 4 - Spettro di fluorescenza del metanolo (solvente)

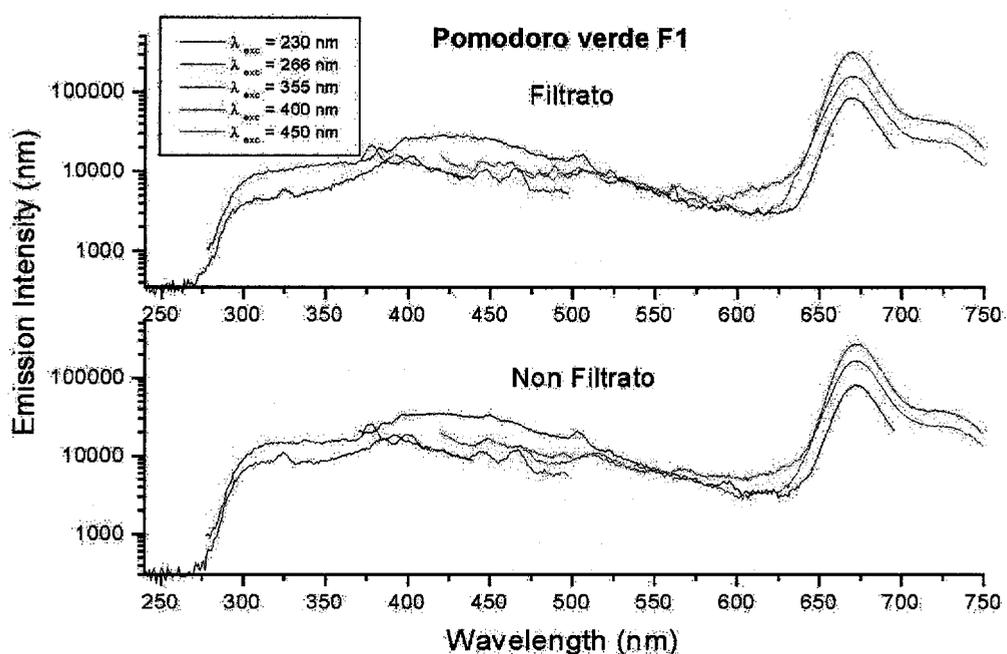


Fig. 5 - Confronto dell'emissione di fluorescenza di pigmenti estratti in metanolo tra campione F1 filtrato (in alto) e non filtrato (in basso)

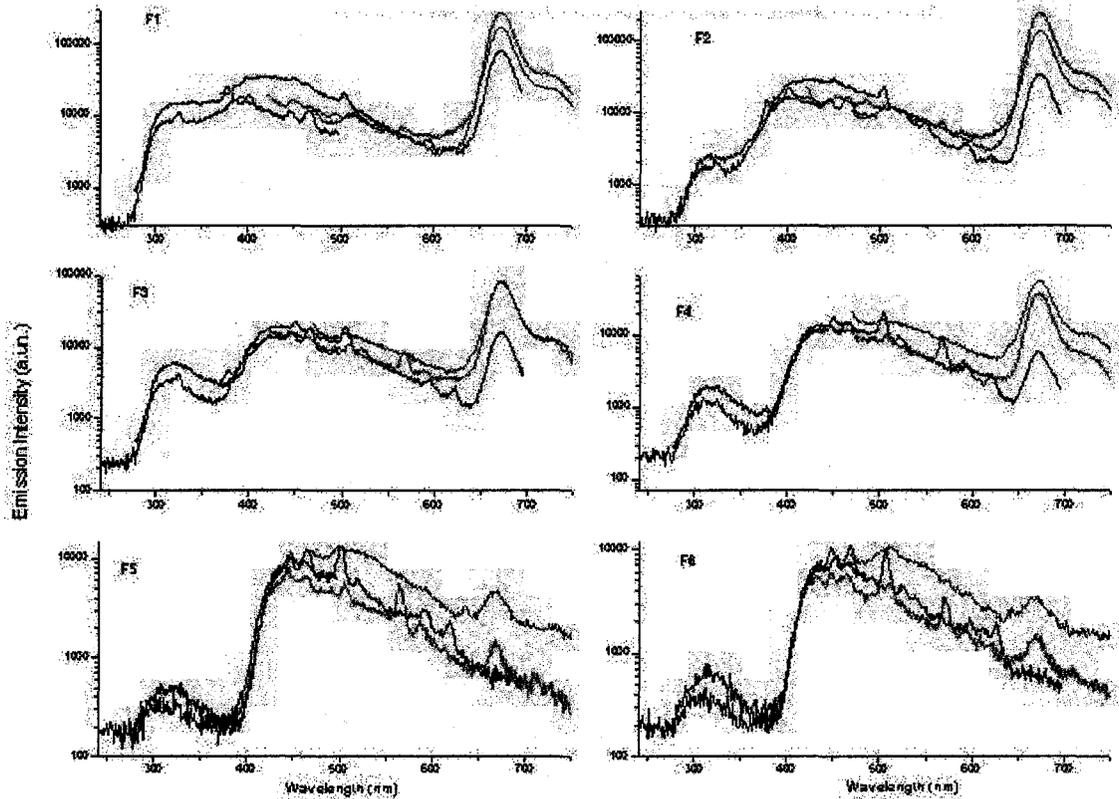


Fig. 6 - Emissione di fluorescenza di pigmenti estratti da bacche di pomodoro a diversi livelli di maturazione

(— $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$; — $\lambda_{exc} = 266 \text{ nm}$; — $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$; — $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$; — $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$)

Gli spettri di fluorescenza ottenuti analizzando gli standard attribuiscono agli antociani, flavonoidi, carotenoidi e clorofilla *a* i principali gruppi di pigmenti fluorescenti identificati. (Fig. 7-10).

