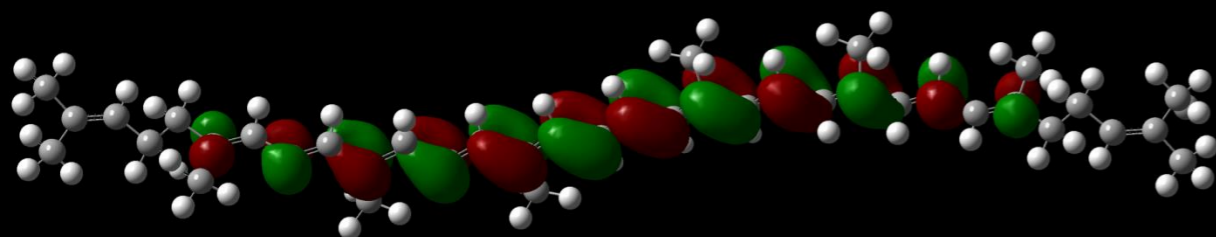


El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido llevar a cabo un estudio experimental y teórico de la estructura, presencia, evolución y estabilidad térmica del  $\beta$ -caroteno y el licopeno, en estado puro y en diversos frutos y matrices biológicas como tomates, zanahorias y mangos empleando técnicas espectroscópicas (Raman e Infrarrojo) así como modelización molecular con métodos DFT.

The main goal of this Doctoral Thesis was to carry out a theoretical and experimental study of the structure, presence, evolution and thermal stability of  $\beta$ -carotene and lycopene, both in pure state and when present in various fruits and biological matrices such as tomatoes, carrots and mangoes using spectroscopic techniques (Raman and infrared) as well as molecular modeling with DFT methods.



ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE SUSTANCIAS CON INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL: ESPECTROSCOPIA RAMAN E INFRAROJA



Madrid  
2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
INSTITUTO PLURIDISCIPLINAR  
UNIDAD DE LÁSERES Y HACES MOLECULARES  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I

DANIEL MARTÍN FERNÁNDEZ

ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE  
SUSTANCIAS CON INTERÉS BIOLÓGICO Y  
NUTRICIONAL:  
ESPECTROSCOPIA RAMAN E INFRAROJA

DIRIGIDO POR:  
Dr. ÁNGEL GONZÁLEZ UREÑA  
Dra. ALICIA GONZÁLEZ GONZÁLVEZ

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Química Física I



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio experimental y teórico de sustancias con interés  
biológico y nutricional: espectroscopía Raman e infrarroja**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Daniel Martín Fernández**

Directores

**Ángel González Ureña**  
**Alicia González González**

**Madrid, 2018**







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
INSTITUTO PLURIDISCIPLINAR  
UNIDAD DE LÁSERES Y HACES MOLECULARES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I

# **ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE SUSTANCIAS CON INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL: ESPECTROSCOPIA RAMAN E INFRARROJA.**

MEMORIA DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR  
LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID PRESENTADA POR

**DANIEL MARTÍN FERNÁNDEZ**

Directores: Dr. Ángel González Ureña

Dra. Alicia González González

Madrid, 2017





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
INSTITUTO PLURIDISCIPLINAR  
UNIDAD DE LÁSERES Y HACES MOLECULARES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I

# **ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE SUSTANCIAS CON INTERÉS BIOLÓGICO Y NUTRICIONAL: ESPECTROSCOPIA RAMAN E INFRARROJA.**

Memoria de investigación para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid presentada por Don Daniel Martín Fernández bajo la dirección de Dr. Ángel González Ureña y Dra. Alicia González González

Dr. Ángel González Ureña

Dra. Alicia González González

Madrid, 2017



*A mi familia*

*A Lorena*



Cuando era un niño, pasaba las horas mirando el firmamento al caer la noche en un pequeño pueblo de La Mancha. Cada día, me formulaba las mismas preguntas relacionadas con el Universo, con las estrellas y con todo lo que nos rodea, pero no encontraba respuestas. En ese momento yo no lo sabía, pero La Ciencia ya formaba parte de mí y no nos íbamos a separar nunca.

Siguiendo mis pasiones, me topé con la química y con todo lo que conlleva, hasta que entré en la Universidad, donde viví los mejores años de mi vida. A lo largo de este periodo, además de contar con el apoyo de mi familia, me he encontrado con personas sin las que no hubiera sido posible llegar hasta aquí. Por ello, considero oportuno utilizar estas líneas para recordar el cariño y apoyo que me han brindado de forma desinteresada a lo largo de esta etapa.

Mis primeras palabras van dirigidas al Catedrático Ángel González Ureña, al que me gustaría agradecerle la valiosa oportunidad que me ha dado y la confianza depositada en mí a lo largo de estos años, necesaria para desarrollar mi Tesis Doctoral en el grupo de investigación que dirige. Su constancia, rigor, capacidad de sacrificio y templanza han sido fundamentales para formarme tanto a nivel personal como profesional y me ayudan a aprender de él constantemente. Además de ser un excelente científico es una persona excepcional que siempre escoge la palabra correcta en el momento adecuado, característica a la que le doy un gran valor.

No quiero dejar pasar esta oportunidad, sin agradecerle a Alicia González González su interés en mis investigaciones y todas las horas dedicadas al trabajar conmigo codo con codo. Su carácter alegre y su contagioso optimismo sirven de inspiración a la hora de dar pasos firmes hacia adelante y son el complemento ideal a mis nervios y ansiedades diarias.

Por otro lado, me gustaría tener unas palabras de gratitud con todas aquellas personas que han formado parte del grupo de investigación en algún momento durante todos estos años (Helmut, Magnus, Vitaly, Rocío, Miguel...) y por supuesto con Pilar (Mari Pili) por esos cafés y charlas interminables arreglando el mundo.

Gracias al esfuerzo diario del personal del Instituto Pluridisciplinar se hace mucho más fácil trabajar y así los proyectos de investigación pueden desarrollarse con normalidad. Por eso, es justo tener unas palabras de afecto hacia ellos: bedeles, limpieza y demás

miembros del equipo administrativo. Adicionalmente, considero necesario hacer una mención especial a los responsables de los talleres asociados al Instituto: Eduardo (Taller Mecánico) y Luís (Taller Electrónico) por sus constantes “apaños” necesarios para la realización de muchos experimentos.

Durante el periodo académico comprendido entre el inicio de la carrera y el final de La Tesis he coincidido con grandes personas que me han mostrado su solidaridad y apoyo en uno u otro momento. Quiero darle las gracias a todos aquellos que compartieron conmigo alguna etapa de la carrera (Marto, Almu, Alvarillas...) y a los que aún a día de hoy siguen compartiendo momentos agradables a mi lado: Paquito, Belén, Nach, María Luque, Crisol...

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se ha realizado una estancia de investigación durante un periodo de 3 meses en la Universidade de Coimbra, concretamente en la Unidade de Investigaçã o e Desenvolvimento Química-Física Molecular. Durante el tiempo que permanecí en Coimbra, tuve la oportunidad de crecer tanto personal como profesionalmente, en gran medida gracias a los componentes del grupo que no dudaron en ningún momento a la hora de prestarme su ayuda.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a la Universidade de Coimbra por permitirme realizar la estancia de investigación y al Profesor Luís A. E. Batista de Carvalho por sus directrices y consejos a lo largo del citado periodo así como por su disposición a la hora de enseñarme nuevas metodologías y técnicas con la única finalidad de aumentar mi formación. En segundo lugar quiero utilizar estas líneas para agradecer a la Profesora Maria Paula Marques su buen trato y actitud desde el momento en el que contactamos por primera vez, para el desarrollo de la estancia, ya que sin su ayuda ésta no habría sido posible. Además, su constancia fue determinante a la hora de analizar los resultados y sus brillantes ideas fueron muy necesarias para avanzar en las investigaciones. En tercer lugar, deseo expresarle toda mi gratitud a la Profesora Ana M. Amado por su paciencia y horas dedicadas prestándome su ayuda para la realización de los cálculos computacionales presentados a lo largo de esta Tesis Doctoral, transmitiéndome sus conocimientos en un campo tan complejo como es el de la química computacional. Por otro lado, me gustaría agradecerle a la Doctora Maria João su dedicación a la hora de ayudarme con la realización de los ensayos de capacidad antioxidante así como en la interpretación de los resultados.

Finalmente, las últimas palabras del tiempo pasado en Coimbra están dedicadas a mis compañeras de laboratorio, no sólo por la ayuda prestada, sino también por su compañía y buenos momentos pasados. Gracias a Adriana Mamede por el tiempo dedicado al explicarme el funcionamiento del equipo de infrarrojo y su disponibilidad para ayudar siempre que fuera necesario; gracias a la Doctora Ana Lucia Batista de Carvalho por su recibimiento durante los primeros días explicándome el funcionamiento del laboratorio, del liofilizador y del ultravioleta y por su interés en que mi investigación llegara a buen puerto; y gracias a la Doctora Inês Lamego, ya que aunque no compartimos el laboratorio durante mucho tiempo siempre sacaba unos minutos para dar ánimos al principio del día.

Los que me conocen, saben que el Tercio Madrileño es parte de mi identidad y de mi alma desde hace más de una década. Me siento orgulloso de pertenecer a este equipo y de que la semilla de sus valores haya germinado en mí a lo largo de estos años. El compañerismo, la lealtad, la solidaridad o la entrega mostrada en el deporte, han servido de sustrato para mi desempeño en otros ámbitos de la vida y me han ayudado a flanquear la adversidad con denuedo, optimismo y esfuerzo.

Me siento muy afortunado de poder llamar amigos a las personas que forman parte de este proyecto, en mayor o menor medida. Todos ellos me han ayudado a evolucionar y me han aportado, cada uno a su manera, el empuje necesario para llegar al final del camino. Gracias a todos los que en algún momento dieron un paso al frente y decidieron unirse al grupo, aunque por circunstancias de la vida ya no estén.

Valoro enormemente la constancia y motivación de Samu, así como la capacidad de sacrificio de Miguel, que espolea a quienes le rodean a entregar lo mejor de sí mismos. Transmitir con franqueza aquello realmente importante, aunque sea duro, huyendo de artificios y léxico edulcorado, es sin duda la mayor de sus virtudes. Gracias a Bata por mostrar su visión del mundo y manifestar esa habilidad innata que contagia a los demás evidenciando que todo es posible y que los límites son, en muchos casos, muros mentales que pueden ser derruidos.

Asimismo, me gustaría dedicar unas palabras de profundo agradecimiento y cariño a todas aquellas personas que consiguen sacar un hueco cada sábado con el único objetivo de pasar unas horas juntos que me llenan de vida.

Gracias a Sergio, Borjita y Salva por esos momentos que compartimos entre risas y que tan necesarios son. Gracias a Cheto por su carácter desenfadado y su buena disposición. Gracias a Rober, Alba y Hugo por su amabilidad y apoyo desinteresado, y por demostrarme cada fin de semana que en la vida hay tiempo para todo. Gracias a Davichín por aderezar con su humor cualquier momento y quitarle hierro al asunto después de la tormenta. Gracias a Jerus por hallar ratos que contribuyen a olvidar la monotonía del día y suponen un balón de oxígeno en mitad de la rutina semanal. Gracias a Juanjo por representar el vivo ejemplo de que la amistad sincera no se rige por dogmas ni ideologías, y por cimentar la relación sobre aquello que nos une enriqueciéndonos con lo que nos diferencia. Gracias a Pata por su autenticidad, así como por observar siempre cada situación desde una óptica distinta. Su generosa forma de irrigar la amistad no atiende a horarios ni distancias. Gracias a Manu por encarnar fielmente el paradigma del compromiso, valor imprescindible en el desarrollo social e individual de cualquier persona que desee crecer y alcanzar sus metas. Gracias a Ojosnegros por su interés e inquietud para conversar con circunspección sobre cualquier tema, aportando sobriedad en cada idea. Gracias a Adri, El Pillo, por esa forma tan especial de transmitir sus opiniones que le hace único y por su enorme destreza a la hora de adoptar y comprender el punto de vista de los demás.

Por último quiero destacar mi agradecimiento a Jorge, El Niñato. Sus consejos y sus bromas me han acompañado desde pequeño. Cada anécdota, cada caída, cada éxito o cada chiquillada de la infancia, han supuesto una muesca más en las ruedas de nuestro tándem. Durante toda nuestra vida hemos avanzado juntos, sorteando los obstáculos y dejando atrás escarpados puertos de montaña. Si yo estoy exhausto él me anima y pedalea con más vigor, cuando él desfallece yo asumo el testigo haciendo que nuestra bicicleta aminore su marcha, pero no se detenga. Gracias por saber escuchar activamente, por analizar el logro y la adversidad con detalle y emitir una opinión certera y meditada tras conocer cada circunstancia.

Me siento muy afortunado de que todos y cada uno de vosotros forméis parte de mi vida. Aunque las obligaciones o las coyunturas personales puedan comenzar a distanciarnos, jamás olvidaré los momentos de los que disfruto a vuestro lado y que hacen de mí, parte importante de lo que hoy soy.

Tomar conciencia de la educación que he recibido hace que pueda afirmar sin ninguna duda, que la familia es un pilar esencial que estimula mi propio crecimiento. Por ello, quiero dedicar unas palabras llenas de afecto a los miembros que componen la mía.

Gracias a la extensa y sólida familia Fernández, a los abuelos, a los tíos y a los primos en su más amplio sentido, por su proximidad y su unión. Todos ellos me han demostrado que la distancia esconde una dulce paradoja. Por un lado, e intrínsecamente implica una difícil separación física, pero por el otro intensifica el apego y permite sentirse muy cerca y anhelar con ilusión el siguiente encuentro. Es como si las emociones pudiesen cruzar el Atlántico en un instante.

Gracias especialmente a los abuelos por haber establecido los fuertes pilares que sustentan con cohesión y firmeza a todos los que integramos esta estirpe. Gracias porque vuestros principios y vuestro amor han convertido a mi madre en un modelo espiritual y humano que ilumina mi camino cuando todo está oscuro. Gracias al abuelo Agapito por su valentía y su coraje ante la búsqueda y la defensa de la verdad y la libertad. Mi madre ha sabido describirme con detalle su figura y legarme en vida todos sus valores. Gracias a la Mimi por la enjundia de sus palabras, siempre rebosantes de contenido e impulsadas por su experiencia, carácter y sensatez.

Gracias a la tía Raquel por abrirme las puertas de su casa al inicio de mi adolescencia y concienciarme sobre la importancia de estudiar Inglés. En ese instante yo no sabía la relevancia que sus consejos tendrían en mi futuro como investigador. Ella es ejemplo de aprendizaje, y símbolo de que con dedicación e interés todo es posible. Recuerdo con gran cariño los días que compartimos durante aquel verano. Gracias a Eugenio, con quien me unen grandes anécdotas y extraordinarios momentos de los que espero seguir disfrutando en el futuro. Su manera de ver la vida y la trascendencia que le concede a la familia son el motor de nuestra relación. Siempre dispuesto a realizar el esfuerzo necesario para juntarnos periódicamente. Gracias a Melissa, su compañía durante los meses que pasé en Portugal y el contacto diario que mantenemos, hacen que la distancia sea más llevadera. Su transparencia, su paciencia y honestidad así como la confianza que de posita en mí, me hacen sentir que estoy junto a la hermana que nunca tuve (LY3S).

Gracias al tío Eduardo y a su familia por su encomiable apoyo y sus demostraciones de amor constantes e incondicionales. Gracias por su generosidad y por encarnar el concepto de familia en su definición más pura y cristalina.

Gracias a la familia Núñez, sé que estarían muy orgullosos de mi llegada al final del camino. La tía Manola y la tía Justa supieron transmitirme todos sus principios esos que me hacen reparar todos los días en la importancia del trabajo y el esfuerzo para lograr los objetivos. Gracias al tío José, él consiguió su sueño de convertirse en ingeniero en una época en la que los recursos escaseaban. Su tesón, duro trabajo y entrega le permitieron alcanzar su meta. Conocer su historia me ha servido de modelo para seguir sus pasos en este arduo sendero. Gracias a todos ellos por brindarme su amor sin fisuras durante todos los días de mi vida.

Mis padres y mi hermano encarnan fielmente el paradigma de familia, a la que me siento muy afortunado de pertenecer no sólo por sus enseñanzas, también por su incondicionalidad. Gracias a mi padre por su entrega y ejemplo cotidiano y por despertar en mí la maravillosa cualidad de la curiosidad. Por enseñarme a ser paciente y discreto. Gracias por su bondad, cariño y comprensión, y por ayudarme a ser mejor persona día tras día. Gracias a mi madre, por su tolerancia, constancia y solidaridad, por sus frases inspiradoras y palabras llenas de amor con el único fin de formarme y orientarme (“ningún camino fácil te llevará a algo que merezca la pena”). Gracias por mostrarme su humildad y moderación, que evocan sentimientos de admiración hacia ella. Por último, gracias a mi hermano, por su complicidad y lealtad, por ser la persona que más me conoce sabiendo en todo momento pronunciar las palabras adecuadas para hacerme sentir bien. Gracias por su honestidad y porque sé que aunque la vida nos lleve por caminos diferentes siempre podré contar con él.

Finalmente, gracias a Lorena, mi compañera de vida y mi principal soporte, la persona que me completa. Nunca ser tan diferentes fue más necesario, y enriquecedor. Durante estos años nos hemos tropezado, caído y levantado en innumerables ocasiones pero siempre juntos, enfrentándonos a los problemas de la mano y atravesando el temporal bajo el paraguas del amor superlativo. Su imprescindible apoyo, sus sabios consejos, su entrega, su nobleza, su empatía y el admirable espíritu de lucha que atesora, hacen que siga creciendo día a día A SU LADO. Elvira, Tomás y Alberto pueden sentirse honrados y satisfechos por haberle inculcado ese acervo de principios que le convierten

en una mujer extraordinaria de la que espero seguir aprendiendo todos los días de mi vida.

Una vez concluido este periodo me encuentro en disposición de empezar a construir el futuro con honestidad, justicia y responsabilidad, tomando como referencia las palabras de Eleanor Roosevelt: *“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”*.