Nel caso della Quercetina (flavonolo con tre anelli aromatici e tre gruppi OH) (Fig. 7) sono presenti più bande di emissione (almeno 3 distinte) di intensità confrontabile, una nell'UV (300 nm), una sul blu (fra 450 e 500 nm) e una sul giallo (570 - 580 nm) evidenziate meglio alle due λ di eccitazione 266 e 532 nm. Nella mappa della pelargonidina cloruro (antociano con tre anelli aromatici, 4 gruppi OH e un gruppo chetonico) (fig. 8) invece sono evidenti solo la banda UV (eccitazione 300-350 nm, emissione 330 - 380 nm) e le intense bande rosse eccitate in tutto il visibile con più picchi (i principali a 370 nm e 570 nm) con emissione caratteristica a 600 nm. Anche la clorofilla *a* (fig. 9) presenta uno spettro caratteristico, dominato dall'intensa banda di emissione rossa (680 nm). Lo spettro del β -carotene (fig. 10) invece appare con una banda allargata e poco strutturata che va dal blu al giallo (420 - 580 nm).

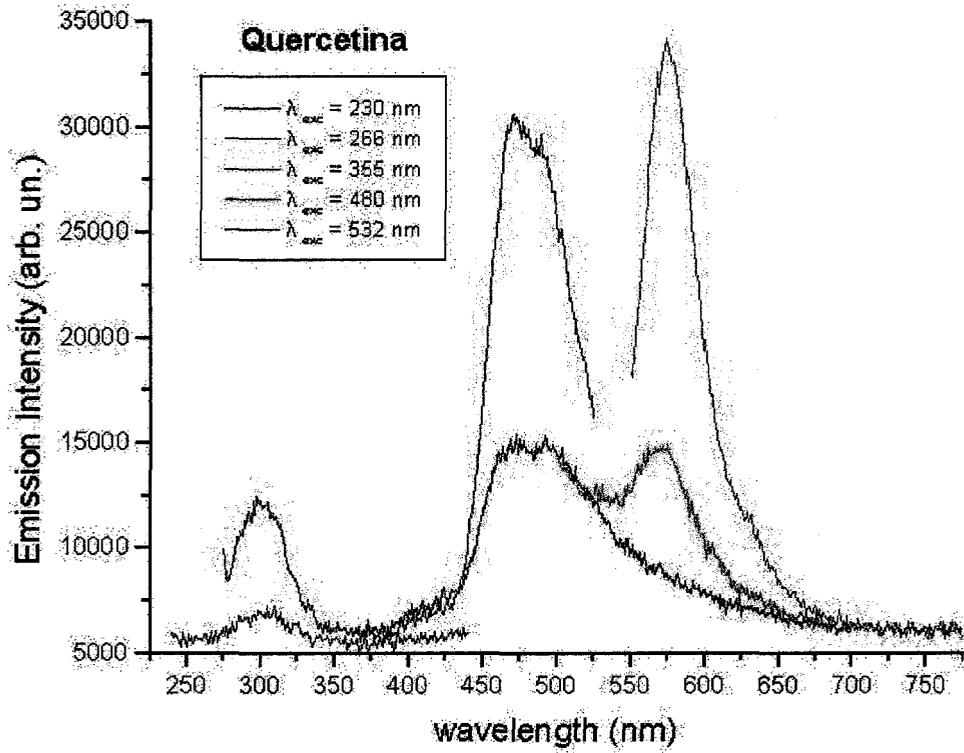


Fig. 7 - Fluorescenza emessa dallo standard Quercetina (favonolo)

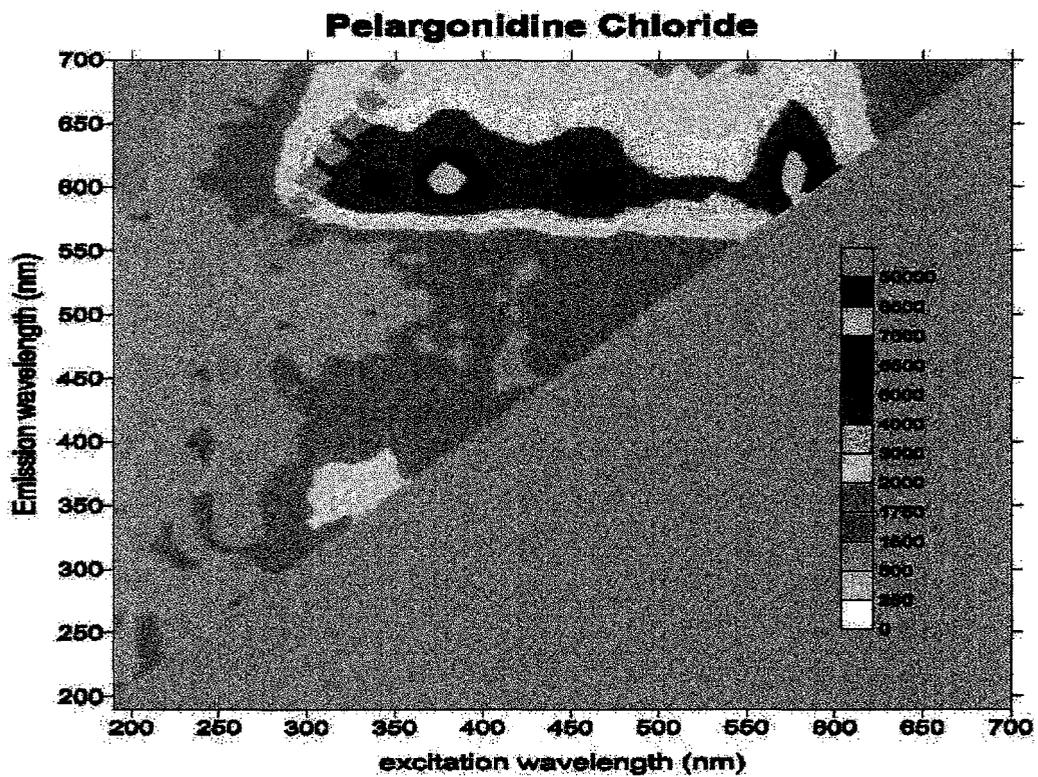


Fig. 8 - Mappa di Fluorescenza emessa dallo standard Pelargonidina cloruro (antociano)

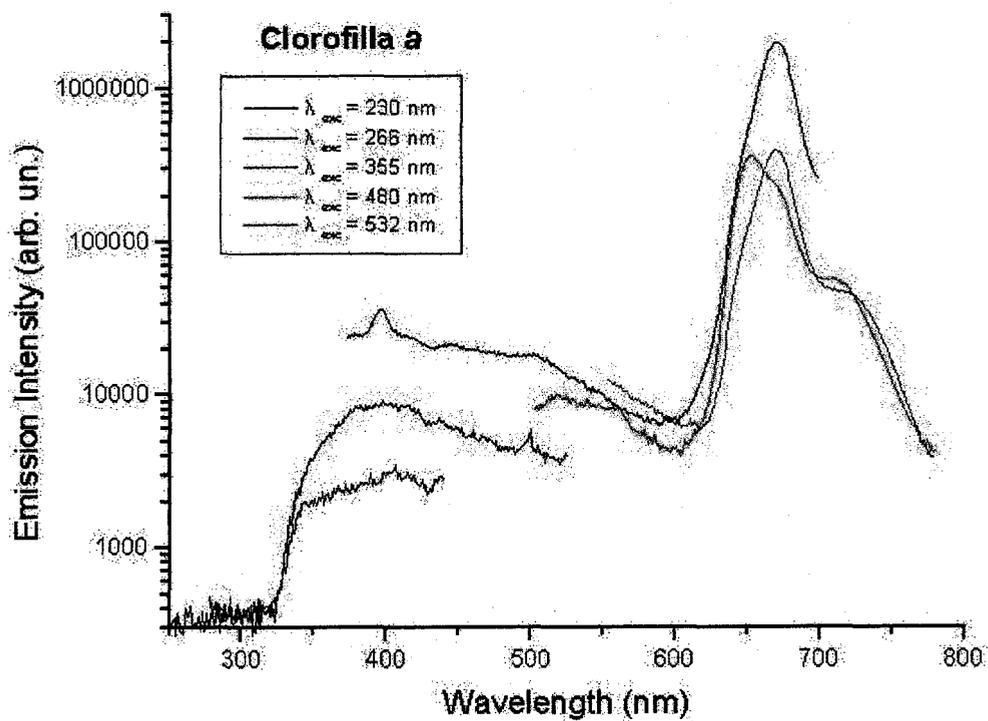


Fig. 9 - Fluorescenza emessa dallo standard Clorofilla a

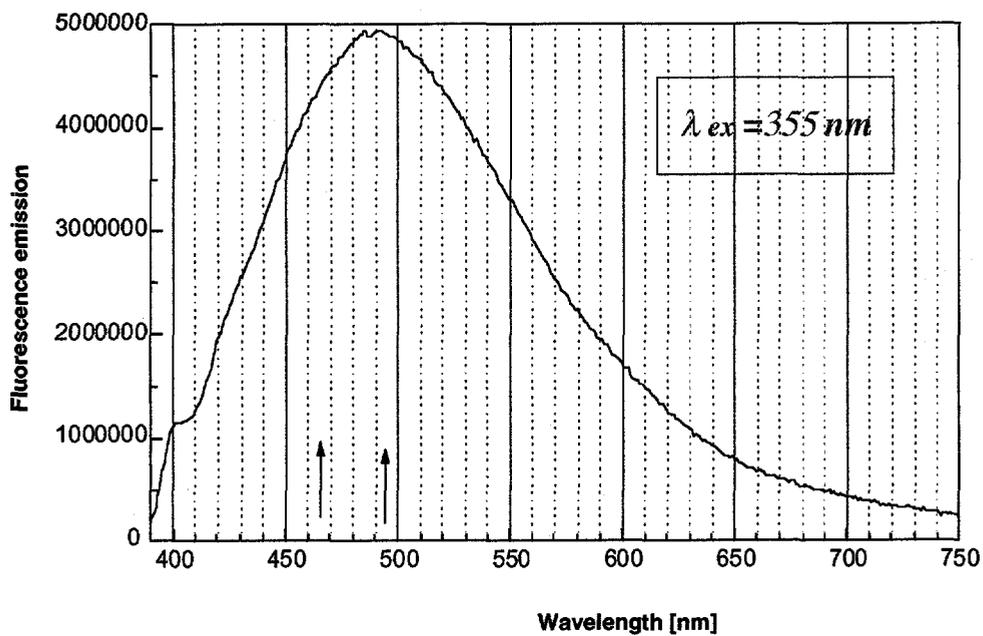


Fig. 10 - Fluorescenza emessa dallo standard β -carotene

Nelle figure 11 sono riportate le mappe dei pigmenti trovati nelle bacche ai 4 stadi di maturazione più rappresentativi. Nel frutto acerbo F1 (fig. 11a) il contenuto in carotenoidi è praticamente nullo mentre aumenta al viraggio del colore del frutto F4 (fig. 11b) e rimane costante fino allo stadio F6, (bacca matura). (fig. 11c) A questo stesso stadio F6, il gruppo di pigmenti identificati nella banda di fluorescenza della clorofilla, presenti già nel frutto immaturo e con intensità diversa anche nel frutto al viraggio F4, scompare così come gli antociani e i flavonoli che erano predominanti (fig. 11a,b,c). Nel frutto F7 (in avanzato stadio di maturazione) (fig. 11d) si ha una condizione fisiologica completamente cambiata. Questa è evidenziata dall'aumento sia degli antociani che dei flavonoli che mostrano una intensità di fluorescenza pari a quelle del frutto immaturo (fig. 11d,a).