# ÍNDICE



## ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	VII
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	7
PUBLICACIONES.....	13
1. INTRODUCTION.....	19
1.1. Carotenoids: basic concepts and properties.....	21
1.2. Laser and Spectroscopy.....	22
1.3. Raman Spectroscopy .....	24
1.4. Resonance Raman Spectroscopy.....	25
1.5. Transmission Raman Spectroscopy.....	27
1.6. Infrared Spectroscopy.....	28
1.7. Density Functional Theory (DFT) calculations.....	30
1.8. Raman Spectroscopy and carotenoids .....	32
1.9. Motivation, objectives and Structure of the Doctoral Thesis .....	33
1.10. Main objectives and structure of the Doctoral Thesis.....	35
1.11. References .....	39
2. SISTEMAS EXPERIMENTALES: Material y métodos .....	49
2.1. Muestras Biológicas y Patrones de $\beta$ -Caroteno.....	51
2.1.1. Rodajas de zanahoria y mango .....	51
2.1.2. Muestras de Tomates .....	52
2.1.3. Extractos de licopeno.....	52
2.1.4. Pastillas de muestra Patrón .....	53
2.2. Medidas de Espectroscopia UV-Vis.....	53
2.3. Espectroscopia Raman Resonante de Transmisión (TRRS) .....	54
2.3.1. Elección del láser de excitación.....	54
2.3.2. Elección de la configuración .....	56

2.3.3.	Equipo experimental .....	56
2.3.4.	Condiciones experimentales.....	58
2.4.	Espectroscopia Raman Resonante de Transmisión con Luz Linealmente Polarizada (TRRS-LPL) .....	59
2.4.1.	Equipo Experimental.....	60
2.4.2.	Condiciones experimentales.....	62
2.5.	Espectroscopia Raman Resonante con Dispersión a 180° y a 90° .....	63
2.5.1.	Espectroscopia Raman Resonante con sonda en Backscattering.....	65
2.5.2.	Espectroscopia Raman Resonante con Sonda a 90° empleando Luz Polarizada.....	65
2.5.3.	Condiciones experimentales.....	67
2.6.	Espectroscopia Raman Resonante a 514.5 nm.....	67
2.7.	Espectroscopia Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR).....	68
2.8.	Modelización Molecular .....	69
2.9.	Tratamientos Térmicos de las Muestras.....	70
2.10.	Evaluación de la Capacidad Antioxidante .....	70
2.11.	Referencias.....	71
3.	RESULTADOS EXPERIMENTALES I: Espectroscopia Raman de carotenoides .....	75
3.1.	Espectros Raman Resonantes, descripción de bandas fundamentales .....	77
3.1.1.	β-caroteno.....	78
3.1.2.	Licopeno.....	84
3.2.	Distribución Espacial de β-caroteno y configuración molecular en rodajas de zanahoria mediante Espectroscopia de Transmisión Raman Resonante .....	95
3.3.	Polarización de las bandas Raman .....	99
3.3.1.	Polarización a espesor variable a 180° en zanahoria.....	100
3.3.2.	Variación del cociente de despolarización en muestras con espesor fijo a 180° .....	103

3.3.2.1.	Variación del cociente de despolarización en pastillas de patrón de $\beta$ -caroteno a diferentes concentraciones .....	104
3.3.2.2.	Variación del cociente de despolarización en rodajas de mango con el tiempo .....	105
3.4.	Evolución de la intensidad de las bandas Raman durante la postcosecha de los frutos .....	107
3.4.1.	Tomates Cherry .....	109
3.4.2.	Tomates Rambo.....	110
3.5.	Evolución de la polarización con el tiempo a $90^\circ$ .....	111
3.6.	Evolución del cociente $v_4/v_1$ con el tiempo .....	113
3.7.	Referencias .....	115
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES I.....	121
4.1.	Espectros Raman Resonantes, descripción de bandas fundamentales .....	123
4.2.	Distribución Espacial de $\beta$ -caroteno y configuración molecular en rodajas de zanahoria.....	129
4.3.	Polarización de las bandas Raman. Modelo teórico.....	134
4.3.1.	Aspectos previos y modelo teórico.....	134
4.3.2.	Polarización a espesor variable a $180^\circ$ en zanahoria.....	137
4.3.3.	Polarización a espesor fijo a $180^\circ$ .....	139
4.4.	Modelo teórico para las intensidades Raman .....	145
4.5.	Cálculos desarrollados aplicando el modelo .....	150
4.6.	Evolución de la intensidad de las bandas Raman durante la postcosecha de los frutos .....	152
4.7.	Evolución de los cocientes de despolarización durante la postcosecha de los frutos .....	159
4.8.	Evolución del cociente $v_4/v_1$ con el tiempo .....	162
4.9.	Referencias .....	164
5.	RESULTADOS EXPERIMENTALES II: Degradación térmica de carotenoides.....	169

5.1.	$\beta$ -Caroteno.....	171
5.1.1.	Espectroscopia Raman Resonante a 514.5 nm.....	171
5.1.2.	Estudio de la Degradación Térmica de $\beta$ -caroteno Mediante Espectroscopia Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR).....	173
5.1.3.	Actividad Antioxidante $\beta$ -caroteno y su evolución temporal.....	185
5.2.	Licopeno.....	187
5.2.1.	Espectroscopia Raman Resonante de Licopeno a 514.5 nm.....	187
5.2.2.	Estudio de la Degradación Térmica Licopeno Mediante Espectroscopia Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR).....	191
5.3.	Modelización Molecular.....	194
5.3.1.	$\beta$ -Caroteno Método mPW1PW91.....	195
5.3.1.1.	Estructura.....	196
5.3.1.2.	Orbitales HOMO y LUMO.....	196
5.3.1.3.	Espectro IR del $\beta$ -caroteno.....	200
5.3.1.4.	Espectro Raman del $\beta$ -caroteno.....	201
5.3.2.	Licopeno Método mPW1PW91.....	202
5.3.2.1.	Estructura.....	202
5.3.2.2.	Orbitales HOMO y LUMO.....	203
5.3.2.3.	Espectro IR del licopeno.....	206
5.3.2.4.	Espectro Raman del Licopeno.....	206
5.4.	Referencias.....	208
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES II.....	211
6.1.	Análisis cinético de los datos experimentales.....	213
6.1.1.	$\beta$ -caroteno.....	214
6.1.1.1.	Constantes cinéticas.....	214
6.1.1.2.	Cálculo de energía de activación.....	217
6.1.2.	Licopeno.....	220
6.1.2.1.	Cálculo de constantes cinéticas.....	220

6.2. Modelización Molecular.....	222
6.2.1. Retinal.....	224
6.2.1.1. Estructura .....	224
6.2.1.2. Orbitales HOMO y LUMO .....	225
6.2.1.3. Espectro IR del retinal.....	226
6.2.2. $\beta$ -apo-13-carotenona.....	228
6.2.2.1. Estructura .....	228
6.2.2.2. Orbitales HOMO y LUMO .....	228
6.2.2.3. Espectro IR de la $\beta$ -apo-13-carotenona.....	230
6.2.3. $\beta$ - apo-14'-carotenal .....	231
6.2.3.1. Estructura .....	231
6.2.3.2. Orbitales HOMO y LUMO .....	231
6.2.3.3. Espectro IR del $\beta$ -apo-14'-carotenal .....	232
6.2.4. $\beta$ -apo-14`-carotenol .....	233
6.2.4.1. Estructura .....	234
6.2.4.2. Orbitales HOMO y LUMO .....	234
6.2.4.3. Espectro IR del $\beta$ -apo-14'-carotenol.....	235
6.2.5. $\beta$ - apo-10'-carotenal .....	236
6.2.5.1. Estructura .....	236
6.2.5.2. Orbitales HOMO y LUMO .....	236
6.2.5.3. Espectro IR del $\beta$ -apo-10`-carotenal .....	238
6.3. Comparación de estabildades .....	239
6.4. Comentarios sobre el mecanismo de degradación térmica .....	240
6.5. Referencias .....	243
7. CONCLUSIONES.....	247
8. CONCLUSIONS .....	253
APÉNDICE I.....	XI

Apéndice I.a.....	XIII
Apéndice I.b.....	XV
Referencias .....	XVIII
APÉNDICE II .....	XIX
Referencias .....	XXXV
APÉNDICE III.....	XXXVII
APÉNDICE IV.....	LXVII
Lista de Figuras: .....	LXIX
Lista de Tablas.....	LXXVII

# **GLOSARIO DE TÉRMINOS**



---

6-31G*	Seis funciones de polarización Gaussianas tipo <i>d</i> .
ATR	Reflectancia Total Atenuada
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CEF	Factor de Mejora del Carotenoide
DF	Filtro Dicroico
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FPB	Filtro de paso de banda
FWHM	Anchura a Media Altura
GTP	Polarizador Glan Taylor
HOMO	Orbital Molecular más Alto Ocupado
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
IR	Infrarrojo
IUPAC	Unión Internadional de Química Pura y Aplicada
LUMO	Orbital Molecular más Bajo Desocupado
<i>mPW1PW91</i>	Funcional de Intercambio Modificado de Perdew-Wang 1-Parámetro y Perdew Wang 91
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos
OD	Densidad Óptica
PMS	Pectin Metil Esterasa
PP	Peridermis con Periciclo
RRS	Espectroscopia Raman Resonante
PTMP	Periodo de Maduracion del Post-viraje

SORS	Espectroscopia Raman Resuelta Espacialmente
SP	Floema Secundario
SX	Xilema Secundario
TRRS	Espectroscopia Raman de Transmisión Resonante
TRRS-LPL	Transmisión Raman Resonante con Luz Linealmente Polarizada
TRS	Espectroscopia Raman de Transmisión
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VC	Cambium Vascular
U.A.	Unidades de Absorbancia
$\omega$ B97xD	Funciona Híbrido Doble Basado en Correcciones de Larga Distancia B97

# **RESUMEN**



## Introducción

Es bien sabido que los carotenoides son compuestos que poseen un alto poder antioxidante y su presencia en la dieta humana tiene grandes beneficios no solo desde el punto de vista nutricional, sino también en la prevención de enfermedades. A modo de ejemplo, se sabe que el  $\beta$ -caroteno es el principal precursor de la vitamina A y que el licopeno juega un papel fundamental en la prevención del cáncer de próstata. Dado que los seres humanos no son capaces de sintetizar carotenoides y por ello deben ingerirlos en la dieta, resulta de enorme interés el estudio de dichos compuestos en frutos.

## Objetivos

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido llevar a cabo un estudio experimental y teórico de la estructura, presencia, evolución y estabilidad térmica del  $\beta$ -caroteno y el licopeno, en estado puro y en diversos frutos y matrices biológicas como tomates, zanahorias y mangos empleando técnicas espectroscópicas (Raman e Infrarrojo) así como modelización molecular con métodos DFT.

## Metodología

Para lograr los objetivos antes citados, se han aplicado técnicas espectroscópicas experimentales (Raman e infrarrojo). En relación con la primera metodología, se han empleado las siguientes modalidades: (1) Transmisión Raman Resonante, (2) Transmisión Raman Resonante con Luz Linealmente Polarizada, (3) Espectroscopia Raman de dispersión a  $180^\circ$  y con polarización a  $90^\circ$ , todas ellas usando una excitación láser de 532 nm y/o 514.5 nm y en relación con la segunda metodología (4) Espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada. Las técnicas (2) y (3) se han desarrollado y puesto a punto durante este trabajo.

Con dichas técnicas se ha estudiado: (1) el contenido y evolución de los carotenoides mencionados en distintos frutos (tomates, zanahorias y mangos) a lo largo del proceso de maduración, (2) su distribución espacial en los distintos tejidos del fruto, (3) la evolución temporal del cociente de despolarización de las bandas Raman más intensas en función de la maduración del fruto bajo estudio y (4) la estabilidad térmica tanto de extractos de licopeno como de patrones de  $\beta$ -caroteno monitorizando la evolución temporal de determinadas bandas del carotenoide inicial en función del tiempo de calentamiento y la temperatura. Desde un punto de vista teórico, para el análisis de la estabilidad térmica de

los carotenoides señalados así como de los posibles productos de degradación, se emplearon dos métodos de cálculo computacional *ab Initio*: mPW1PW91 y  $\omega$ B97xD, asistidos por la misma base de cálculo para ambos 6-31G\*.

### Resultados

Gracias a la espectroscopía Raman se han medido los modos vibracionales más significativos de algunos carotenoides presentes en muestras biológicas e inorgánicas; obteniéndose resultados muy similares para todos los casos estudiados, a modo de ejemplo, los encontrados en zanahorias fueron:  $\nu_1$  ( $1522\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  ( $1158\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_3$  ( $1008\text{ cm}^{-1}$ ) y  $\nu_4$  ( $955\text{ cm}^{-1}$ ) asociados a las vibraciones de tensión (-C=C-) y (-C-C-), balanceo (-CH<sub>3</sub>) y flexión fuera del plano (-CH) respectivamente.

Por otra parte, valiéndonos de la intensidad de la banda correspondiente al modo vibracional  $\nu_1$  se ha estudiado un mapa de la distribución espacial del  $\beta$ -caroteno en las distintas zonas de la raíz de la zanahoria. Además, a través del cociente de las intensidades de las bandas  $\nu_4/\nu_1$ , se ha logrado extraer información acerca de la conformación espacial del polieno en los distintos tejidos y estructura morfológica de la matriz biológica.

Se ha estudiado la variación del cociente de despolarización en diversos tipos de muestras (zanahorias y patrones) tanto en función del espesor como en función de la concentración, encontrándose un comportamiento similar para ambas con el aumento de la densidad óptica. Con estos estudios se ha desarrollado un modelo teórico que ha permitido calcular algunos parámetros ópticos como el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión.

Asimismo, mediante la medida de la intensidad Raman de la banda  $\nu_1$  en función del tiempo, se ha seguido el proceso de maduración en diversos tipos de tomates, observándose una tendencia general para todos ellos. Las muestras analizadas, presentaban una intensidad de la banda  $\nu_1$  prácticamente constante en las etapas iniciales, que posteriormente aumentaba hasta llegar a un máximo seguido de un descenso monótono a medida que el fruto alcanzaba su etapa final de maduración.

Además, se ha desarrollado un modelo teórico, cinético y espectroscópico para estudiar la variación de la señal Raman y los cocientes de despolarización de los distintos modos vibracionales de los carotenoides en tomates durante el proceso de maduración. Dicho modelo describe la evolución postcosecha satisfactoriamente empleando únicamente tres

parámetros fundamentales: la sección eficaz Raman, la sección de atenuación del láser y la sección de atenuación de la intensidad Raman.

Otro de los resultados significativos, tiene que ver con el estudio de la estabilidad térmica del  $\beta$ -caroteno y del licopeno. Las muestras fueron calentadas a diferentes temperaturas con el fin de medir la cinética de su degradación térmica. El análisis de los datos ha permitido concluir que dicho proceso puede describirse mediante un proceso cinético de primer orden con una energía de activación para el caso del  $\beta$ -caroteno de  $(51 \pm 3)$  kJ/mol.

Finalmente, en base a los cálculos *ab Initio* de modelización molecular se pudieron evaluar las estabildades iniciales de los dos polienos bajo investigación, así como de algunos productos de degradación del  $\beta$ -caroteno, todos ellos pertenecientes a la familia de los apocarotenales, entre los que cabe destacar el retinal.

### Conclusiones

Las conclusiones más importantes de este trabajo son:

1. Se han medido los modos vibracionales y determinado las anarmonicidades de los más intensos del  $\beta$ -caroteno y del licopeno en diferentes muestras a través de la espectroscopia Raman resonante de transmisión, dispersión a  $180^\circ$  y a  $90^\circ$ . Dichas medidas han permitido obtener la distribución espacial del  $\beta$ -caroteno en muestras de zanahoria, y observar la heterogeneidad de su distribución. Por otro lado, mediante la medida del cociente de las intensidades  $\nu_4/\nu_1$  se ha obtenido información sobre la conformación espacial del  $\beta$ -caroteno en los distintos tejidos del fruto.
2. Se ha medido el cociente de despolarización de la banda  $\nu_1$  y  $\nu_2$  en frutos de zanahoria y en pastillas de patrón encontrando una pauta general, ya que el citado parámetro aumentaba con la concentración y con el espesor. Además, se estudió la evolución de dicho cociente en rodajas de mango comparándose con la pérdida de masa por evaporación. Todas estas medidas, han sido posibles gracias a una nueva técnica que ha sido desarrollada y puesta a punto a lo largo de esta Tesis Doctoral.
3. Se ha desarrollado un modelo teórico que ha permitido obtener valores de los coeficientes de absorción y de dispersión asociados a las bandas  $\nu_1$  y  $\nu_2$  del  $\beta$ -caroteno obteniéndose los valores de  $\mu_a^{\parallel}(\nu_1) = (0.20 \pm 0.01) \text{ mm}^{-1}$  y  $\mu_a^{\parallel}(\nu_2) = (0.45 \pm 0.02) \text{ mm}^{-1}$  para los coeficientes de absorción y de  $\mu_s(\nu_1) = (1.1 \pm 0.1) \text{ mm}^{-1}$  y  $\mu_s(\nu_2) = (1.0 \pm 0.1) \text{ mm}^{-1}$  para los de dispersión.

4. La medida de la señal Raman de los carotenoides presentes en tomates con el paso del tiempo, ha revelado una evolución de la señal  $\nu_1$  muy similar para todos casos investigados ya que ésta permanece constante durante los tiempos iniciales y posteriormente aumenta hasta alcanzar un máximo para finalmente decaer a medida que se alcanza la etapa final de maduración. Adicionalmente, se encontró que el cociente de despolarización de la banda  $\nu_1$  apenas variaba durante la evolución post-cosecha del fruto. Con los datos anteriores, se desarrolló un modelo teórico cinético y espectroscópico capaz de describir de forma satisfactoria la evolución temporal de la señal, empleando el coeficiente de velocidad de la síntesis de carotenoides, y el coeficiente de dispersión de la luz.

5. Se ha estudiado la estabilidad térmica del  $\beta$ -caroteno y del licopeno mediante espectroscopía Raman resonante e infrarroja a distintas temperaturas. Las constantes cinéticas calculadas fueron: [ $T = 90\text{ °C} \rightarrow k = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ ], [ $T = 100\text{ °C} \rightarrow k = (3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ ], [ $T = 115\text{ °C} \rightarrow k = (5.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ ] y [ $T = 130\text{ °C} \rightarrow k = (11.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ ] para el caso del  $\beta$ -caroteno, y [ $T = 115\text{ °C} \rightarrow k = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ ] para el licopeno. Además, se ha determinado la energía de activación de la reacción de descomposición del  $\beta$ -caroteno obteniéndose un valor de  $(51 \pm 3)\text{ kJ/mol}$ .

6. Se han analizado mediante dos métodos DFT *mPW1PW91* y  $\omega$ B97xD tanto los reactivos como algunos productos esperables de la degradación, empleando el conjunto de bases 6-31G\*. Esto ha permitido confirmar la presencia de algunos productos de degradación que presentaban buenas coincidencias entre los resultados calculados y los obtenidos experimentalmente. Dichos productos pertenecen a la familia de los apocarotenales, donde destaca el retinal, que es el que muestra una mayor similitud. Este estudio, ha confirmado algunas etapas clave del mecanismo de oxidación del  $\beta$ -caroteno en presencia de oxígeno atmosférico.

# **ABSTRACT**



## Introduction

It is well known that carotenoids are compounds that possess a high antioxidant power and that their presence in the human diet has great benefits not only from the nutritional point of view but also in disease prevention. For example,  $\beta$ -carotene is known to be the main precursor of vitamin A and lycopene plays a key role in the prevention of prostate cancer. Since humans are not able to synthesize carotenoids and therefore they have to intake such pigments, the study of these compounds in fruits seems crucial from the nutritional and medical point of views.

## Objectives

The main goal of this Doctoral Thesis was to carry out a theoretical and experimental study of the structure, presence, evolution and thermal stability of  $\beta$ -carotene and lycopene, both in pure state and when present in various fruits and biological matrices such as tomatoes, carrots and mangoes using spectroscopic techniques (Raman and infrared) as well as molecular modeling with DFT methods.

## Methodology

In order to reach the aforementioned objectives, experimental spectroscopic techniques (Raman and infrared) have been applied. Related with the first methodology, the following modalities have been used: (1) Transmission Resonance Raman, (2) Transmission Resonance Raman with Linear Polarized Light, (3)  $180^\circ$  and  $90^\circ$  scattering Raman spectroscopy, all using a laser excitation source of 532 nm and/or 514.5 nm. In relation with the second methodology the following techniques were employed: (4) Infrared spectroscopy with attenuated total reflectance. Techniques (2) and (3) have been developed and fine-tuned during the present work.

The mentioned experimental methods have been applied to study: (1) The content and evolution of the carotenoids in different fruits (tomatoes, carrots and mangoes) throughout the maturation process, (2) Their spatial distribution in different tissues of the fruit, (3) The temporal evolution of the depolarization ratio of the most intense Raman bands as a function of the maturation period and (4) The thermal stability of both, lycopene extracts and  $\beta$ -carotene standards by monitoring the temporal evolution of certain bands of the initial carotenoid as a function of heating time and temperature. From a theoretical point of view, two ab initio methods of computation were used: *mPW1PW91* and  $\omega$ B97xD both

assisted by the same calculation base, 6-31G\* to investigate the carotenoid thermal stability as well as the possible degradation products.

## Results

Thanks to Raman spectroscopy, we have measured the most significant vibrational modes of some carotenoids present in biological and inorganic samples; obtaining similar results for all cases, for instance the observed vibrational modes in carrots are described as follow:  $\nu_1$  (1522  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  (1158  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_3$  (1008  $\text{cm}^{-1}$ ) and  $\nu_4$  (955  $\text{cm}^{-1}$ ) associated with the stretching vibrations (-C=C-), and (-C-C-), rocking (-CH<sub>3</sub>) and out of plane wagging (C-H) respectively.

On the other hand, a map of the spatial distribution of  $\beta$ -carotene in the different zones of carrot roots has been studied using the intensity of the vibrational mode  $\nu_1$ . In addition, through the  $\nu_4/\nu_1$  ratio, it has been possible to obtain information about the spatial conformation of the polyene in different tissues as well as the morphological structure of the biological matrix.

The variation of the depolarization ratio in different types of samples (carrot roots and pure samples) has been studied as a function of the thickness and concentration, finding that in both cases the variation of the this optical parameter was directly related to the change of the sample optical density. This result permitted us to develop a theoretical model capable to describe the experimental results and calculate some optical parameters such as the absorption and the dispersion coefficient.

Likewise, by measuring the Raman intensity of the  $\nu_1$  band as a function of time, the maturation process was followed in different types of tomatoes, observing a general trend for all of them. The analyzed samples showed a  $\nu_1$  band intensity practically constant in the initial stages, which later increased reaching a maximum followed by a monotonous descent as the fruit reached its final maturation stage.

Furthermore, a theoretical, kinetic and spectroscopic model has been developed in order to study the variation of the Raman signal and the depolarization ratio of the tomato carotenoid vibrational modes during the maturation process. This model describes the post-harvest evolution satisfactorily using only three fundamental parameters: The Raman cross-section, the laser attenuation cross-section and the Raman attenuation cross-section.

Another significant result is related with the study of the thermal stability of  $\beta$ -carotene and lycopene. The samples were heated at different temperatures in order to measure the kinetics of their thermal degradation. The analysis of the data, has allowed us to conclude that this process can be described by a first-order kinetic process with activation energy for  $\beta$ -carotene of  $(51 \pm 3)$  kJ/mol.

Finally, based on *ab Initio* molecular modeling calculations, the initial stabilities of the two polyenes under investigation, as well as those of some apocarotenal degradation products of  $\beta$ -carotene, in particular that of retinal, have been evaluated.

## Conclusions

The main conclusions of the present work are described as follow

1. We have measured the vibrational modes and the anharmonicities of the most intense bands of  $\beta$ -carotene and lycopene in different samples through Transmission Resonance Raman Spectroscopy and Raman scattering at  $180^\circ$  and  $90^\circ$ . These measurements revealed the heterogeneity of the  $\beta$ -carotene spatial distribution in carrot root tissues. On the other hand, by measuring the  $\nu_4/\nu_1$  intensity ratio information on the spatial conformation of  $\beta$ -carotene was obtained in the different tissues of the fruit.
2. The depolarization ratio of  $\nu_1$  and  $\nu_2$  bands of  $\beta$ -carotene both in carrot roots and in prepared pellets was measured, finding the general trend that it increased as concentration or thickness does. In addition, the evolution of this ratio was studied in mango slices in which it was compared to the loss of mass by evaporation. These measurements have been possible thanks to the new Raman technique developed throughout this Doctoral Thesis.
3. A theoretical model has been developed that allowed to obtain values of the absorption and dispersion coefficients associated with  $\beta$ -carotene  $\nu_1$  and  $\nu_2$  bands. The optimal values were:  $\mu_a^\parallel(\nu_1) = (0.20 \pm 0.01) \text{ mm}^{-1}$  and  $\mu_a^\parallel(\nu_2) = (0.45 \pm 0.02) \text{ mm}^{-1}$  for the absorption coefficients and  $\mu_s(\nu_1) = (1.1 \pm 0.1) \text{ mm}^{-1}$  and  $\mu_s(\nu_2) = (1.0 \pm 0.1)$  for the scattering coefficients.
4. The measurement of the Raman signal of carotenoids present in tomatoes as a function of time has revealed a very similar evolution of the  $\nu_1$  signal for all cases under investigation. It was constant during the initial ripening process, and then increased until reaching a maximum followed by a post-maximum decay as the final ripening stage was

reached. Additionally, it was found that the depolarization ratio of the  $\nu_1$  band hardly changed during the post-harvest evolution of the fruit. With the above data, a kinetic and spectroscopic theoretical model was developed which satisfactorily described the temporal evolution of the signal, using the rate coefficient of the carotenoid synthesis and the fruit scattering coefficient.

5. The thermal stability of  $\beta$ -carotene and lycopene has been studied by resonance Raman and infrared spectroscopy at different temperatures. The deduced kinetic constants were:  $[T = 90 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$ ,  $[T = 100 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$ ,  $[T = 115 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (5.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$  and  $[T = 130 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (11.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$  for the  $\beta$ -carotene and  $[T = 115 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$  for the lycopene. In addition, the activation energy of the  $\beta$ -carotene decomposition reaction has been determined obtaining a value of  $(51 \pm 3) \text{ kJ/mol}$ .

6. The two carotenoids and some expected degradation products have been analyzed using two different DFT methods *mPW1PW91* and  $\omega$ B97xD, and employing the 6-31G\* basis set. These studies confirmed the presence of some degradation products by comparing the calculated with the experimental spectra. These products belong to the family of apocarotenals, where the retinal was the one that showed the greater similarity between experimental and theoretical spectra. This study has confirmed some key steps in the oxidation mechanism of  $\beta$ -carotene in the presence of atmospheric oxygen.

# **PUBLICACIONES**



## Publicaciones

El presente trabajo ha dado lugar a la publicación de tres artículos cuya primera página se muestra a continuación.

FOOD STRUCTURE 2 (2014) 61–65

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foostr](http://www.elsevier.com/locate/foostr)

## Insights into the $\beta$ -carotene distribution in carrot roots



A.G. Gonzalez<sup>a</sup>, D. Martin<sup>a</sup>, K. Slowing<sup>b</sup>, A. Gonzalez Ureña<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Láseres y Haces Moleculares, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Paseo Juan XXIII-1, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 December 2013

Received in revised form

31 March 2014

Accepted 17 September 2014

Available online 28 September 2014

#### Keywords:

Carotenoids

Raman spectroscopy

Carrot root

### ABSTRACT

This work reports the carotenoid spatial distribution in orange carrot roots measured by Transmission Resonance Raman Spectroscopy. Raman contour mappings of root cross-sections were measured over the spectral range from 500 to 2500  $\text{cm}^{-1}$  as a function of the root radius. The overall  $\beta$ -carotene content reveals a heterogeneous distribution predominantly concentrated in the secondary phloem tissue and periderm. Furthermore, detailed measurements of the  $\nu_4$  band intensities, the wagging mode associated to the  $-\text{CH}$  out-of-plane motion, show how the higher relative values occur in the secondary phloem and the lower ones near the vascular cambium. This vibrational mode profile was correlated with changes in  $\beta$ -carotene molecular configuration depending on the different physiological properties of the investigated root tissues.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human beings do not synthesize carotenoids and, therefore, they need the intake of such pigments to convert them into retinoids (Biesalski, Chichil, Frank, von Lintig, & Nohr, 2007; Mendes-Pinto, 2013), like retinal (the main visual pigment) or, if the carotenoids contain a  $\beta$ -ring, to produce retinol, i.e., the precursor of vitamin A (Goodwin, 1986). In addition, the carotenoid ability of quenching singlet oxygen confers them significant antioxidant properties that are relevant in the prevention of several human diseases.

In general, carotenoids are mostly found in red-, orange- and yellow-colored fruits and vegetables, being the carrot root one of the richer sources of these pigments and the orange rooted the most familiar variety nowadays, those which predominantly contain  $\beta$ -carotene (Goodwin, 1986).

The carotenoid content of carrot roots is well-known as it has been widely investigated by different techniques being one of the most powerful the Raman technique and, in particular, that of resonant Raman spectroscopy due to its spectral simplification as well as its enhanced sensitivity.

The main Raman vibrational bands of  $\beta$ -carotene, usually denoted as  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$ ,  $\nu_4$  are associated (Tschirner et al., 2009) with  $-\text{C}=\text{C}-$  ( $\nu_1$ ) and  $-\text{C}-\text{C}-$  ( $\nu_2$ ) stretch vibrations,  $-\text{CH}_2$  ( $\nu_3$ ) rocking motion and  $-\text{CH}$  ( $\nu_4$ ), out-of-plane motion, respectively.

While the wavenumber position of the  $\nu_1$  band is correlated with the length of polyene chain being also sensitive to the molecular conformation (cis or trans) of the molecule (Koyama et al., 1982) the intensity of the  $\nu_4$  band is sensitive to the carotenoid configuration, i.e., distortions from the planar configuration (Gruszecki et al., 2009; Lutz et al., 2002; Ruban et al., 2007). Thus, this band can be a weak with little structure band indicating a relaxed planar configuration or, on the contrary, a more intense and structured band indicating out-of-plane distortion of the molecule.

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943260.

E-mail address: [laseres@pluri.ucm.es](mailto:laseres@pluri.ucm.es) (A. Gonzalez Ureña).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foostr.2014.09.001>

2213-3291/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

# Linear Polarized Transmission Resonance Raman Studies in Fruits: Experimental Versus Model Calculations

Daniel Martín, Alicia G. González, Franziska Buesing, Ángel González Ureña\*

Unidad de Láseres y Haces Moleculares, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Juan XXIII-1°, 28040 Madrid, Spain

A linear polarized transmission resonance Raman spectroscopic technique was developed to measure the depolarization ratio of different  $\beta$ -carotene Raman bands in carrot roots and mangos. Basically, this optical property was measured as a function of the vegetal tissue thickness and fruit postharvest lifetime. In general, the depolarization ratio increases as the sample optical thickness does and decreases as the fruit postharvest lifetime increases. In addition, a previous theoretical model was extended by considering the light state of polarization to obtain the depolarization ratio as a function of the sample absorption and scattering coefficient. It was shown how the reported theoretical model is able to satisfactorily describe the fruit optical parameter dependence on both the sample thickness and its postharvest time. Finally, the advantages and limitations of the present technique and theoretical mode are discussed.

**Index Headings:** Raman spectroscopy; Light polarization; Postharvest fruit; Absorption coefficients; Scattering coefficient.

## INTRODUCTION

In general, biological tissues contain many constituents of different composition and are opaque to near-infrared radiation due to the complex relation between light absorption and light scattering, the two dominant processes for light interaction with biological materials such as food.

While absorption is related to components of food such as water, sugars, chlorophylls, and carotenoids, light scattering depends more on tissue structure such as size, density of cells, and cellular environment. This explains how infrared and Raman spectroscopy have emerged as modern techniques for non-destructive monitoring of food quality.

In a previous study,<sup>1</sup> a laser spectroscopic technique was presented that combined transmission and resonance-enhanced Raman inelastic scattering, which provided an increased signal-to-noise ratio and enhanced analytical sensitivity, respectively. The application of this technique to analyze  $\beta$ -carotene in fruits permitted a limit of detection of the order of hundreds of picograms. In the same study, a model of the Raman signal dependence on the sample thickness was developed and successfully applied to investigate the  $\beta$ -carotene content in both standards and carrot roots.

In the present work, an extension of that technique was made to incorporate the use of linear polarized light both

in the incident and in scattered photon fluxes. This improvement allowed the measurement of depolarization ratios for the resonant Raman bands observed in the fruit samples under investigation. Accordingly, the previously developed theoretical model was also modified to take into account the linear polarization of the excitation laser as well as of the inelastically scattered light.

It is well known that polarized Raman spectroscopy has emerged as a powerful technique for investigating molecular ordering in condensed phases and biological materials.<sup>2–5</sup> Thus, for example, polarized resonance Raman spectra of carotenoids in biological matrices of carrot were studied and compared with those of  $\beta$ -carotene in acetonitrile solutions.<sup>6</sup> These authors found the carotenoid bandwidths in carrot matrices are significantly narrower than in liquid solution. Furthermore, the carotenoid depolarization ratios in liquid solutions were also found to be smaller than those of carrot matrices.

These differences were rationalized by the existence of a significant inhomogeneous component to the Raman line of  $\beta$ -carotene in liquid solution. In other words, the increasing orientation or alignment order results in decreasing inhomogeneity in carrot matrices leading to the band narrowing. Likewise, the increasing degree of order of  $\beta$ -carotene in carrot samples with respect to those of liquid solutions was also involved to justify the higher depolarization ratios observed in the biological matrices.

In addition to these orientation order effects, it is well known that the orientation of linear polarized light is randomized by scattering during propagation through biological tissues. As a matter of fact, this randomization is more rapid in birefringent than in non-birefringent tissues,<sup>7</sup> a property that was used with imaging superficial tissues with polarized light.

The motivation in the development of the present linear polarized transmission resonance Raman spectroscopy technique was to measure the fruit optical parameters as a function of fruit thickness and postharvest time, for example, to monitor the depolarization ratio of selected Raman bands, and to use these optical parameter data to gain insight into the fruit physical status (e.g., molecular ordering, degree of compactness or fluidity, degree of maturity) during its postharvest life.

In this picture, the starting hypothesis assumes that the depolarization ratio observed in a biological (fruit) tissue depends not only on the symmetry of the investigated Raman band, but also on the tissue optical thickness, which can change during the postharvest life and, consequently, with the fruit degree of maturity.

Received 5 December 2014; accepted 16 January 2015.

\* Author to whom correspondence should be sent. E-mail: laseres@pluri.ucm.es.

DOI: 10.1366/14-07832



## Modeling Tomato Ripening Based on Carotenoid Raman Spectroscopy: Experimental Versus Kinetic Model

Daniel Martin, Alicia G. Gonzalez, Rocio Mateos Medina, and Angel González Ureña

### Abstract

This work reports on a combined experimental and theoretical investigation on the carotenoid Raman signal in several tomato fruits during their postharvest time evolution and ripening. Both resonant ( $180^\circ$ ) backscattering and polarized ( $90^\circ$ ) Raman scattering were used to monitor the most prominent bands of carotenoid (lycopene and  $\beta$ -carotene) evolution in different tomato varieties. Relevant findings of the present investigations were that while the depolarization ratio of the  $\nu_1$  band hardly changed with time, the Raman  $\nu_1$  band intensity did change showing a similar pattern for all tomatoes investigated. Indeed, all cases investigated revealed a rise of the carotenoid signal coincident with the onset of the turning stage of the fruit ripening, a pronounced maximum of the Raman signal followed by a post-maximum decline at the red ripening stage. A kinetic model has been developed to describe the time evolution of the observed Raman signatures based on the rate coefficient of the carotenoid synthesis and the time evolution of the scattering coefficient of the fruit. The model describes satisfactorily the tomato evolution through the distinct ripening stages providing new insight on the assessment of the postharvest fruit control and quality.

### Keywords

Fruit scattering coefficient, postharvest life time, Raman spectroscopy, tomato ripening

Date received: 14 July 2016; accepted: 31 October 2016

### Introduction

The important metabolic properties of the carotenoids, such as  $\beta$ -carotene and lycopene, normally associated with their antioxidant properties as well as the benefits produced by their consumption, are nowadays responsible for carotenoid-rich fruits such as, for example, carrot roots and tomatoes, which constitute basic ingredients of human dietary consumption.

Since the tomato is one of the fruits most consumed in the human diet, the measurement of its degree of ripeness is crucial to asset its postharvest quality.

There are six well-established stages of ripeness (i.e., green, breaker, turning, pink, light red, and red) for red-fleshed tomatoes according to their surface color.<sup>1</sup> Tomatoes are often picked unripe (green) and ripened in storehouses with ethylene in order to avoid losses in transportation and storage. Nevertheless, if they are picked in an early stage, the unripe green stage, the fruit will not ripen to a quality and flavor suitable for consumption and when they are picked too late one may risk the fruit quality and increase postharvest losses.

Typically, for tomatoes at their green stage, the ripening process is accompanied by the accumulation of carotenoids, mainly  $\beta$ -carotene and lycopene, which are first generated within the interior of the fruit and later manifested by the change of skin color from green to deep red. Hence, determination of the maturity of the fruit based on surface color exclusively may not be adequate for determining the tomato-ripening status.<sup>2</sup>

There is a rich variety of nondestructive techniques which have been applied for assessing carrot and tomato carotenoid contents or ripening, among which some optical examples include: surface color measurement to assess lycopene content,<sup>3</sup> near-infrared (NIR) spectroscopy to

Unidad de Láseres y Haces Moleculares, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

### Corresponding author:

Angel González Ureña, Unidad de Láseres y Haces Moleculares, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Juan XXIII-1º, 28040 Madrid, Spain.

Email: laseres@pluri.ucm.es



# **1. INTRODUCTION**



## 1. INTRODUCTION

This Thesis is dedicated to the study of the molecular structure and spectroscopy of two important carotenoids,  $\beta$ -carotene and lycopene, using experimental and theoretical methods. The experimental techniques used in this study are Attenuated Total Reflectance-Infrared (ATR-IR) and several modalities of Raman Spectroscopy. With respect to the theoretical methods, distinct Density Functional Theory (DFT) methods together with various kinetic and spectroscopic models are employed. The investigation carried out in the present work focussed on the electronic and vibrational structure of the pure carotenoid and, in addition, on their spatial distribution, molecular order and temporal evolution, for instance, when they are part of the biological tissues in distinct fruits like, for instance, carrots, tomatoes and mangos.