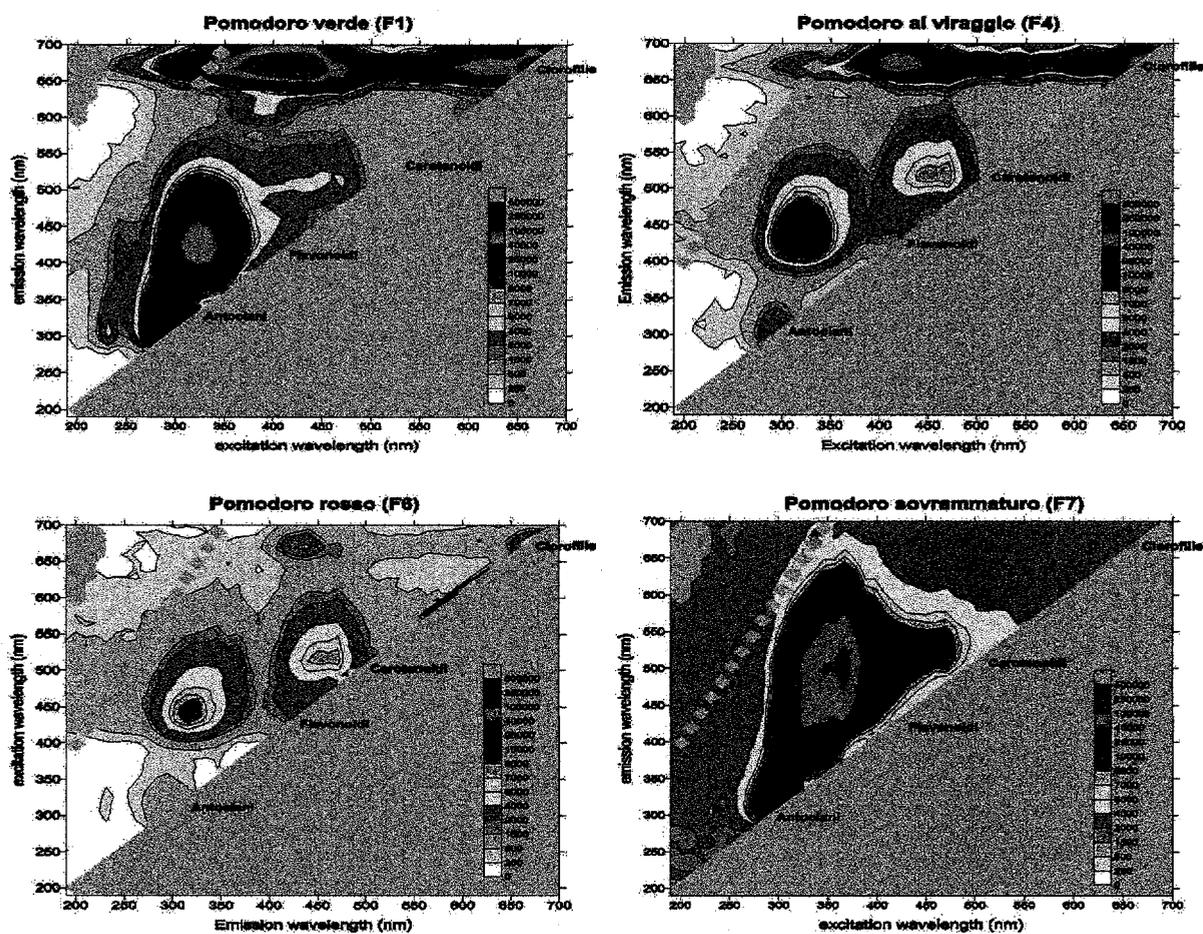


Fig. 11 - Mappe di fluorescenza di pomodori a vari stadi di maturazione (a) F1 immaturo, (b) F4 al viraggio, (c) F6 maturo, (d) F7 sovramaturo.