**Chapter 1** first introduces the scientific background including the basic concepts and most relevant features of the experimental and theoretical methods employed in the Thesis. The goal of this chapter is to refresh some ideas and developments to describe the scenario in which to put into context the current status of the field and, secondly, to summarize the scientific motivations we had to pursuit the Thesis and to outline the main objectives of our work rather than to compile an ample tutorial or a comprehensive review on the subject.

### 1.1. Carotenoids: basic concepts and properties

According to de International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Nomenclature, carotenoids are chemical substances built with eight  $C_5$  isoprenoid units. Derivatives with more  $C_5$  units joined as in the  $C_{40}$  skeleton can also be considered as carotenoids. In addition, removal of one or both ends of the carotenoid molecule can result in shorter chain carotenoids, referred to as apocarotenoids<sup>1</sup>. Due to the presence of such isoprene units, most of these compounds form a long chain with alternating double and single bonds responsible to their main biochemical functions<sup>2</sup>.

These pigments can be classified into two main groups, namely (i) the xanthophyll group formed by violaxanthin, lutein, canthaxanthin, astaxanthin, to cite but a few examples, and which contain oxygen in their structure and (ii) carotenes like, for example,  $\beta$ -carotene, and lycopene which only contain carbon and hydrogen in their structure<sup>3</sup>. The most widespread carotenoids in nature are  $\beta$ -carotene and lutein although lycopene is also present in many fruits like tomato.

Carotenoids and chlorophyll, the most predominant natural products<sup>4-6</sup>, can be found in all photosynthetic organisms<sup>7</sup> such as photosynthetic bacteria, algae and plants<sup>8</sup>. These products are responsible for the red-orange color in some vegetables and fruits<sup>5</sup> due to visible light absorption by the high double C=C bonds conjugation<sup>9-11</sup>.

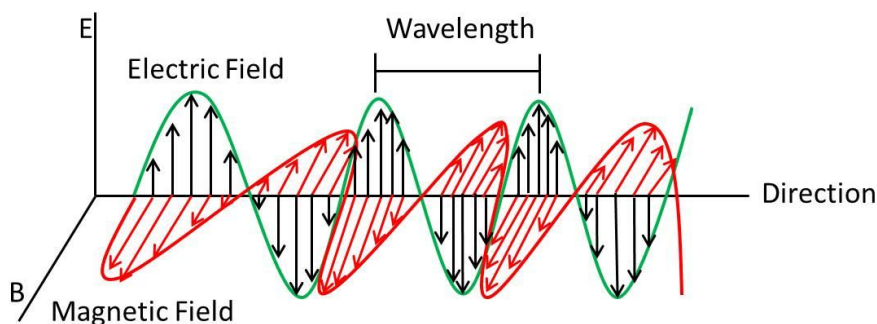
In plant matrices, carotenoids are typically present in the all-*trans* configuration, which is thermodynamically the most stable isomer<sup>12-15</sup>. Carotenoids play an important role in photosynthesis as light-harvesting complexes; essentially, when these molecules absorb light, in their ground electronic state the first excited singlet takes place, the so-called <sup>1</sup>carotene is generated and energy transfer to a photoresponsive pigment (chlorophyll) takes place starting photosynthesis process<sup>16, 17</sup>. In addition, carotenoid molecules suppress damaging photochemical reactions, in particular those including oxygen.

Human beings do not synthesize carotenoids and, therefore, they need the intake of such pigments directly from fruits and vegetables or from manufactured products<sup>18</sup> in order to convert them into retinoid<sup>19, 20</sup>, like retinal (the main visual pigment) or, if the carotenoids contain a  $\beta$ -ring, to retinol, i.e., the precursor of vitamin A<sup>21</sup>, the key pigment in vision.

### 1.2. Laser and Spectroscopy

Spectroscopy is the study of the interaction of atoms and molecules present in matter with electromagnetic radiation<sup>22, 23</sup> through absorption or emission of radiation energy. This discipline is widely used in many fields, like astronomy<sup>24</sup>, physics<sup>25, 26</sup> and chemistry<sup>27-30</sup> because it provides information at the molecular level of the system under study.

As it is well known, laser spectroscopy has revolutionized the science and technology in multiple fields; this revolution is seen very clearly in chemistry<sup>27</sup> to give just one example. If we want to understand the fundamental processes of laser spectroscopy it seems essential to comprehend the nature of the electromagnetic radiation. This radiation is the combination of an oscillating electric and magnetic field, mutually perpendicular. A beam of this kind of radiation can propagate through the space carrying the energy from one location to another as can be seen in Figure 1.1.



**Figure 1.1:** An electromagnetic wave with perpendicular electric and magnetic field.

Electromagnetic radiation is characterized by its wavelength ( $\lambda$ ) and by its frequency ( $\nu$ ). The wavelength,  $\lambda$ , is the distance between successive wave peaks, or even in two successive points with the same phase. The frequency,  $\nu$ , is the number of successive points having the same phase that pass a given point in time unit<sup>31</sup>.

As in this section our attention is focused in Raman spectroscopy, and this technique uses a laser beam, it is relevant to mention some characteristics of this type of radiation: The laser light has the following specific properties:

*Brightness:* Is defined as the power emitted by the laser source per emitting surface unit and per solid angle unit. The high intensity facilitates the industrial applications, such as ablation processes and is fundamental in research for the fragmentation phenomena produced by multi-photon absorption<sup>27</sup>.

*Monochromatic character:* The light emitted has very narrow distribution of its wavelength which allows the interaction of the laser with molecules to be very selective. This characteristic is crucial not only for the possibility to excite certain functional groups but to probe chemical reactions whose products absorb radiation at a specific wavelength.

*Polarization:* The light whose electric field vector oscillates in a single plane is called polarized light. In most laser outputs, the light is polarized. The polarization of the laser light provides the required tool to study the vectorial character of the elementary chemical reaction, the so-called *Stereodynamics of chemical reactions*, as well as the molecular spatial distribution.

*Directionality:* In conventional light sources, the photons travel in all directions randomly. Nevertheless, in laser radiation, all photons follow the same direction, which allows the laser beam to travel long distances before spreading, due to its low angular divergence.

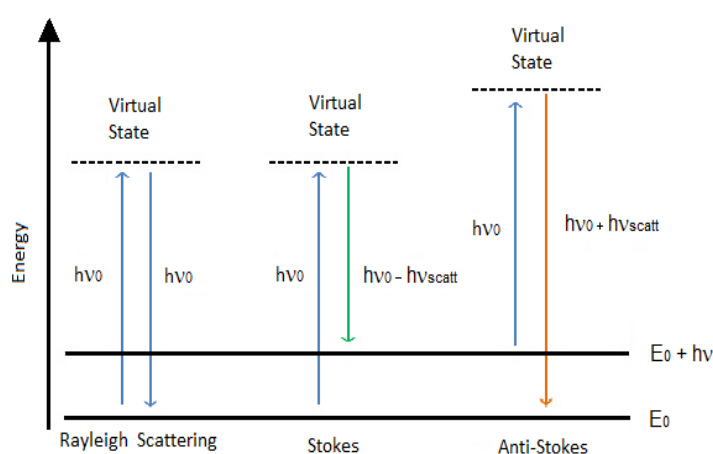
*Coherence:* Normal radiation sources are incoherent because the electromagnetic waves associated to any photon with the same wavelength are out of phase. The photons of the laser radiation are in phase, during the time and along the displacement in space, this property allows the existence of pulsed lasers, making possible the study of chemical reactions in real time down to a few femtoseconds ( $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$ ).

### 1.3. Raman Spectroscopy

When the light interacts with the matter, photons can be absorbed or scattered. In the latter case, the photons can have the same energy as the incident light (elastic scattering), being this phenomenon the most probable, or different energy (inelastic scattering) leading to the well-known Raman effect. Thus, Raman spectroscopy is a branch of spectroscopy focused on inelastic scattered light.

When the scattered light has different frequency in comparison with the incident one, it could be higher, when the excitation occurs from the ground state to higher vibrational level (Raman Stokes), or by the contrary, lower frequency than that of the incident light, (Raman Anti-Stokes); to observe the latter result with enough signal to noise ratio, it is necessary that the molecules populate a vibrational excited state before light interaction, this vibrational state distribution can be enhanced by, for example, heating the gas sample.

Figure 2, shows how the photon-molecule collision scatters the light. This collision changes the energy of the incident photons and therefore the molecule vibrational state<sup>32</sup>.



**Figure 1.2:** Jablonsky diagram representing quantum energy transitions for Rayleigh and Raman scattering.

When the photon-matter interaction occurs, there is a short time when the absorption takes place. This leads to a change in the molecular state from the ground state ( $S_0$ ) to a virtual state, in which the non-stable complex light-molecule is formed<sup>33</sup>, different from the first excited state ( $S_1$ ). The next step is when the molecule returns to the ground state. In this process, a small part of the photons exchanges energy with the molecules, producing the above-mentioned changes in their frequency. This effect was observed by C. V. Raman in 1928<sup>34</sup>.

The Raman spectra are represented as a function of the Raman shift. This parameter represents for the difference between the incident excitation frequency ( $\nu_0$ ) and the frequency of the scattered photons ( $\nu_{\text{scatt.}}$ ). Depending on the effect taking place, i.e. Stokes or Anti-Stokes, this value can be positive (Raman Stokes),  $\Delta\nu_R = (\nu_0 - \nu_{\text{scatt.}}) > 0$ , or negative (Raman Anti Stokes)  $\Delta\nu_R = (\nu_0 - \nu_{\text{scatt.}}) < 0$ .

Usually, the Raman scattering is a very low probability phenomenon ((only one in  $10^6$ - $10^7$ ): However, with the correct experimental setup, it can be used as a routine technique in a research laboratory. The Raman signal intensity ( $I$ ) is proportional to the square of polarizability ( $\alpha$ ), the number of active molecules ( $N$ ), the laser power intensity ( $I_0$ ) and the fourth power of the frequency  $\nu_0$ <sup>32, 35-37</sup>.

#### 1.4. Resonance Raman Spectroscopy

One way to circumvent the limitation associated to the very low probability of conventional Raman scattering is through the Resonance Raman Spectroscopy (RRS). This Raman spectroscopic variant employs a laser frequency close to the frequency of an electronic transition (resonance) in order to significantly enhance by several orders of magnitude the Raman signal. As a result, the RRS becomes a much more sensitive and selective technique due to the scattering signal improvement and the coupling of a few vibrational modes with the resonant electronic transition of the chromophore, respectively. It should be noted that the latter effect also causes a spectral simplification which facilitates the molecular identification and assignment of specific vibrational modes

Since fluorescence is a process approximately  $10^6$  times more likely than Raman scattering, care should be taken when selecting the excitation frequency which should not coincide with the maximum of the electronic absorption band; rather it should be within the band wing in order to reduce as much as possible the fluorescence background underlying the Raman signal.

Resonant Raman Spectroscopy was first observed by Harrand et al. in 1946<sup>38</sup> when it was noticed that a solution of dichloronitrobenzene showed a very strong enhancement of the Raman signal if the employed wavelength was within the molecular absorption band. They also noticed that only the vibrational modes affected by the electronic transition were observed, a crucial feature that caused a considerable simplification of the spectrum which, in addition, contained sharp and high-intensity peaks. Thanks to the high sensibility, and to the high signal improvement, this technique has attracted considerable attention and is nowadays widely used not only in modern spectroscopy and life sciences, but also in the study of carbon nanotubes, mineral and pigments, as well as natural products like carotenoids. A few representative examples of the current situation a few representative examples are described below.

In the field of life sciences, RRS has been widely used to investigate the structure and functions of nucleic acids and their related bases like for example the study of cytosine and other nucleobases by various groups<sup>39-42</sup>. Specifically, Burova et al. 2013<sup>43</sup>, were able to determine the tautomeric composition of the water solution of cytosine through theoretical and experimental Raman and Resonance Raman spectroscopy using different wavelengths, temperature, and pH.

Resonance Raman Spectroscopy is also the ideal technique to investigate the structure and function of proteins and metalloproteins. In particular, the latter contain metal ions forming biological-active centers where electron transfer between ligand and metal dominates the actual protein activity. Thus, the use of RRS at distinct excitation wavelengths makes possible the selective excitation of local structures in proteins with more than one metallic center. Hence, high sensitivity techniques can provide local information not available in conventional Raman scattering<sup>44</sup>. Additional studies have been reported<sup>45, 46</sup> on the RRS application to investigate the drug-protein interactions as well as proteins structure and dynamics.

Another field in which RRS is widely used is in the investigation of carbon nanotubes, mineral, and pigments. Carbon nanotubes possess chemical, electrical and mechanical properties that make those very useful not only from the scientific point of view but also for technological development. Accordingly, selective methods are required to implement their characterization and assess their purification processes; this technical demands are well provided by the selectivity and sensitivity of RRS. Related with recent studies carried

out by RRS we shall mention two groups<sup>47, 48</sup>, who spectroscopically characterized single wall carbon nanotubes and linear carbon chains encapsulated in multiwalled carbon nanotubes, respectively.

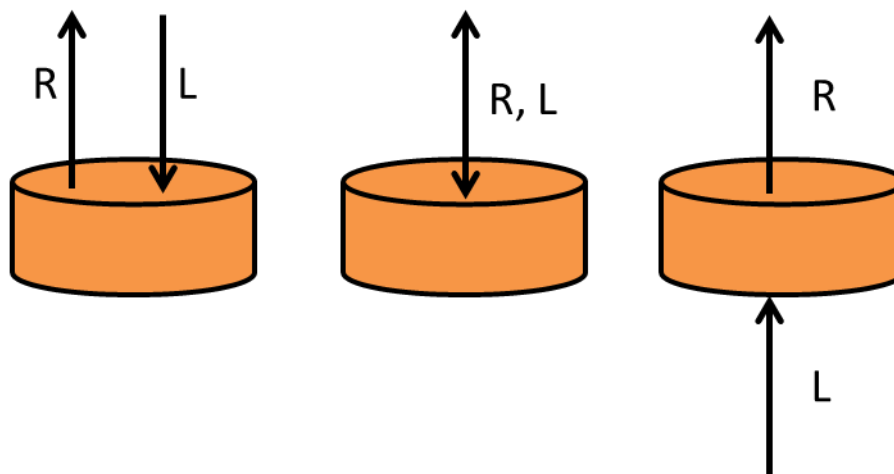
Pigments are widely used in art history and archaeology; this is why it is necessary a technique capable to characterize their composition with the minimum sample damage. One of these techniques is Resonance Raman spectroscopy because it often uses visible light, can select the excitation wavelength over a wide range and it is almost noninvasive. Representative examples of RRS applications in this field are, for instance, some representative examples are found in the studies of Coupry et al. 2005<sup>49</sup> who by detecting distinct pigments in Roman wall painting in Tivoli (Italy) found a green pigment whose patent was registered in 1936, and, consequently, demonstrated the piece falsification. Thanks to these data they realized about the falsification of the piece. Furthermore other authors<sup>50</sup>, demonstrated the versatility of the RRS by the selective detection of a yellow pigment, employed to color Chinese documents.

Other pigments with high biological and nutritional interest are the carotenoids whose characterization, determination and evolution in fruits by RRS, as already mentioned, is the main objective of the present Thesis.

### **1.5. Transmission Raman Spectroscopy**

Transmission Raman Spectroscopy (TRS) is a variant of conventional Raman Spectroscopy which predominantly studies solids in order to get information about their bulk content. TRS is typically used to investigate turbid media or materials that do not absorb or block light significantly where the light extends randomly through the entire sample by diffuse scattering. A related technique also based on diffuse scattering is the so called Spatially Offset Raman Spectroscopy (SORS) which was developed in 2005<sup>51</sup>.

In conventional Raman process, the scattered photons can be detected using a back scattering or a perpendicular configuration, thus, the excitation light and the detector form an angle of  $180^\circ$  or  $90^\circ$ , respectively. The arrangement is illustrated in Figure 1.3 together with the SORS configuration in which the excitation laser and the detection region are physically separated, typically by a distance of a few millimeters. By contrast, in the transmission configuration, the photons are directed through the entire turbid sample and detected in the forward direction ( $0^\circ$ ) with respect to the incident laser direction, as it is also shown in Figure 1.3.



**Figure 1.3:** Different Raman geometries. Left: SORS, center: Backscattering, right: transmission. L: Laser beam. R: Raman scattering.

The first publication on Transmission Raman Spectroscopy appeared in 1967<sup>52</sup>. More recently, the technique was adapted by Matousek group<sup>51, 53, 54</sup> to analyze pellets and powdered compounds with different thicknesses. This application had a great impact first in the pharmaceutical field due to the non-invasive character of the method and later on in medical sciences because, in addition, the new technique made possible the study of layers located below the sample surface overcoming an important limitation of conventional Raman spectroscopy. Indeed, some authors<sup>55-57</sup> were able to identify calcifications in breast tissues, reaching penetration depths of 0.9, 8.7, or even 16 mm using TRS.

In 2012 a new Raman spectroscopy modality was developed in our group<sup>58</sup> called Transmission Resonance Raman Spectroscopy (TRRS). The technique combines the advantages of Transmission Raman Spectroscopy with the benefits of Resonance Raman Spectroscopy and provided some synergic effects with higher improvement of the Raman signal in comparison with those obtained by the techniques separately. TRRS was applied to study the presence of carotenoids in solid matrices with great success<sup>58</sup>.

## 1.6. Infrared Spectroscopy

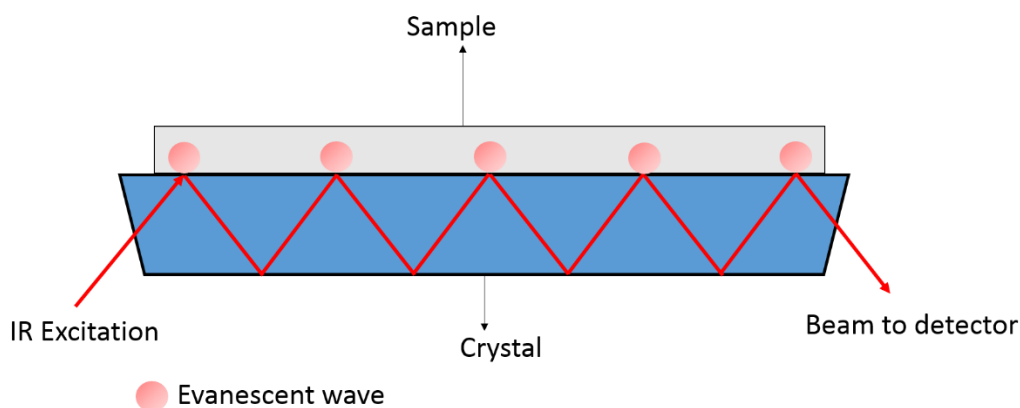
This Spectroscopy measures the absorption of infrared light by molecules typically by recording either the transmittance or absorbance of a given sample as a function of the radiation frequency within this region of the spectrum. At room temperature, the molecules mostly populate their fundamental energy levels and they can be excited to higher vibrational levels by absorbing infrared light of specific frequencies which depend on the functional groups and, therefore, chemical bonds involved in the absorption process.