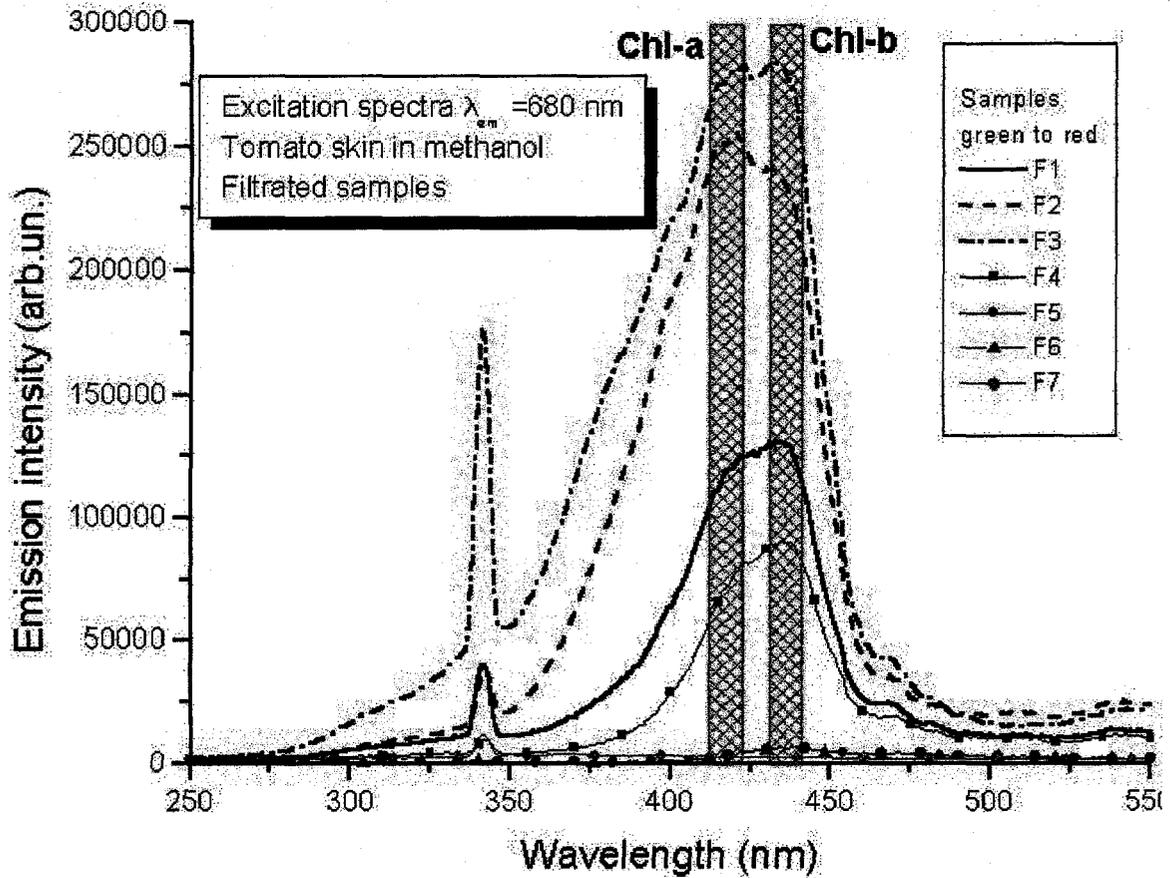


Fig. 12 - Spettro di eccitazione della sola clorofilla estratta dall'epicarpo di bacche a diversi stadi di maturazione

Gli spettri di eccitazione permettono di identificare i diversi tipi di clorofilla presenti nel campione. In particolare, in Fig.12 vengono confrontati le intensità di fluorescenza sia della clorofilla *a* che della clorofilla *b* da F1 passando per i diversi stadi di maturazione del frutto fino a F7. Nelle bacche F1, F2 ed F3 (primi stadi di maturazione) sono evidenti con intensità maggiore rispetto agli altri picchi di assorbimento distinti della clorofilla *a* (435nm) e della clorofilla *b* (470 nm). A partire da F4 la quantità relativa di clorofilla presente nell'epicarpo osserva un andamento decrescente fino alla completa scomparsa. Durante tutto il processo di maturazione si osservano variazioni nel rapporto fra i due tipi di clorofille.

3.2 - Analisi di correlazione

Gli spettri di fluorescenza, ottenuti misurando i pigmenti estratti dall'epicarpo delle bacche a ciascuno stadio di maturazione, sono stati analizzati integrando l'intensità di fluorescenza su bande caratteristiche di ciascun gruppo di pigmenti; l'analisi è stata effettuata utilizzando sia i dati ottenuti sui campioni filtrati che su quelli non filtrati.

Le lunghezze d'onda di eccitazione utilizzate per la generazione delle emissioni di fluorescenza (tabella 2) e degli spettri (Fig. 13) sono quelle disponibili con un laser a Nd:YAG. Le larghezze di banda utilizzate sono state definite a larghezza costante di 10 nm. La scelta delle lunghezze d'onda di eccitazione e delle bande di emissione consente di effettuare misure non invasive di tipo LIF sulla superficie delle bacche intere.