Every molecule has its own fingerprint in infrared spectra because each bond absorbs in its typical frequency. In complex molecules, there are many bonds and, consequently, vibrations can also have a conjugated character. Thus, thanks to Infrared Spectroscopy one can get information about the chemical bonds, and, hence, about the molecular structure of the species under investigation<sup>23, 59</sup>. Although both IR and Raman spectroscopy record vibrational and rotational spectra of molecules it is convenient to recall that the mechanism underlying the respective radiation-molecule interaction is different. While Raman spectroscopy is based on the polarizability changes in the molecule when it interacts with the IR photons ( $\alpha$ ), Infrared spectroscopy is basically concerned with changes in the molecular dipole moment ( $\mu$ ) during the said interaction<sup>60</sup>.

The Infrared region of the electromagnetic spectrum can be split into three parts: Near-mid- and far- infrared region. The near infrared window is the most energetic one (12821-4000)  $\text{cm}^{-1}$  and therefore, these radiation energies are used to excite harmonic or overtone vibrations<sup>61</sup>. Mid-infrared is ideal in order to study fundamental vibrations (4000-400)  $\text{cm}^{-1}$ . Finally, the low-energetic far-infrared (400-10)  $\text{cm}^{-1}$  is ample used to obtain information on the rotational structure of molecules.

Furthermore, it is possible to segment the mid-infrared zone in four subsections, namely: X-H stretching section (4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ ), triple bond section (2500-2000  $\text{cm}^{-1}$ ), double bond section (2000-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) and fingerprint section (1500-400  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>62</sup>. As can be inferred, the most characteristic vibrational modes of the compounds present in food belong to these sections which explain why many researchers have used infrared spectroscopy in food analysis<sup>63-65</sup>.

In fact, as it will be discussed further below, the mid-IR region also constitutes the predominant spectral scenario of the investigations carried out in the present Thesis by using then ATR-IR technique<sup>66</sup>. Here, the infrared light passed through a high refractive index crystal (e.g. diamond, ZnSe, or Ge) with high refractive index which is in contact with the sample; As it is shown in Figure 1.4, the crystal reflects the light in the interphase with the sample at least one time creating an evanescent wave. Overall, the system is capable to measure intensity changes with respect the incident beam due to the energy loss after the light-matter interaction.



**Figure 1.4:** Typical generation of evanescent wave in ATR-IR technique.

In Figure 1.4 the excitation IR light, passes through the sample with continuous reflections on its way to the detector. The evanescent wave is created when the beam reaches the sample in the intersection point. Usually, the penetration range is (0.1-5)  $\mu\text{m}$  and therefore, the system is capable to measure intensity changes with respect the incident beam due to the energy loss after the light-matter interaction. It should be noted that thanks to these penetration deeps sampling in aqueous solutions is possible<sup>67</sup>. In addition, the main advantage of this technique is that no sample preparation is required, and sometimes is possible to recover the intact sample.

### 1.7. Density Functional Theory (DFT) calculations

Methods based in Density Functional Theory (DFT) constitute nowadays a good approach to solve the Schrödinger equation, at least in terms of practical values<sup>68</sup> and are widely used to calculate molecular electronic structure of isolated molecules as they provide accurate results in a reasonable lapse of time<sup>69</sup>.

Conceptually, one of the main features of DFT methods is the use of the density function which depends only on the x-y-z coordinates of the individual electrons. Hence DFT can be said to *scale* three-dimensionally, or as  $N^3$ , being N the number of basis functions. On the other hand, *ab initio* methods, as it is well known, scale as  $N^4$ ; a key difference that explains why DFT calculations are faster with better accuracy. There are many variants based on the DFT methodology, however, throughout this Doctoral Thesis we have used two of them, namely: the *mPW1PW91* and  $\omega$ B97xD methods that are briefly described below..

The *mPW1PW91* method is a modified Perdew Wang 1-parameter and Perdew Wang 91 gradient-corrected correlation functional (*mPW1PW91*)<sup>69, 70</sup>; essentially it is defined as a hybrid Hartree-Fock density functional, developed by Adamo et al. 1997<sup>69</sup>, which takes into account both covalent and noncovalent interactions in order to provide a more accurate description for the vibrational frequencies, molecular structures and bond energies of the investigated species.

As representative examples of the capacity and superiority of the *mPW1PW91* method compared to others, we can mention the studies carried out by some groups<sup>71</sup> on the structure and vibration spectra of ofloxacin or those of Park et al. 2014<sup>72</sup> on the isomers of methylene bridge-monosubstituted tetramethoxycalix[4]arenes. These species are macrocyclic molecules with a considerable number of atoms, who calculated the IR theoretical spectra of the most stable isomer which were in good agreement with the experimental spectra, therefore this method is a good support for calculations in big-sized molecules.

As it is described further below, this method was selected to be one of the tools in order to evaluate the molecular structure, energies and IR spectra of the  $\beta$ -carotene, lycopene as well as their thermal degradation products to assess the stability and, consequently, the reactivity of these carotenoids, a clear objective of the present Doctoral Thesis.

With respect to the  $\omega$ B97xD method it is worth to mention that this hybrid functional is very similar to the previous one, except for its emphasis on long-range corrections<sup>73</sup> (Becke 97) as a way to account for dispersion interactions between different parts of the molecule. As a matter of fact, other groups<sup>74</sup> described this DFT variant as a “re-optimization of a long-range corrected (LC) hybrid density functional to include empirical atom-atom dispersion corrections” and, therefore, capable to gain insights on thermochemistry, kinetics and long range interactions.

In the last few years, several researchers used successfully this method for different applications: for example, Eriksson et al.<sup>75</sup> calculated the spectroscopic behavior of tetrapyrrole and other compounds relevant to medical sciences. In summary, it should be noted that the two theoretical methods are quite similar in the calculation of geometries, infrared and Raman spectra of organic molecules.

### 1.8. Raman Spectroscopy and carotenoids

As mentioned further above, Raman Spectroscopy is a powerful technique for the determination of carotenoids in general and in live tissues in particular, due to its non-invasive character. For example, some authors<sup>76</sup> analyzed different carotenoids with various excitation wavelengths in resonant (514.5 and 532 nm) and non-resonant (1064 nm) conditions in lyophilized microorganisms samples. They concluded that although the Raman technique is a good analytical tool in the field of astrobiology, in microbiology, a more-detailed determination is needed. In 2005, other authors<sup>77</sup> employed the resonant absorption of the carotenoids in order to perform non-invasive Raman measurements in human tissue (*in vivo*), specifically in macular tissues, where they studied the lutein and zeaxanthin composition and discussed the application of RRS in ophthalmology.

On the other hand, Darvin et al.<sup>78, 79</sup> also studied lycopene and  $\beta$ -carotene in human skin by RRS. In fact, the presence of carotenoids as markers of the antioxidant power of the human skin, was investigated by the same group<sup>80</sup>, using both resonant (488 nm) and non-resonant (785 nm) Raman spectroscopy obtaining slightly different signals. In general, they concluded that both methods yielded similar results on the carotenoid distribution in the human skin. Later, in 2013 Mayne et al.<sup>81</sup> reviewed the studies of carotenoids in human skin by RRS pointing out the reproducibility of the carotenoid measurements as markers in human skin.

The Raman spectroscopy is not only used in human skin and in microorganisms, but also in fruits and vegetables. Thus, a study by Raman spectroscopic mapping<sup>82</sup> on different types of carrot roots provided detailed information on the relative content and spatial distribution of carotenoids. Indeed: the authors found that the  $\beta$ -carotene distribution was heterogeneous across root sections and that the pigment content increased gradually in secondary phloem toward the core. However, the carotene content declined in cells close to the vascular cambium.

As previously mentioned, our group developed a laser spectroscopic technique<sup>58</sup> that combined transmission and resonance-enhanced Raman inelastic scattering, which provided an increased signal-to-noise ratio and enhanced analytical sensitivity, respectively. The technique was applied to analyze  $\beta$ -carotene in fruits reaching a detection limit of the order of hundreds of picograms. In the same study, a model of the Raman

signal dependence on the sample thickness was developed and successfully applied to investigate the  $\beta$ -carotene content in both standards and carrot roots.

Finally, we shall mention that Raman spectroscopy under its different modalities have been widely used to investigate the carotenoid content in tomato and other lycopene-high amounting compounds<sup>83, 84</sup> in an attempt to correlate the carotenoid content with the ripening state of the fruit.

### **1.9. Motivation, objectives and Structure of the Doctoral Thesis**

One obvious motivation of the present thesis is related to the outgoing activity of our group in laser spectroscopy research and, more specifically, in the application of the Raman spectroscopic technique recently developed in our laboratory<sup>58</sup> dedicated to investigate the presence nutritional compounds, like carotenoids in solids and fruits.

A natural extension of this research plan was to investigate not only the presence of distinct carotenoid molecules in different fruits but, more relevant, to gain insight on the spatial distribution of these pigments in an attempt to correlate the observed distribution with the structure and physiology of the distinct biological tissues which form the biological sample. In this context, the abovementioned researchers<sup>82</sup> studied the distribution of  $\beta$ -carotene in carrot roots. To date, no detailed investigation has been carried aimed to compare the spatial distribution of the  $\nu_4$  band intensity with that of  $\nu_1$ . Since the intensity of the (out-plane)  $\nu_4$  vibrational band can be related with the actual carotenoid molecular configuration and aggregation, we wanted to investigate these spatial distributions in carrot roots as a way to get insight on the spatial differentiation of carotenogenesis in the cited fruit. This subject constitutes one of the objectives of the present work. Detailed information about the measurements and findings are described in several chapters of the Thesis (see further below).

It is well known that polarized Raman spectroscopy has emerged as a powerful technique for investigating molecular ordering in condensed phases and biological materials<sup>85-88</sup>. Thus, for example, polarized resonance Raman spectra of carotenoids in biological matrices have been studied and compared with those of  $\beta$ -carotene in acetonitrile solutions<sup>89</sup>. These authors found the carotenoid depolarization ratios in liquid solutions were smaller than those of carrot matrices explaining the observed difference by the increasing degree of order of  $\beta$ -carotene in carrot samples with respect to those of liquid solutions.

We were motivated by these types of investigations and, specially, by the valuable information that can be gained on the pigment structure (e.g., molecular ordering, degree of compactness or fluidity, degree of maturity) by using linear polarized light Raman spectra. Hence, at the experimental level, we extended the previous Transmission Resonance Raman technique incorporating linear polarized light, both in the excitation and detection region. This improvement allowed the measurement of depolarization ratios for any Raman bands of the carotenoid contained in the fruit.

The starting hypothesis of the research plan along this direction assumed that the depolarization ratio observed in a biological (fruit) tissue depends not only on the symmetry of the investigated Raman band, but also on the tissue optical thickness, which can change during the postharvest life and, consequently, with the fruit degree of maturity. As a result, questions such as what could be learned by measuring the Raman depolarization ratio dependence on the fruit tissue thickness or maturity clearly motivated our planned research.

Not only the measurement of the carotenoid Raman band depolarization ratios in several fruits, like tomatoes or mangos, motivated the present investigation, but also the temporal evolution of the carotenoid Raman intensity along their maturation period. In principle, we were aware that the carotenoid evolution and the change of the optical scattering coefficients during tomato ripening were not independent but related processes<sup>84, 90</sup>. However, a kinetic description of their specific roles was still needed. Thus, for example, while in big tomatoes of the Rambo variety the maturation/ripening process is marked by a significant change in the fruit color<sup>91</sup>, for some cherry tomatoes, maturation takes place without a significant change in the fruit's skin color, which may indicate that the scattering coefficient change could be very different during both fruit maturation processes.

Considering that the change of the fruit optical parameters played a definite role in the tomato ripening due to the concomitant cell wall degradation, we wondered, could we develop a kinetic model to predict the effective postharvest lifetime of the fruit? Could the maturation period be quantitatively related to the time evolution of the tomato carotenoid concentration and other signatures observed in their Raman spectra? These and other related questions motivated our investigation in order to develop a general kinetic model for tomato maturation based both on carotenoid content and on optical parameters estimated from Raman spectral signatures.

Unfortunately, the measurement of Raman spectra in fruits like tomatoes with thickness longer than 1 cm presented a problem due to the low signal to ratio when the transmission configuration was used. Hence the first requirement was to change the experimental configuration to those of 180° backscattering and polarized 90° scattering modalities, to investigate the time evolution of the carotenoid band signals for a series of tomato fruits. In parallel, a kinetic model was developed to describe the tomato-ripening process through the temporal evolution of carotenoid Raman signal intensities. This interplay between theoretical and experimental data also motivated our work and was successfully demonstrated as shown below.

The relative stability of lycopene and  $\beta$ -carotene in addition to the kinetic of their thermal degradation process have been studied by several groups<sup>92-101</sup>, however, to the best of our knowledge, a full study of the kinetic of both carotenoid degradation with spectral identification of the most relevant products is still required. This necessity was in part one of the motivations of the research stay of the author of the present Thesis in the Chemistry Department of Coimbra University in which period this investigation was carried out combining ATR-IR and Raman spectroscopy with DFT calculations as described in the present Thesis.

### **1.10. Main objectives and structure of the Doctoral Thesis**

In view of the current status of the Raman spectroscopy application in the study of fruits and plants, the main objective of the present Doctoral Thesis is to investigate the presence of carotenoid and their evolution in distinct fruits using this non-invasive spectroscopy as a way to assess the health status of the fruit as well as to gain insight into the physiological processes like maturation that govern their post-harvest life and ripening status. This global task will be implemented by the following specific objectives.

1. To measure the Raman bands of carotenoids in several samples and fruits (carrot root, tomato, mango, etc.) using the Transmission Resonance Spectroscopy technique; specifically to record their intensity and spatial distribution as a function of the type of fruit, postharvest life, ripening and physical status. It should be emphasized that not many studies have been performed on the determination and evolution of carotenoids combining the Resonance Raman effect and the transmission configuration which for example will allow the sampling of the carotenoid distribution in the entire biological matrix.

2. To develop a linear polarized Raman technique both in transmission and 90° configurations and, subsequently, to measure depolarization ratios of the most prominent carotenoid Raman bands in several samples and fruits as a function of their thickness, post-harvest life and ripening state.
3. To develop a theoretical model incorporating kinetic and spectroscopic information to describe through the Raman signal intensities of the carotenoid bands the ripening process of the fruit and hence to be able to predict the health status of the investigated fruit.
4. Same objective as the one described in point 3 but using depolarization ratios of the most prominent Raman band of carotenoid in distinct fruits.
5. To investigate the stability and thermal degradation kinetic of both lycopene extracts and in  $\beta$ -carotene standards; this objective will be achieved by measuring both Raman and IR spectra of the carotenes under investigation and their decomposition products as a function of the heating time at different temperatures. In parallel, DFT calculations using the method discussed further above will be performed in order to compare experimental spectra of the degradation product with the theoretical ones. This objective aims to understand the degradation process kinetic and mechanisms as well as to provide quantitative information on the relative carotene thermal stability and reactivity.

Taking into account the previously described objectives, the doctoral thesis is structured as follows:

**Chapter 2** is fully dedicated to describe all experimental techniques developed and/or used in the thesis. This includes Transmission Resonance Raman Spectroscopy, back scattering Resonance Raman Spectroscopy, Linear Polarized Resonance Raman Spectroscopy in transmission and 90° scattering configuration, ATR –IR Spectroscopy and, the two theoretical DFT methods used to calculate the electronic structure and Raman spectra of  $\beta$ -carotene and lycopene with their thermal degradation products.

**Chapter 3 and 4** are devoted to present the experimental Raman spectra of carotenoid measured in pellets and different fruits (carrot roots, tomatoes, mangos) and their analysis and discussion. Some of the key results are the measurement of the most predominant Raman bands of the two carotenoids mentioned earlier, their assignment to the respective vibrational modes of the compound under study. The spatial distribution of the carotenes across the biological tissue, the measurement of the depolarization ratio of the most intense bands, the evolution of the Raman signal of some of the vibrational modes as a function of the sample thickness or the reopening status of the fruit.

Conceptually, one of the most relevant parts of the present Thesis concerns the data analysis and discussion of the Raman signatures described in Chapter 4. To some extent, this has been accomplished with the aid of different models, based on kinetic and spectroscopic parameters. For instance, the theoretical model developed to account on the temporal evolution of the Raman signals, allowed us to characterize the whole maturation process of tomatoes involving basically two parameters: one of kinetic nature, the rate coefficient of carotenoid synthesis and the other of spectroscopic nature: the scattering coefficient which accounts for the tissue degradation during the ripening process of the fruits. Other models used to successfully describe the experimental data, will be given in **Chapter 4**.

The study of the thermal decomposition of the two carotenoids,  $\beta$ -carotene and lycopene, is described in **Chapter 5 and 6**. Similarly to chapter 3 and 4, **Chapter 5**, deals with the experimental results and the following one, and **Chapter 6**, deals with their analysis and discussion. The main body of the results presented in Chapter 5 consists of the IR and Raman spectra of the heated sample -containing both the carotenoid and formed product- as a function of the time and temperatures.

The data analysis and discussion described in **Chapter 6** are based on the spectral identification of the most prominent bands of the initial, unreacted carotenoid as well as of those assigned to the product originated, mainly apocarotenoids, in the thermal decomposition. Obviously, the latter task required the full calculation of the electronic structure and IR and Raman spectra of a series of possible decomposition products, using the DFT methods described in Chapter 2, on the one hand, and the comparison between the experimental and theoretical spectra, on the other hand. This detailed study has allowed the determination of the reaction kinetic, activation energy and reaction pathways of the

thermal decomposition of the  $\beta$ -carotene as well as provided valuable information on the stability and reactivity of these two pigments, i.e. lycopene and  $\beta$ -carotene.

Finally, **Chapter 7 and 8** provide a summary of the thesis and highlights the most relevant conclusions that can be drawn from the present work. The supplementary information, referred to in the text is attached at the end of the memory in the form of **Appendix I, Appendix II and Appendix III.**

### 1.11. References

1. Baranska, M., and Kaczor, A. (2016). Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology. John Wiley & Sons. p. 163.
2. Stahl, W., and Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **1740(2)**: 101-107.
3. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., and Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40(3)**: 173-289.
4. Arimboor, R., Natarajan, R. B., Menon, K. R., Chandrasekhar, L. P., Moorkoth, V. (2015). Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability-a review. *J. Food Sci. Technol.* **52(3)**: 1258-2171.
5. Hannoufa, A., and Hossain, Z. (2012). Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **1**: 198-202.
6. Britton, G, Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (2004). Carotenoids Handbook. Birkäuser Verlag, Basal, Switzerland.
7. Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., and Pogson B. J. (2015). Carotenoid Metabolism in Plants. *Mol. Plant.* **8(1)**: 68-82.
8. Saini, R. K., Nile, S. H., and Park S. W. (2015). Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities. *Food Res. Int.* **76(3)**: 735-750.
9. Khoo, H-E., Prasad, K. N., Kong, K-W., Jiang, Y., and Ismail, A. (2011). Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Molecules.* **16**: 1710-1738.
10. Bartley, G. E., and Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell.* **7**: 1027-1038.
11. Hornero-Méndez, D., and Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1617-1622.