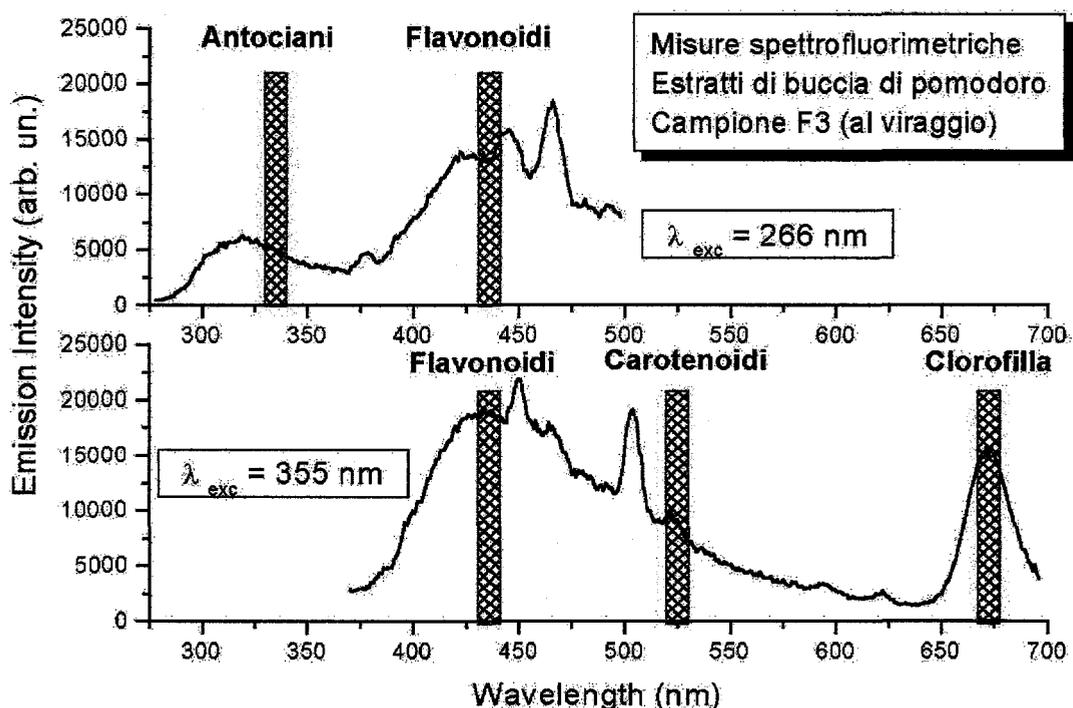


Fig. 13 - Selezione delle bande di integrazione per le analisi di correlazione fra pigmenti fluorescenti e grado di maturazione delle bacche. Campione estratto filtrato F3.

Tabella 2 - Bande dei pigmenti fluorescenti utilizzate nell'analisi dei dati spettrofluorimetrici

Pigmento	λ_{exc} (monocromatica)	λ_{emis} (centro banda)
Antociani	266 nm	335 nm
Flavonoli	266 nm	435 nm
Carotenoidi	355 nm	525 nm (*)
Clorofilla a	355 nm	672 nm (*)

(*) emissioni rivelate anche nel caso di intensa eccitazione laser a 266 nm

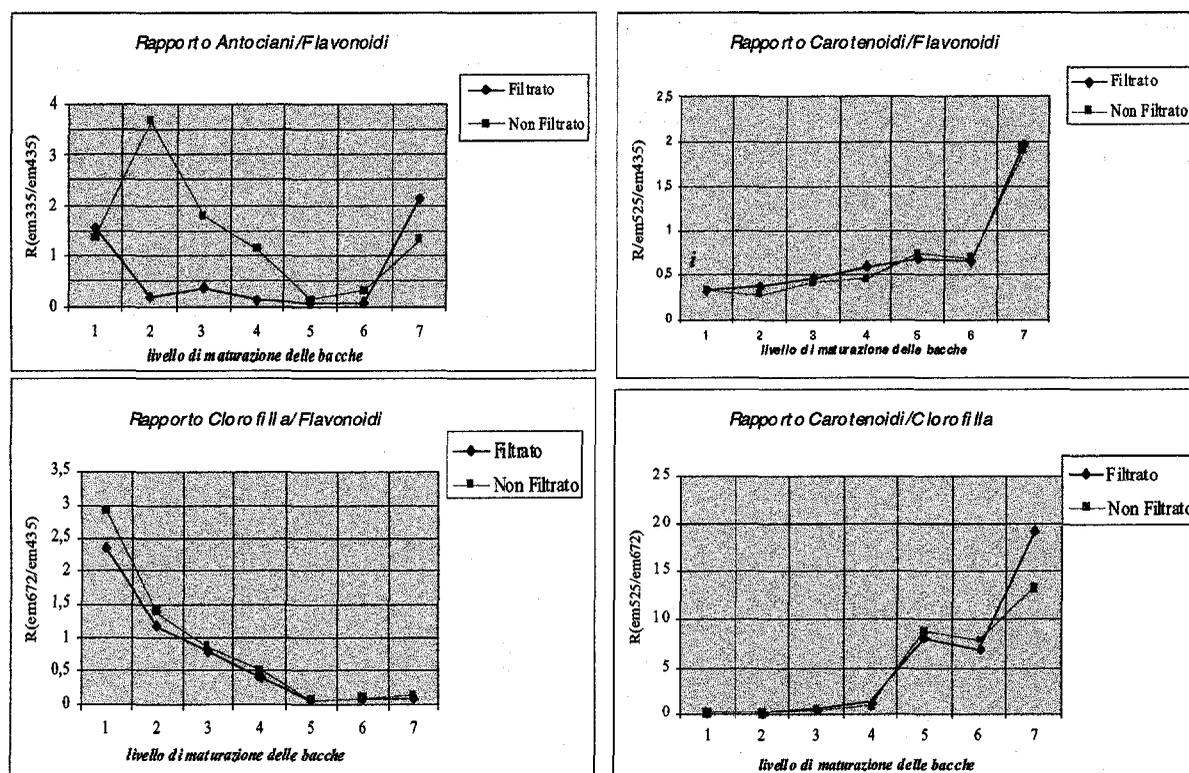


Fig. 14 - Andamento dei diversi rapporti spettrali in funzione del grado di maturazione (crescente) delle bacche.

In assenza di standard interni utilizzabili come riferimento assoluto per l'intensità, i dati sono stati successivamente elaborati ricavando i rapporti spettrali fra le intensità delle diverse coppie di bande. I rapporti spettrali considerati con λ_{ex} 266 nm si riferiscono quindi ad antociani/flavonoidi (R335/435), carotenoidi/flavonoidi (R525/435), clorofilla/flavonoidi (R672/435), e carotenoidi/clorofilla (R525/672). Gli andamenti ottenuti per campioni filtrati e non filtrati sono mostrati in Fig. 14 dove si osservano differenze nel contenuto di pigmenti in relazione alla maturazione del frutto solo nei rapporti spettrali clorofilla/flavonoidi (andamento decrescente) e carotenoidi/clorofilla (andamento crescente).