12. Shi, J. and Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Biotech.* **20(4)**: 293-334.
13. Wilcox, J., Catignani, G., and Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43**: 1-18.
14. Schieber, A., and Carle, R. (2005). Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends Food Sci. Technol.* **16**: 416-422.
15. Von Doering, W. E., Sotiriou-Leventis, C., and Roth, W. R. (1995). Thermal interconversions among 15-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans*  $\beta$ -carotene: Kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-*trans*- $\beta$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 2747-2757.
16. Krinsky, N. I. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **66(5)**: 1003-1010.
17. Ostroumov, E., Mulvaney, R. M., Cogdell, R. J., Scholes, G. D. (2013). Broadband 2D Electronic Spectroscopy Reveals a Carotenoid Dark State in Purple Bacteria. *Science*. **340(6128)**: 52-56.
18. Cazzonelli, C. I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* **38**: 833-847.
19. Biesalski, H. K., Chichill, G. R., Frank, J., von Lintig, J., and Nohr, D. (2007). Conversion of  $\beta$ -carotene to retinal pigment. *Vitam. Horm.* **75**: 117-130.
20. Mendes-Pinto, M. M. (2013). Insights into molecular mechanisms of carotenoid properties. (*Doctoral thesis*). The Netherlands: Vrije Universiteit Amsterdam.
21. Goodwin, T. W. (1986). Metabolism nutrition and function of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.*, **6**: 273-297.
22. Requena, A., and Zuñiga, J. (2004). Espectroscopia. *Pearson Education, S.A*, Madrid, Spain .
23. Hollas, M. J. (2007). Modern Spectroscopy. *John Wiley & Sons*, Chichester, U.K.

- 
24. Murphy, M. T., Locke, C. R., Light, P. S., Luiten, A. N., and Lawrence, J. S. (2012). Laser frequency comb techniques for precise astronomical spectroscopy. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **422(1)**: 761-771.
25. Cundiff, S. T., and Kauffmann, H. F. (2014). Focus on multidimensional optical spectroscopy and imaging. *New J. Phys.* **16**: 065006.
26. Campbell, P., Moore, I. D., and Pearson M. R. (2016). Laser spectroscopy for nuclear structure physics. *Prog. Part. Nucl. Phys.* **86**: 127-180.
27. Telle, H. H., González-Ureña, A., and Donovan, R. J. (2007). Laser Chemistry: Spectroscopy, Dynamics and Applications. *John Wiley & Sons*, Chichester, U.K.
28. Tallo-Parra, O., Albanell, E., Carbajal, A., Monclús, L., Manteca, X., and Lopez-Bejar, M. (2017). Prediction of Cortisol and Progesterone Concentrations in Cow Hair Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). *Appl. Spectrosc.* **71(8)**: 1954-1961.
29. Qin, J., Kim, M. S., Chao, K., González, M., and Cho, B. K. (2017). Quantitative Detection of Benzoyl Peroxide in Wheat Flour Using Line-Scan Macroscale Raman Chemical Imaging. *Appl. Spectrosc.* pp: 3702817706690.
30. Ricci, A., Giuseppina, P. P., Olejar, K. J., Kilmartin, P. A., Versari, A. (2015). Attenuated Total Reflection Mid-Infrared (ATR-MIR) Spectroscopy and Chemometrics for the Identification and Classification of Commercial Tannins. *Appl. Spectrosc.* **69(11)**: 1243-1250.
31. I. N. Levine, I. N. (2005). Fisicoquímica. *Mc Graw Hill*. **2**: Madrid, Spain (2005).
32. Demtröder, W. (2008). Laser Spectroscopy Vol. 2. Experimental Techniques, Heidelberg, Germany: *Springer*. **Vol. 2**.
33. Smith, E., and Dent, G. (2005). Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach. *John Wiley & Sons, Ltd.* p. 72.
34. Raman, C. V., Krishnan, K. S. (1928). A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. **121**: 501-202.
35. Effremov, E. V. (2008). Advances in Analytical Resonance Raman Spectroscopy. (*Doctoral thesis*). The Netherlands: Vrije Universiteit Amsterdam.

36. Tardioli, S. (2011). Optical Methods for Structure Elucidation of Protein-Ligand Interactions: Fluorescence and Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. (*Doctoral thesis*). The Netherlands: Vrije Universiteit Amsterdam.
37. González, A. G. (2012). Laser Raman Spectroscopy in Substances of Biological and Nutritional Interest. (*Doctoral thesis*). Spain: Universidad Complutense Madrid.
38. Harrand, M., and Lennuier, R. (1946). Exaltation de l'intensité Raies dans les Spectres Raman Émis par des Corps Présentant au Voisinage de la Raie Excitatrice. *C. R. Acad. Sci.* **223**: 356-359.
39. Fodor, S., Rava, R., Hays, T., and Spiro, T. (1985). Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of the Nucleotides with 266-, 240-, 218-, and 200-nm Pulsed Laser Excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 1520-1529.
40. Susi, H., and Ard, J. S. (1971). Vibrational Spectra of Nucleic Acid Constituents-I: Planar Vibrations of Uracil. *Spectrochim. Acta. A Mol. Spectrosc.* **27(A)**: 1549-1562.
41. Podolyan, Y., Rubin, Y., and Leszczynski, J. (2000). An Ab Initio Post-Hartree-Fock Comparative Study of 5-Azacytosine and Cytosine and Their Dimers with Guanine. *J. Phys. Chem. A.* **104**: 9964-9970.
42. Shukla, M., and Mishra, P. (1999). A Gas Phase Ab Initio Excited State Geometry Optimization Study of Thymine, Cytosine and Uracil. *Chem. Phys.* **240**: 319-329.
43. Burova, G. T., Ermolenkov, V. V., Ten, G. N., Kadrov, D. M., Nurlygaianova, M. N., Baranov, V. I., and Lednev, I. K. (2013). Ionic and Tautomeric composition of Cytosine in Aqueous Solution: Resonance and Non-Resonance Raman Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. A.* **117**: 12734-12748.
44. Spiro, T. G., and Czernuszewicz, R. S. (1995). Biochemical Spectroscopy. Methods in Enzymology. *K. Sauer Ed.* Academic Press San Diego. **246**: 416.
45. Couling, V. W., Fischer, P., Klenerman, D., and Huber, W. (1998). Ultraviolet Resonance Raman Study of Drug Binding in Dihydrofolate Reductase, Gyrase, and Catechol O-Methyltransferase. **75**: 1097-1106.
46. Lopez-Peña, I., Leigh, B. S., Schlamadinger, D. E., and Kim, J. E. (2015). Insight into Protein Structure and Dynamics by Ultraviolet and Visible Resonance Raman Spectroscopy. *Biochem.* **54(31)**: 4770-4783.

47. Jorio, A., Cancado, L. G., Neves, B. R. A., de Souza, M., Fantini, C., Pimenta, M. A., Medeiros-Ribeiro, G., Samsonidze, G. G., Chou, S. G., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M. S., Rao, A. M., Gruneis, A., and Saito, R. (2005). Resonance Raman spectroscopy to study and characterize defects on carbon nanotubes and other nano-graphite systems. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 858(E): HH11.2.1-HH11.2.6.
48. Andrade, N. F., Vasconcelos, T. L., Gouvea, C. P., Archanjo, B. S., Achete, C. A., Kim, Y. A., Endo, M., Fantini, C., Dresselhaus, M. S., Souza-Filho, A. G. (2015). Linear carbon chains encapsulated in multiwall carbon nanotubes: Resonance Raman Spectroscopy and transmission electron microscopy studies. *Carbon*. **90**: 172-180.
49. Coupry, C., Lautié, A., Sagon, G., and Froment, F. (2005). Raman Spectroscopy in Archeology and Art History. *Chalmers (Eds.)*. Royal Society for Chemistry, Cambridge. p. 207.
50. Bell, S. E. J. (2005). Raman Spectroscopy in Archeology and Art History. *Chalmers (Eds.)*. Royal Society for Chemistry, Cambridge. p. 292.
51. Matousek, P., Clark, I. P., Draper, E. R. C., Morris, M. D., Goodship, A. E., Overall, N., Towrie, M., Finney, W. F., and Parker, A. W. (2005). Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **59**: 393-400.
52. Schrader, B., Bergmann, G., and Fresenius, Z. (1967). Die Intensitat des Ramanspektrums polykristalliner Substanzen. *Anal. Chem.* **225**: 230-247.
53. Matousek, P., and Parker, A. W. (2007). Bulk Raman Analysis of Pharmaceutical Tablets. *Appl. Spectrosc.* **60(12)**: 1353-1357.
54. Matousek, P., and Parker, A. W. (2007). Non-invasive probing of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 38: 563-567.
55. Baker, R., Matousek, P., Ronayne, K. L., Parker, A. W., Rogers, K., and Stone, N. (2007). Depth profiling of calcifications in breast tissue using picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy. *Analyst.* **132**: 48-53.
56. Stone, N., Baker, R., Rogers, K., Parker, A. W., and Matousek, P. (2007). Future possibilities in the diagnosis of breast cancer by subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS). *Analyst.* **132**: 899-905.

57. Matousek, P., and Stone, N. (2007). Prospects for the diagnosis of breast cancer by non-invasive probing of calcifications using transmission Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **12(2)**: 024008. [doi: 10.1117/18934].
58. González, A. G., González-Ureña, A. (2012). Transmission Resonance Raman Spectroscopy: Experimental Results vs. Theoretical Model Calculations. *Appl. Spectrosc.* **66(10)**: 1163-1170.
59. Workman, J. (2001). Handbook of Organic Compounds. *Academic Press*. London. pp: 209-242.
60. Atkins, P., and De Paula, J. (2006). Atkins' Physical Chemistry. *Oxford*. 8<sup>th</sup> Edition.
61. Burns, D. A., and Ciurczak, E. W. (2001). Handbook of Near-Infrared Analysis, Revised and Expanded. 2<sup>nd</sup> Ed. *Marcel Dekker, Inc.* New York, Basel, Hingkong.
62. Stuart, B. H. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. *Wiley: Chichester*. U. K. pp: 137-165.
63. Harwood, J., Aparicio, R. (2000). The Handbook of Olive Oil. *Springer: MD*. p. 604.
64. Ruoff, K., Werner, L., Bogdanov, S., Bosset, J. O., Estermann, B., Ziolkó, T., and Amadó, R. (2006). Authentication of the Botanical Origin of Honey by Near-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54(18)**: 6867-6872.
65. Hennessy, S., Downey, G., O'Donell, C. (2008). Multivariate Analysis of Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopic Data to Confirm the Origin of Honeys. *Appl. Spectrosc.* **62**: 1115-1123.
66. Fahrenfort, J. (1961). Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. *Spectrochim. Acta.* **17(7)**: 698-709.
67. Wilson, R. H. (1990). Fourier transform mid-infrared spectroscopy for food analysis. *Trends Analyt. Chem.* **9(4)**: 127-131.
68. Sholl, D. S., and Steckel, J. A. (2009). Density Functional Theory: A Practical Introduction. *John Wiley & Sons, Inc.* p. 2.

69. Adamo, C., and Barone, V. (1997). Exchange functionals with improved long-range behavior and adiabatic connection methods without adjustable parameters: The *mPW* and *mPW1PW* models. *J. Chem. Phys.* **108**: 664-675.
70. Zhao, Y., Tishchenko, O., and Truhlar, D. G. (2005). How Well Can Density Functional Methods Describe Hydrogen Bonds to  $\pi$  Acceptors?. *J. Phys Chem.* **109(41)**: 19046-19051.
71. Yang, Y., and Gao, H. (2012). Comparison of DFT methods for molecular structure and vibration spectra of ofloxacin calculations. *Spectrochim. Acta A.* **85**: 303-309.
72. Park, K., Son, H-J., and Choe, J-I. (2014). *mPW1PW91* study for conformational isomers of methylene bridge-monosubstituted tetramethoxycalix[4]arenes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **20(5)**: 3276-3282.
73. Becke, A. D., and Johnson, E. R. (2005). Exchange-hole dipole moment and the dispersion interaction. *J. Chem. Phys.* **122**: 154107.
74. Chai, J-D., and Head-Gordon, M. (2008). Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**: 6615-6620.
75. Eriksson, E. S. E., and Eriksson, L. A. (2011). Predictive power of long-range corrected functionals on the spectroscopic properties of tetrapyrrole derivatives for photodynamic therapy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**: 7207-7217.
76. Jehlička, J., Edwards, H. G. M., Osterrothová, K., Novotná, J., Nedbalová, L., Kopecký, J., Němec, I., and Oren, A. (2014). Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology. *Philos Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **372**: 20140199.
77. Ermakov, I. V., Sharifzadeh, M., Ermakova, M., and Gellerman, W. (2005). Resonance Raman detection of carotenoid antioxidant in living human tissue. *J. Biomed. Opt.* **10(6)**: 064028.
78. Darwin, M., Gersonde, I., Albrecht, H., Meinke, M., Sterry, W., and Lademann, J. (2006). Non-invasive *in vivo* detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy. *Laser Phys. Lett.* **3(9)**: 460-463.

79. Darvin, M., Gersonde, I., Albrecht, H., Zastrow, L., Sterry, W., and Lademann, J. (2007). *In vivo* Raman spectroscopic analysis of the influence of IR radiation on the carotenoid antioxidant substances beta-carotene and lycopene in the human skin. Formation of free radicals. *Laser Phys. Lett.* **4**: 318-321.
80. Darvin, M. E., Fluhr, J. W., Caspers, P., van der Pool, A., Richter, H., Patzelt, A., Sterry, W., and Lademann, J. (2009). *In vivo* distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods. *Exp. Dermatol.* **18**: 1060-1063.
81. Mayne, S. T., Cartmel, B., Scarmo, S., Jahns, L., Ermakov, I. V., and Gellermann, W. (2013). Resonance Raman spectroscopic evaluation of skin carotenoids as biomarker of carotenoid status for human studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **539**: 163-170.
82. Baranska, M., Baranski, Schulz, H., and Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta.* **224**: 1028-1037.
83. Baranska, M., Schütze, W., and Schulz, H. (2006). Determination of Lycopene and  $\beta$ -Carotene Content in Tomato Fruits and Related Products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **78(24)**: 8456-8461.
84. Qin, J., Chao, K., and Kim, M. S. (2012). Nondestructive evaluation of internal maturity of tomatoes using spatial offset Raman spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* **71**: 21-31.
85. Benevides, J. M., Overman, S. A., and Thomas Jr., G. J. (2005). Raman Polarized Raman and Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of Nucleic Acids and Their Complexes. *J Raman Spectrosc.* **36(4)**: 279-299.
86. Richard-Lacroix, M., and Pellerin, C. (2013). Accurate New Method for Molecular Orientation Quantification Using Polarized Raman Spectroscopy. *Macromolecules.* **46(14)**: 5561-5569.
87. Van de Ven, M., Kattenberg, M., van Ginkel, G., and Levine, Y. K. (1984). Study of the Orientational Ordering of Carotenoids in lipid bilayers by Resonance-Raman Spectroscopy. *Biophys J.* **45(6)**: 1203-1209.
88. Schmitt, M., and Popp, J. (2006). Raman Spectroscopy at the Beginning of the Twenty-First Century. *J. Raman Spectrosc.* **37(1-3)**: 20-28.

89. Abramczyk, H., Kolodziejcki, M. and Waliszewska, G. (1999). Vibrational relaxation of  $\beta$ -carotene in acetonitrile solution and in carrot in situ. *J. Mol. Liq.* **79(3)**: 223-233.
90. Shao, Y., He, Y. H., Gómez, A. H., Pereir, A. G., Qiu, Z., and Zhang, Y. (2007). Visible/Near Infrared Spectrometric Technique for Nondestructive Assessment of Tomato “Heatwave” (*Lycopersicon esculentum*) Quality Characteristics. *J. Food Eng.* **81(4)**: 672-678.
91. Zhu, Q., He, C., Lu, R., Mendoza, F., and Cen, H. (2015). Ripeness Evaluation of “Sun Bright” Tomato Using Optical Absorption and Scattering Properties. *Postharvest Biol. Technol.* **103**: 27-34.
92. Achir, N., Pénicaud, C., Avallone, S., and Bohuon, P. (2011). Insight into  $\beta$ -Carotene Thermal Degradation in Oils with Multiresponse Modeling. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **88**: 2035-2045.
93. Qiu, D., Shao, S-X., Zhao, B., Wu Y-C., Shi, L-F., Zhou J-C., and Chen Z-R. (2012). Stability of  $\beta$ -carotene in thermal oils. *J. Food Biochem.* **36**: 198-206.
94. Lemmens, L., De Vleeschouwer, K., Moelants, K. R., Colle, I. J., Van Loey A. M., and Hendrickx, M. E. (2010). Beta-carotene isomerization kinetics during thermal treatments of carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* **58(11)**: 6816-6824.
95. Henry, L. K., Catignani, G. L., and Schwartz S. J. (1998). Oxidative Degradation Kinetics of Lycopene, Lutein, and 9-*cis* and All-*trans*  $\beta$ -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75(7)**: 823-829.
96. Marty, C., Berset, C. (1988). Degradation products of *trans*-beta-carotene produced during extrusion cooking. *J. Food Sci.* **53**: 1880-1886.
97. Marty, C., and Berset, C. (1990). Factors affecting the thermal degradation of all-*trans*-beta-carotene. *J. Agr. Food Chem.* **38**: 1063-1067.
98. Stutz, H., Bresgen, N., Eckl, P. M. (2015). Analytical tools for the analysis of  $\beta$ -carotene and its degradation products. *Free Radic. Res.* **49(5)**: 650-680.
99. Caitlins, S., McClements, D. J., Weiss, J., and Decker, A. E. (2010). Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50(6)**: 515-532.

100. Onyewu, P. N., Ho, C-T., and Daun, H. (1986). Characterization of  $\beta$ -Carotene Thermal Degradation Products in a Model Food System. *J. Am. Oil Soc.* **63**: 1437-1441.
101. Ouyang, J. M., Daun, H., Chang, S. S. and Ho, C-T. (1980) Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization. *J. Food Sci.* **45**: 1214-1217.

**2. SISTEMAS  
EXPERIMENTALES:  
Material y métodos**



## **2. SISTEMAS EXPERIMENTALES: Material y métodos**

En este capítulo se especifican los métodos experimentales empleados para el para el tratamiento de muestras. Además, se explican en detalle los equipos empleados para desarrollar las medidas espectrales y las condiciones de obtención de espectros a lo largo de esta Tesis Doctoral.

### **2.1. Muestras Biológicas y Patrones de $\beta$ -Caroteno**

En este punto, se va a detallar el tratamiento llevado a cabo en las muestras empleadas antes de realizar las medidas experimentales, tanto biológicas como de patrones.

Las muestras biológicas analizadas fueron de distintos frutos, entre ellos, zanahorias tipo Nantesa, mangos cortados en rodajas, tomates cherry de distintas variedades, tomates Rambo y extractos de licopeno.