Per l'analisi di correlazione, non avendo osservato apprezzabili differenze nei rapporti spettrali fra campioni filtrati e non (fig. 13) questi sono stati analizzati insieme; l'unica eccezione è stata fatta per il rapporto spettrale antociani/flavonoidi che è stato analizzato separatamente.

I coefficienti di correlazione ottenuti mettono in evidenza che mentre nel rapporto spettrale clorofilla/flavonoidi e carotenoidi/flavonoidi si ha un coefficiente di correlazione positivo

(0.809 e 0.780 rispettivamente), nel rapporto spettrale carotenoidi/clorofilla si ha un coefficiente di correlazione negativo (-0.513). Il rapporto spettrale antociani/flavonoidi non ha evidenziato invece nessuna correlazione (coefficiente di correlazione 0.089); in quest'ultimo inoltre a partire dal campione F2 fino a quello F4 si osserva una grande differenza tra campioni filtrati e non, ciò è probabilmente dovuto alla fluorescenza emessa dalla cellulosa presente maggiormente nei campioni non filtrati (fig. 14).

I risultati ottenuti evidenziano che, tra i rapporti spettrali considerati, i migliori indicatori del grado di maturazione delle bacche sono:

- clorofilla/flavonoidi con andamento decrescente fino a F6 (diminuzione di entrambi i pigmenti flavonoidi e clorofilla come mostrato in figure 14 e 11c e rilevato dalla correlazione positiva 0.809)
- carotenoidi/clorofilla con andamento crescente (all'aumentare della concentrazione relativa dei carotenoidi diminuisce quella della clorofilla; correlazione negativa -0.513, figg. 14 e 11c).

3.3 - Misure LIF

I risultati ottenuti dall'analisi allo spettrofluorimetro della fluorescenza dei pigmenti presenti nella superficie esterna del pomodoro, hanno permesso di scegliere la radiazione laser da utilizzare per le misure remote con LIF. Essa è stata individuata eccitando nell'ultravioletto a 266 nm.

Nelle Figure 15 e 16 sono riportati gli spettri ottenuti per il campione immaturo (F1) e per quello ad uno stadio avanzato di maturazione (F7). Per entrambe le bacche sono state confrontate diverse zone della superficie: zona superiore e inferiore, zona necrotica, zona rugosa per F7 e zona più verde per il campione F1.

Confrontando gli spettri di fluorescenza indotta con sistema LIF dei pigmenti superficiali dei frutti ai due stadi estremi di maturazione F1 e F7, si osserva che l'emissione di fluorescenza è diversa in relazione allo stadio fisiologico di maturazione della bacca (Figure 15 e 16). In particolare nella bacca immatura si ha una emissione massima di fluorescenza tra i 330 e i 450 nm circa corrispondente alle bande degli antociani e dei flavonoli e un'altra piccola banda intorno ai 530 nm (carotenoidi) (fig. 15); nella bacca matura, invece, il massimo di fluorescenza si ha tra i 450 e 550 nm (carotenoidi) (fig. 16).

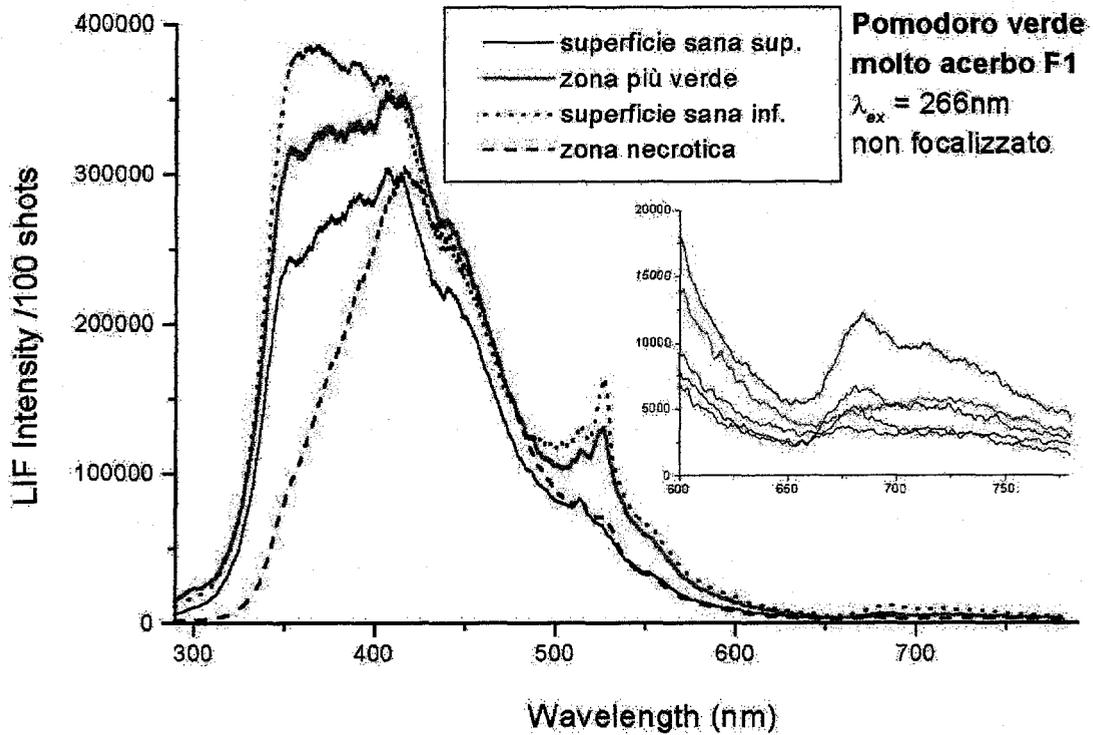


Fig. 15 - Spettro LIF su bacca immatura (eccitazione laser a 266nm). Nell'inserto è espansa la zona sul rosso dello spettro