Los patrones estudiados fueron de  $\beta$ -caroteno en pastillas parecidas a las que se emplean para el estudio de infrarrojo.

#### *2.1.1. Rodajas de zanahoria y mango*

Las muestras de zanahoria y mango se adquirieron en el Mercado Central de Madrid y fueron lavadas con agua destilada para eliminar cualquier señal debida a otros componentes. Una vez lavadas, se conservaron a temperatura ambiente.

Debido a que una gran parte de los estudios se llevó a cabo en rodajas de zanahoria y mango, fue necesario cortar las muestras con precisión a la anchura deseada, para ello, se empleó un micrótopo modelo CM 1850 de la casa comercial Leica instalado en el C.A.I de Cartografía Cerebral situado en el Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense. Tras la congelación de la muestra se acciona el dispositivo obteniendo el espesor de rodaja deseado para cada medida.

En la parte del trabajo en la que las medidas se realizaron con muestras a espesor fijo, éste fue de 500  $\mu\text{m}$  para las rodajas de zanahoria y de 700  $\mu\text{m}$  para las de mango, ya que con esos valores se alcanza un compromiso entre la minimización de la fluorescencia y el máximo de señal Raman, aunque también se adquirieron espectros de rodajas de zanahoria empleando muestras de 5 mm de espesor. Finalmente, el diámetro de las rodajas tanto de zanahoria como de mango fue de 21 mm.

Para las medidas realizadas con muestras a espesor variable, se trabajó con valores comprendidos entre 400  $\mu\text{m}$  y 900  $\mu\text{m}$  con el fin de obtener una serie de datos relacionados con parámetros ópticos en función de la anchura de muestra.

Para una mejor ilustración, en la Tabla 2.1 se presentan los espesores empleados en ambos tipos de medidas.

**Tabla 2.1:** Espesores de las muestras empleadas.

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Espesor</b>	<b>Valor del espesor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Rodajas de zanahoria</b>	Fijo	500
		400
<b>Rodajas de zanahoria</b>	Variable	500
		600
		700
		800
		900
<b>Rodajas de mango</b>	Fijo	700

### 2.1.2. *Muestras de Tomates*

Se compraron distintos tipos de tomates Cherry y Rambo el mismo día de su llegada al mercado; cada tomate Cherry se identificó por su color y los tomates Rambo se seleccionaron preferiblemente en su estado inicial de maduración. Posteriormente, los frutos se limpiaron con agua destilada antes de colocarlos en el portamuestras del sistema de medida. Los frutos se almacenaron a una temperatura de 12°C hasta que se realizaron las medidas espectroscópicas. Una vez localizados en su posición óptima continuaron a la temperatura del laboratorio (22°C) hasta el final de los experimentos. Todas las medidas Raman comenzaron 12 horas después de la compra de los frutos.

### 2.1.3. *Extractos de licopeno*

Los extractos de licopeno se obtuvieron mediante una adaptación de la patente citada<sup>1</sup>, aunque únicamente se empleó hexano como disolvente. En primer lugar se aislaron las

pieles de los tomates, posteriormente se secaron a 50-60°C hasta pesada constante para finalmente, llevar a cabo la extracción. El volumen de hexano añadido fue de 1 mL por cada 13.2 mg de pieles. El tiempo de extracción fue de 90 minutos y la temperatura de extracción fue de 40°C.

Parte del exceso de disolvente se eliminó en un rotavapor, y el resto en un liofilizador Scanvac CoolSafe de 9L a una temperatura de  $-90^{\circ}\text{C} < T < 95^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y a presión reducida obteniéndose los extractos al final del proceso.

#### *2.1.4. Pastillas de muestra Patrón*

Para varios de los experimentos llevados a cabo, se empleó un patrón de  $\beta$ -caroteno adquirido a la casa comercial Sigma Aldrich con un 97% de pureza. La finalidad principal fue la de obtener medidas Raman en una matriz diferente a la biológica (inorgánica) y medidas de infrarrojo para evaluar la descomposición térmica del patrón (puro). En el caso del Raman, dicha matriz ha de estar compuesta por una sustancia inactiva en la citada espectroscopia con el fin de evitar posibles interferencias con la señal; en este caso, la sal empleada fue bromuro potásico (KBr). Las muestras fueron preparadas con concentraciones crecientes de  $\beta$ -caroteno, parecidas a las que se emplean para medidas de infrarrojo, siendo el espesor aproximado de las mismas de 0.2 mm. A pesar de preparar las muestras a diferentes concentraciones, la proporción de  $\beta$ -caroteno con respecto al KBr siempre fue  $\leq 4\%$  para optimizar la señal Raman evitando su saturación, ya que el detector posee una alta sensibilidad.

Al objeto de preparar la concentración deseada, definida ésta como mg de  $\beta$ -caroteno por cada 50 mg de pastilla total, se empleó una balanza Voyager V10640 adquirida a la casa comercial Oahus Corporation con 4 cifras significativas, suficiente para el tipo de estudios llevados a cabo. Esta balanza también se empleó para evaluar la pérdida de masa de las rodajas de mango en función del tiempo.

Por otro lado, en el caso de la espectroscopia infrarroja, al emplear la variante de ATR (Attenuated Total of Reflectance) el compuesto puede analizarse directamente sin necesidad de preparación de muestra.

## **2.2. Medidas de Espectroscopia UV-Vis**

Las medidas de UV-Vis presentadas se han llevado a cabo con dos espectrómetros diferentes. El primero de ellos, modelo Jasco V-530 UV-Vis, se empleó para las muestras

de  $\beta$ -caroteno. El segundo, utilizado para las medidas de capacidad antioxidante del  $\beta$ -caroteno se corresponde con el modelo UV-Vis Biotek  $\mu$ Quant que cuenta con el programa de Software Gen5.

### **2.3. Espectroscopia Raman Resonante de Transmisión (TRRS)**

La técnica seleccionada para las medidas de los carotenoides en esta parte de la Tesis Doctoral, especialmente del  $\beta$ -caroteno, (el componente mayoritario en rodajas de zanahoria) fue la Espectroscopia Raman Resonante de transmisión (TRRS). Dicha técnica es una combinación de la Espectroscopia Raman Resonante y la Espectroscopia Raman de Transmisión tal y como se describe en el Capítulo 1; esta técnica a su vez, fue desarrollada en nuestro laboratorio y empleada como sistema experimental en algunos trabajos ya publicados<sup>2</sup>.

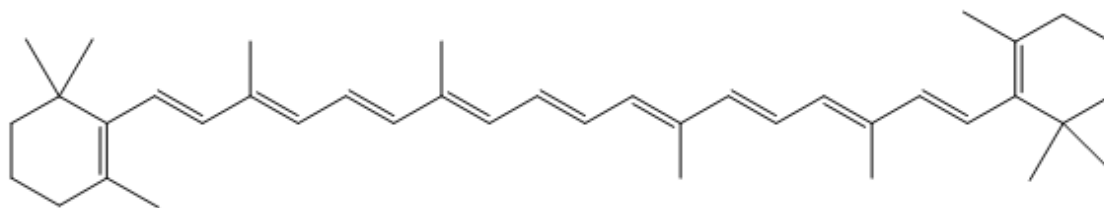
A continuación, se explica el porqué de la elección de este sistema experimental en lo referente al láser y a la configuración en la que se llevaron a cabo las medidas en este tipo de experimentos.

#### *2.3.1. Elección del láser de excitación*

Para las medidas en las que el componente mayoritario es el  $\beta$ -caroteno se empleó la configuración de transmisión tanto en muestras de zanahorias como de patrones. La elección del láser lleva asociados dos motivos fundamentales: El primero se basa en el grupo cromóforo de dobles enlaces conjugados extendidos linealmente presentes en dicha molécula.

El efecto de la conjugación incrementa significativamente la intensidad de absorción de las bandas  $\pi \rightarrow \pi^*$  (efecto hipercrómico). Esto se debe al aumento del momento dipolar de transición al incrementarse las dimensiones del cromóforo. Las estructuras más extendidas de manera lineal con todos los dobles enlaces conjugados en *trans*, presentan mayores intensidades en comparación con aquellas moléculas que contienen algunos dobles enlaces de la cadena conjugada en la posición *cis*<sup>3</sup>.

En la Figura 2.1 se puede observar la molécula del  $\beta$ -caroteno en la que destacan la elevada alternancia de enlaces simples y dobles a lo largo de toda la estructura.

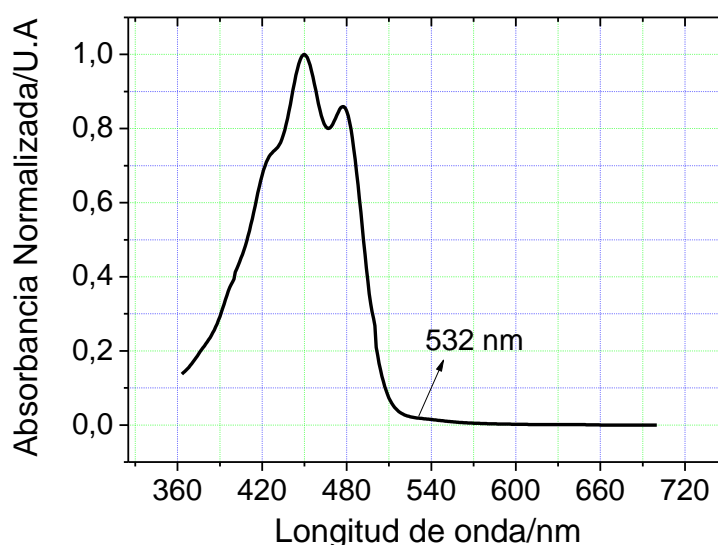


**Figura 2.1:** Estructura molecular del  $\beta$ -caroteno donde destaca la alta conjugación de dobles enlaces.

Debido a la gran longitud de la conjugación en este tipo de cadenas, la absorción es muy buena lo que convierte a la espectroscopia Raman Resonante en idónea para llevar a cabo medidas en este tipo de moléculas.

El segundo motivo referente a la elección de la longitud de onda de 532 nm, tiene que ver con el espectro de absorción mostrado en la Figura 2.2. En dicha figura, se aprecian dos máximos claramente diferenciados dentro de la banda de absorción. La longitud de onda que se va a emplear para realizar las medidas en condiciones de resonancia coincidirá pues, con uno de los valores de la cola de la banda de absorción. Al contrario de lo que se podría pensar, no se elige el máximo debido a la competencia existente entre el proceso Raman y la fluorescencia.

A pesar de que la excitación se encuentra en la cola de la banda de absorción, el efecto de la resonancia produce un aumento considerable de la señal Raman al encontrarse dentro de dicha banda. Por este motivo, al elegir la longitud de onda mencionada, el efecto de la fluorescencia queda minimizado de una manera significativa.



**Figura 2.2:** Espectro de absorción UV-VIS del  $\beta$ -caroteno en hexano.

Asimismo, conviene resaltar que gracias a la condición resonante, se producirán mejoras en la selectividad, con el consiguiente incremento en la intensidad de las señales obtenidas en comparación con los espectros no resonantes de este tipo de moléculas.

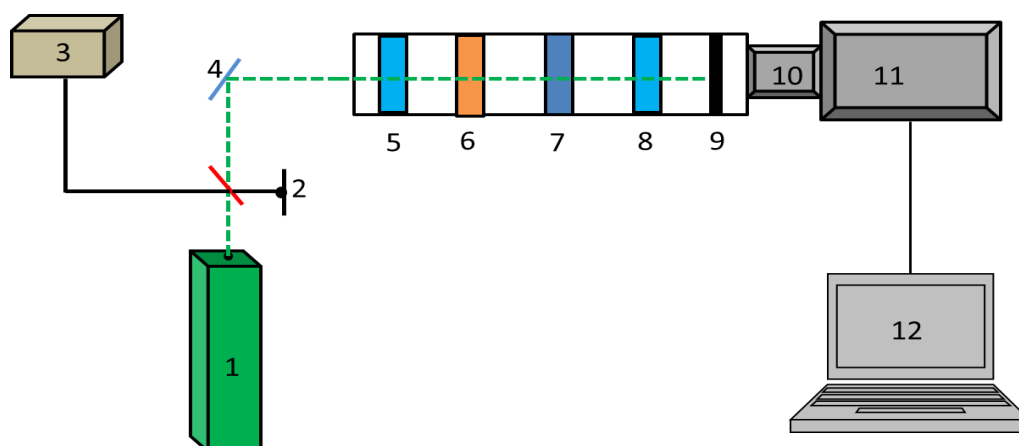
### 2.3.2. *Elección de la configuración*

En espectroscopia Raman, existen diversos tipos de configuraciones geométricas experimentales para la recogida de la señal, desde la configuración en backscattering (dispersión hacia atrás) con colección a 180°, hasta la de transmisión a 0°, pasando por la recogida de señal a 90°.

Para esta sección de la Tesis Doctoral, tal y como se ha comentado, el sistema de recogida de señal empleado fue el de transmisión. Uno de los motivos que condujeron a la elección de dicha configuración, fue la naturaleza de las muestras (rodajas de zanahoria y pastillas de patrón), donde la luz proveniente de la fuente de excitación atraviesa un medio turbio que no bloquea la luz en su totalidad. Además, esta técnica es ampliamente utilizada en el estudio de sólidos<sup>4, 5</sup>, siendo una de sus mayores ventajas la capacidad de obtener información de la muestra completa ya que atraviesa su matriz y no sólo su superficie.

### 2.3.3. *Equipo experimental*

Una vez seleccionada la fuente de excitación y la configuración, se empleó el montaje experimental que se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.3:** Montaje esquemático para las medidas de Transmisión Raman Resonante (TRRS). **1:** Láser de diodo (CW  $\lambda=532\text{nm}$ ); **2:** Fotodetector; **3:** Medidor de potencia; **4:** Espejo ( $90^\circ$ ); **5:** Lente plano convexa  $f$  (75mm) ( $\varphi=25.4\text{mm}$ ); **6:** Porta muestras con micrómetro XY y muestra; **7:** Diafragma; **8:** Lente plano convexa  $f$  (25mm) ( $\varphi=25.4\text{mm}$ ); **9:** Filtro de corte (Semrock modelo LP03-532RU-25); **10:** Espectrógrafo Shamrock 163; **11:** CCD (Charge Coupled Device) con módulo de enfriamiento: Detector modelo Newton (Andor) 920; **12:** Ordenador.

En la figura anterior, se puede ver que el sistema lleva asociado una cámara de detección CCD (Charge Coupled Device), dicha cámara se encuentra acoplada a un ordenador, con una versión software *Andor SOLIS*.

Tanto la CCD, como el láser, pasando por el espectrómetro, el diafragma, la rendija y el detector de potencia serán los mismos para las técnicas que emplean luz polarizada y sonda.

A continuación, se dará una breve descripción de las partes más importantes de las que consta el sistema de Transmisión Raman Resonante:

*Láser de estado sólido* ( $\lambda_{emisión} = 532 \text{ nm}$ ): Láser de diodo de onda continua modelo GVA-50 adquirido a la casa comercial Howard Potter. El haz láser cruza un sistema de espejos y posteriormente se focaliza gracias a una lente plano-convexa. El diámetro del *spot* (término que se empleará en vez de mancha) del láser que interacciona con la muestra varía de 300 a 1500  $\mu\text{m}$  dependiendo del experimento a realizar.

*Lente plano-convexa*: Está formada por un cristal cuya distancia focal es de 75 mm. Una vez que la luz del láser la atraviesa, el *spot* del mismo disminuye su diámetro significativamente, este hecho minimiza la superficie de incidencia sobre la muestra aumentando así la potencia del haz ya que ésta depende de la superficie iluminada.

*Micrómetro XY*: Se trata de una parte importante del sistema experimental, sobre él se coloca un portamuestras para fijar tanto las pastillas de patrones, como las rodajas de zanahoria. Gracias al micrómetro acoplado, se pueden realizar movimientos precisos en el plano XY tanto para medir en distintas zonas como para obtener una señal óptima.

Una vez que la muestra es atravesada, la radiación se dirige tras pasar por un diafragma hacia la CCD, pero antes atravesará otra lente, un filtro y una rejilla.

*Diafragma*: Su función principal es colimar la luz transmitida tras interactuar con la muestra. El diafragma es regulable, hecho que permite alcanzar un óptimo en la relación señal/ruido.

La luz colimada será recolectada a continuación mediante una segunda lente plano-convexa cuyo diámetro es  $\varphi = 25.4 \text{ mm}$  y cuya distancia focal es de 25 mm. Más adelante, el haz de luz que ha sido transmitido alcanza un filtro.

*Filtro:* Antes de entrar al detector, el sistema presenta un filtro razor-edged® modelo LP03-532RU-25 adquirido a la casa comercial Semrock. Éste, dota al sistema de una transmitancia del 98% de todas las longitudes de onda mayores de 532 nm y de una transmitancia menor del 7-10 % en radiaciones iguales o inferiores a la comentada. La luz finalmente alcanza una rendija y la atraviesa.

*Detector de potencia:* Como parte externa del sistema, existe un medidor de potencia con un cristal fotónico que permite conocer la intensidad del láser incidente sobre la muestra con el fin de llevar a cabo medidas reproducibles. El modelo del detector es LM-45 HTD de la casa comercial Coherent.

*Módulo de enfriamiento:* Finalmente, ligado al sistema, se halla un módulo de enfriamiento con líquido anticongelante encargado de mantener la temperatura de la cámara CCD constante (EX2-752BK).

*Espectrómetro acoplado a CCD:* Asociado a la cámara CCD se encuentra un espectrómetro Shamrock 163 que posee una rendija de entrada, con una anchura de entre 25-50  $\mu\text{m}$ , también regulable. Una vez sobrepasada se llega a una red de difracción y finalmente a la CCD. La CCD empleada se corresponde con el modelo Newton 920 series, adquirido a la casa comercial Andor junto con el consiguiente programa de software con el que se tomaron los espectros. Esta cámara se encuentra enfriada a una temperatura  $\leq -90^\circ\text{C}$  con el objetivo de minimizar el ruido.

### 2.3.4. Condiciones experimentales

En general, el número de adquisiciones seleccionado ha dependido de la naturaleza de la muestra y del cociente señal/ruido. En cada medida realizada a lo largo de esta Tesis Doctoral ha variado entre 10-30 adquisiciones, siendo de 10 segundos cada una, salvo algunas excepciones indicadas convenientemente al pie de los espectros correspondientes. Para llevar a cabo este tipo de medidas, se empleó una potencia de 30 mW, salvo algunas excepciones también indicadas. La temperatura de trabajo de la CCD fue  $\leq -90^\circ\text{C}$ .

Las adquisiciones de los espectros se llevaron a cabo con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Además, para las medidas de rodajas de zanahoria en función del radio la distancia al centro se varió entre 0 y 11 mm en incrementos de 300  $\mu\text{m}$ .

Para cada rodaja se repitieron tres experimentos por lo que se mostrará el promedio de 30 espectros en total. En cuanto a la realización de las medidas mediante esta técnica, se tuvieron en cuenta 10 rodajas de zanahoria de la misma variedad a espesor constante.