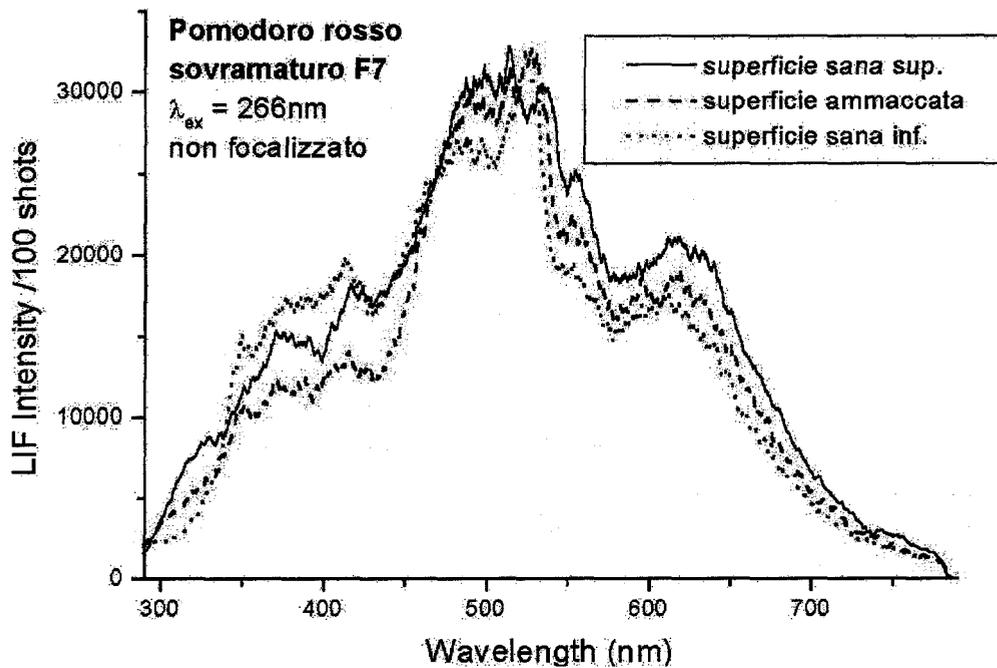


Fig. 16 - Spettro LIF su bacca in uno stato avanzato di maturazione (eccitazione laser a 266 nm).

I risultati ottenuti dal confronto della fluorescenza indotta nelle superficie superiore ed inferiore di ciascun frutto F1 e F7, hanno evidenziato che l'intensità di fluorescenza, ma non l'ampiezza di banda, cambia per ciascuna superficie considerata (figure 15 e 16) indicando una variazione nella concentrazione relativa dei pigmenti considerati. Al contrario nella zona necrotica di F1 la forma delle bande è completamente diverso, infatti il massimo di emissione di fluorescenza si ha a circa 430 nm (flavonoli) mentre la banda di emissione degli antociani sparisce completamente (fig. 15).

Nell'insero della fig. 14 è riportata amplificata l'emissione di fluorescenza nel rosso, corrispondente all'emissione di fluorescenza della clorofilla, ed è interessante notare che, nonostante quest'ultima non sia eccitata in maniera risonante ($\lambda_{ex}=266$ nm), è riconoscibile una banda di emissione fra 670 e 730 nm, tipica della clorofilla stessa. Tale emissione si osserva in entrambe le superfici sane inferiore e superiore (picco intorno ai 680 nm) mentre, sia per la superficie della zona più verde che per quella necrotica tale picco non è più evidenziabile, facendo supporre un ritardo nella biosintesi e una degradazione di tale pigmento rispettivamente nelle due condizioni fisiologiche (fig. 14 insero).

4. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno permesso di assegnare bande di fluorescenza per ciascun pigmento estratto dalla superficie esterna della bacca di pomodoro; in particolare, sono state identificate le principali classi di pigmenti (antociani, flavonoidi, carotenoidi e clorofilla) coinvolte nel processo di maturazione.

A tali pigmenti sono state assegnate bande di fluorescenza, come seguono:

- flavonoidi 3 bande di emissione: una a 300 nm e una fra 450 e 500 nm per $\lambda_{exc}=266$ nm, una fra 570 - 580 nm per $\lambda_{exc}=532$ nm;
- antociani sono evidenti solo: la banda di emissione a 330 - 380 nm ($\lambda_{exc}=300-355$ nm,) e una più intensa banda di emissione a 600 nm ($\lambda_{exc}=370$ nm e 570 nm);
- clorofilla a presenta una banda caratteristica a 680 nm ($\lambda_{exc}=355$ nm,);
- β -carotene banda allargata che va da 420 a 580 nm ($\lambda_{exc}=355$ nm,);

L'intensità di fluorescenza emessa da questi pigmenti, essendo proporzionale alla loro concentrazione relativa, e variando col progredire della maturazione del frutto, risulta essere, quindi, una misura utile per determinarne il giusto grado di maturazione.

E' possibile effettuare il monitoraggio dei pigmenti superficiali e dei danni sul frutto, con tecniche non invasive tramite misure LIF (fluorescenza indotta da laser). In questo, caso l'assegnazione delle bande di fluorescenza, ha permesso di scegliere la radiazione laser di eccitazione più utile, individuata a 266 nm.