Por regla general los espectros Raman para una misma zona de estudio mostraban una intensidad similar con variaciones del 5–7%. Tras la adquisición de espectros de rodajas de zanahoria y pastillas de patrones se procedió a la corrección de la fluorescencia mediante el software *SCARF-Application* que es una versión modificada del conocido “*Rolling Circle Filter*”<sup>6,7</sup>.

Gracias a este programa se minimiza el efecto de la fluorescencia obteniéndose un espectro Raman mejorado, ideal para los estudios que se llevaron a cabo.

#### **2.4. Espectroscopia Raman Resonante de Transmisión con Luz Linealmente Polarizada (TRRS-LPL)**

Otro de los objetivos prioritarios de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de una nueva técnica a partir de otra preexistente<sup>2</sup>, que permita obtener mejoras y la posibilidad de medir nuevos parámetros imposibles de estimar con la técnica anterior. Por lo tanto, en este punto, se decidió ir un paso más allá y desarrollar una nueva técnica capaz de indicar el estado de salud de los frutos y la variación del cociente de despolarización tanto con el tiempo como con el espesor de las muestras.

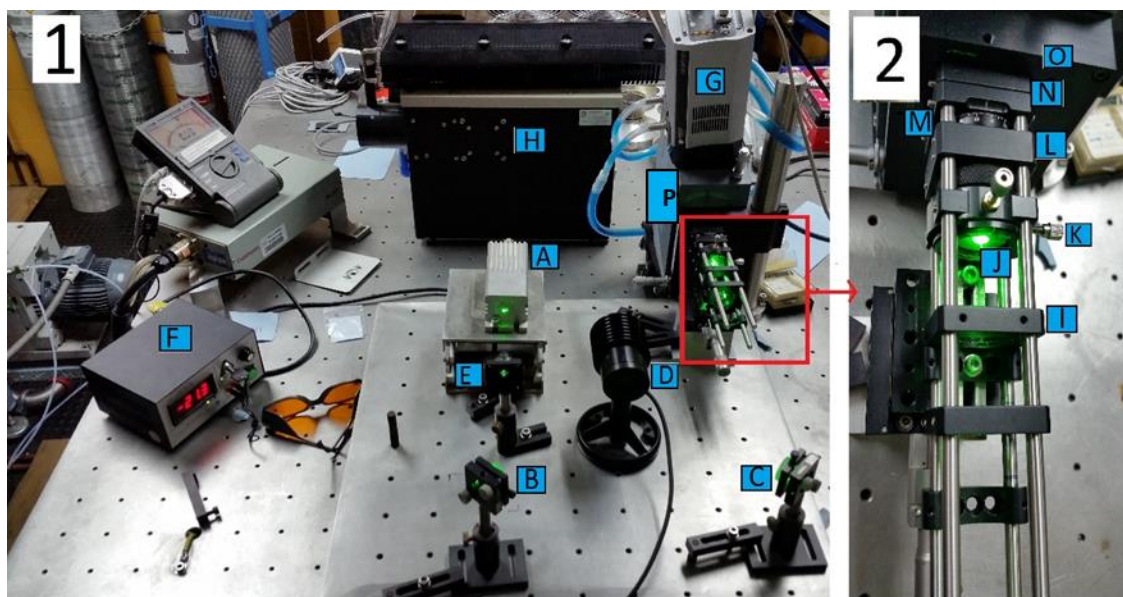
Partiendo del equipo anteriormente descrito, se incorporaron dos componentes ópticos adicionales. Un primer polarizador tipo Glan-Taylor antes de la muestra que permanecerá fijo durante todos los experimentos y cuya polarización es la misma que la del láser (paralela), y un segundo polarizador del mismo tipo que el anterior con dos configuraciones posibles; la primera paralela a la polarización del láser y por lo tanto al primer polarizador y la segunda perpendicular, de tal manera que si no existiese muestra y la luz atravesase consecutivamente ambos polarizadores, prácticamente se extinguiría.

De esta manera, los cambios observados respecto a la polarización de la señal Raman de cualquier banda bajo estudio, serán producidos por la propia muestra. Superponiendo ambos espectros se podrá obtener el cociente de despolarización de cada banda Raman mediante la división de los máximos de señal adquiridos en configuración paralela y perpendicular<sup>8</sup>, tal y como se indica en la ecuación [2.1].

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} \quad [2.1]$$

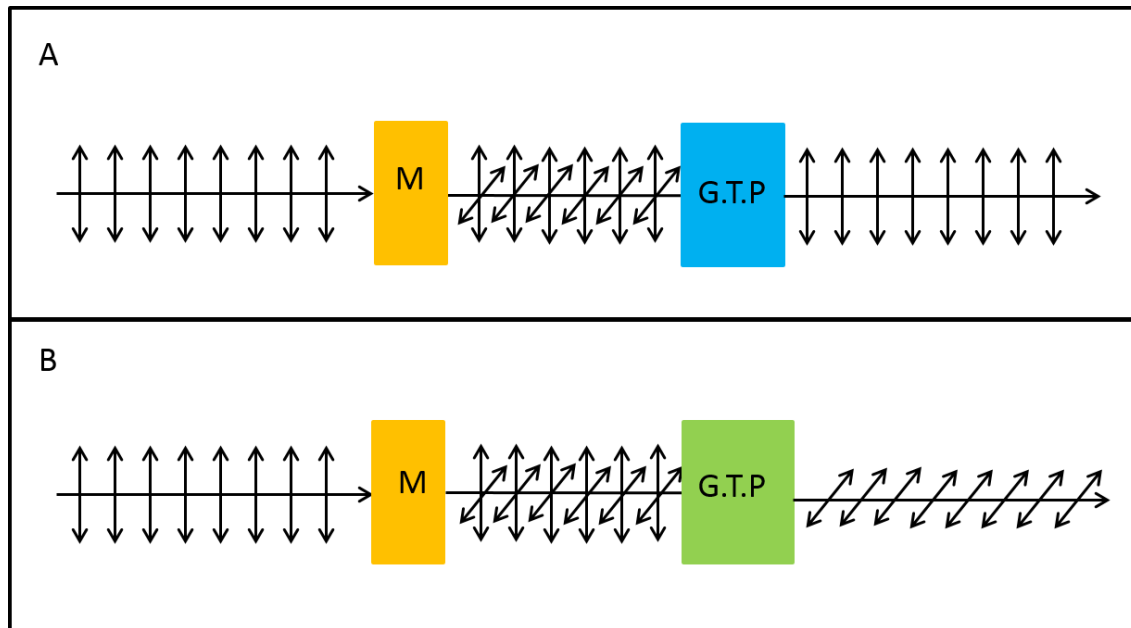
### 2.4.1. *Equipo Experimental*

En la Figura 2.4 se muestra el nuevo sistema experimental con todas sus partes descritas y detalladas en el pie de figura. Cabe destacar en este punto que la elección del láser y de la configuración se llevó a cabo en base a los mismos criterios que se han explicado en la sección 2.3.1.



**Figura 2.4:** Montaje experimental empleado para medir el cociente de despolarización en espectroscopia Raman Resonante de Transmisión con Luz Linealmente Polarizada. (1): **A:** Láser de diodo (CW  $\lambda=532\text{nm}$ ), **B** y **C:** Sistema de espejos, **D:** Medidor de potencia, **E:** Primer polarizador Glan-Taylor, **F:** Fuente de alimentación y control del láser, **G:** Cámara CCD, **H:** Sistema de refrigeración de la cámara CCD. (2): **I:** Lente plano convexa  $f$  (75 mm), **J:** Muestra, **K:** Portamuestras con micrómetro XY, **L:** Diafragma, **M:** Segundo polarizador Glan Taylor, **N:** Lente plano convexa de 25 mm de distancia focal y filtro 532 nm, **O:** Entrada al detector. **P:** Espectrómetro.

Como se ha comentado, al equipo antes descrito se le añadió un polarizador antes de la muestra para eliminar la radiación láser no polarizada en el plano deseado, de esta manera se puede afirmar que la radiación que incide sobre la muestra está polarizada como mínimo en un factor de  $10^5:1$  según las especificaciones del fabricante. Además, la adición de un segundo polarizador con las mismas características que el primero permite estimar un nuevo parámetro óptico, imposible de determinar con la técnica descrita en la sección 2.3. Para mayor claridad en la Figura 2.5 se muestra cómo se comporta la radiación antes y después de interactuar con la muestra.



**Figura 2.5:** Esquema ilustrativo de distintas configuraciones para la medida del cociente de despolarización. **M:** Muestra; **G.T.P.:** Polarizador Glan-Taylor; **A:** configuración para la medida de polarización paralela; **B:** configuración para la medida de polarización perpendicular.

Antes de llegar a la muestra, la luz está totalmente polarizada y es la propia matriz la que cambia dicha polarización, con el segundo polarizador y su configuración, se selecciona la componente que se desea detectar. De esta manera, en la Parte A de la figura se detectaría la polarización paralela respecto a la incidente, mientras que en la parte B se detectará únicamente la componente perpendicular con respecto a la radiación incidente.

De este modo, la despolarización producida por la muestra se puede medir. Únicamente hay que tener en cuenta las intensidades obtenidas de cada banda a ambos ángulos y aplicar la expresión [2.1].

#### *Definición de los ángulos paralelo y perpendicular*

Antes de añadir los polarizadores es imprescindible definir qué ángulo será paralelo a la polarización del láser y cuál perpendicular. Así, tal y como se ha especificado con anterioridad, cuando el polarizador tenga la orientación paralela al láser, permitirá pasar el máximo de luz, mientras que cuando el cristal tenga la orientación perpendicular teóricamente cruzará el mínimo de intensidad.

Para definir la disposición paralela de forma experimental, se llevaron a cabo medidas de intensidad a ángulos variables mediante el uso de un medidor de potencia. Los datos experimentales obtenidos se presentan en la Figura 2.6.

Una vez obtenido el ángulo al que la intensidad es máxima, éste quedó definido como el de la posición paralela con respecto a la polarización del láser. Seguidamente, se encontró el ángulo de mínima intensidad, que se definió como el de la posición perpendicular.

De esta manera, el ángulo en el que se deja pasar la mayor parte de la luz del láser se corresponde con aquel en el que el polarizador se encuentra a  $60^\circ$ . Encontrándose configuración perpendicular a  $150^\circ$ , es decir, desplazada  $90^\circ$  con respecto al máximo, tal y como predice la teoría.

Como ya se ha comentado, si se colocasen los dos polarizadores de forma consecutiva y sin muestra de por medio, es decir el primero a  $60^\circ$  y el segundo a  $150^\circ$ , y se midiese la intensidad después del segundo polarizador, su valor se encontraría por debajo del nivel de ruido.

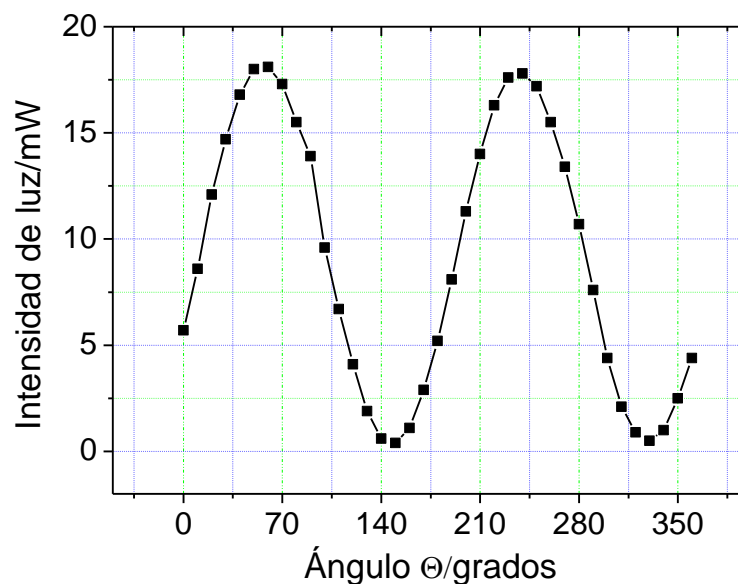


Figura 2.6: Intensidad frente al ángulo del polarizador

#### 2.4.2. Condiciones experimentales

Debido a que se estudiará la variación del cociente de despolarización con el espesor de la muestra, es vital que no exista ninguna dependencia del propio sistema de detección respecto a la polarización de la luz incidente. Por lo tanto, después del segundo polarizador la radiación pasa por una fibra óptica para aleatorizar la polarización y eliminar cualquier sensibilidad específica del instrumento de medida respecto al tipo de polarización de la luz empleada, eliminando de esta manera cualquier dependencia del sistema de detección con

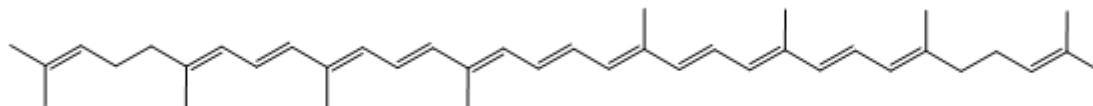
la polarización. Incluso en el caso de que persistiera alguna contribución menor asociada a la sensibilidad de polarización, ésta sería constante, es decir, constituiría un pequeño factor de escala sin mayor relevancia, puesto que el parámetro medido tiene que ver con la variación del coeficiente de despolarización en función del espesor de la muestra.

En los estudios de variación del cociente de despolarización con el espesor y con el tiempo, se realizaron cinco determinaciones para cada punto experimental presentado.

Las condiciones experimentales típicas para cada espectro de Transmisión Raman Resonante con Luz Linealmente Polarizada fueron de 15 adquisiciones de 10 segundos cada una con una potencia de láser de 30 mW, y una temperatura de la cámara CCD  $\leq 90^{\circ}\text{C}$ . La fluorescencia de los espectros obtenidos se eliminó mediante el software *SCARF Application* basado en el método del *Rolling Circle Filter*<sup>6, 7</sup> tal y como se ha comentado en técnicas anteriores.

## 2.5. Espectroscopia Raman Resonante con Dispersión a $180^{\circ}$ y a $90^{\circ}$

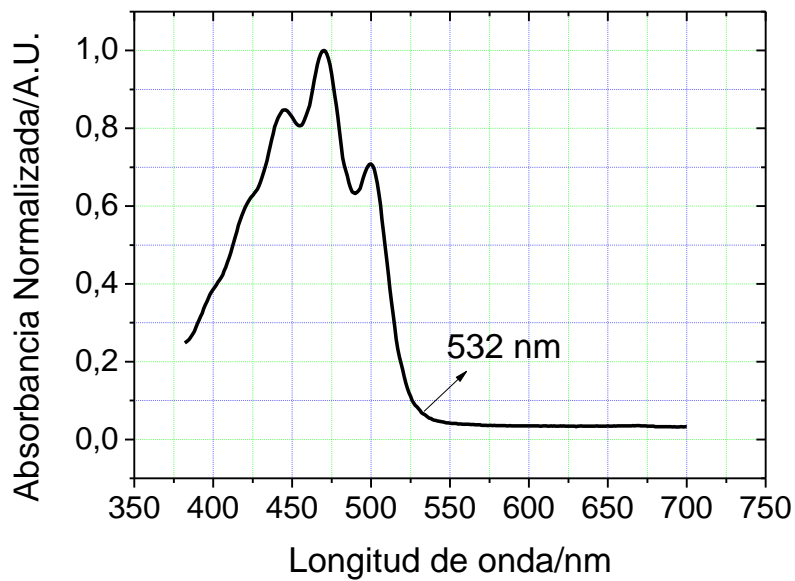
Para el análisis y medidas de la evolución temporal de la señal Raman de carotenoides presentes en tomates, hay que tener en cuenta su contenido mayoritario en licopeno, cuya estructura es muy similar a la del  $\beta$ -caroteno. En la Figura 2.7 se puede observar la conformación molecular del citado polieno.



**Figura 2.7:** Estructura molecular del licopeno donde destaca la alta conjugación de dobles enlaces.

Tal y como se puede intuir, sus características son muy similares a las de la molécula de  $\beta$ -caroteno antes estudiada debido a su similitud estructural de dobles enlaces conjugados.

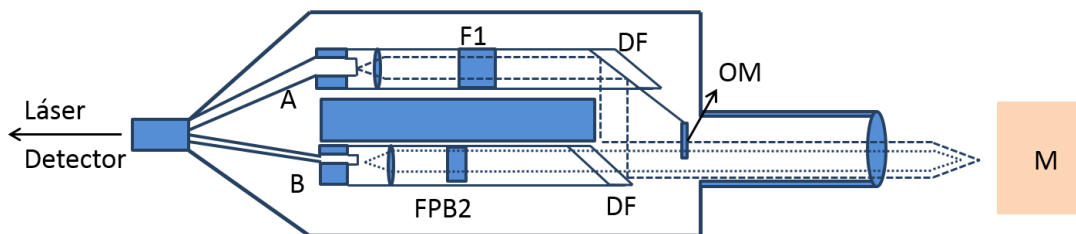
En la Figura 2.8 se presenta un espectro de absorción perteneciente a un extracto de licopeno. A 532 nm, al igual que sucedía con el  $\beta$ -caroteno existe cierta absorción. Por ello, para este sistema experimental se empleó el mismo láser que en las medidas anteriores a la citada longitud de onda ya que las muestras estudiadas fueron de tomates.



**Figura 2.8:** Espectro de absorción UV-VIS de un extracto de licopeno en hexano

El sistema experimental consta de una fibra óptica asociada a una sonda. La luz del láser se enfoca sobre el canal de excitación de la citada sonda a través una lente.

La estructura de la sonda se muestra en la Figura 2.9 donde se pueden apreciar sus diferentes partes.



**Figura 2.9:** Sonda de la casa comercial InPhotonics modelo: RPBXXX empleada para las medidas de intensidad Raman a 180° (backscattering) y a 90° empleando solo el canal de detección. **A)** Canal de detección. **B)** canal de excitación. **OM:** Obturador manual. **DF:** Filtro dicróico **F1:** Filtro de paso largo OD (Optical Density) > 6. **FPB2:** Filtro de paso de banda. **M:** Muestra.

La sonda acoplada a la fibra consta de dos zonas claramente diferenciadas, un canal de detección que se extiende hasta la entrada a la cámara de detección CCD, donde se adquirirá la señal Raman procedente de la muestra (A); y un canal de excitación a través del cual circula la luz del láser previamente enfocada en la fibra con una lente (B).

El canal de excitación consta de un filtro de banda estrecha, cuya misión es asegurar que la longitud de onda incidente en la muestra sea de 532 nm. Por otro lado, el canal de

detección posee un filtro de paso largo cuya densidad óptica es  $OD > 6$ . Además, al final del canal de excitación existe un filtro dicróico encargado de redirigir la señal hacia el canal de excitación.

### *2.5.1. Espectroscopia Raman Resonante con sonda en Backscattering*

En lo referente al estudio de medidas de intensidad Raman de los distintos tipos de tomates con el paso del tiempo, la técnica espectroscópica empleada, fue desarrollada a modo de ampliación con respecto a las usadas previamente a lo largo de esta Tesis Doctoral. El sistema consta de la fibra óptica antes presentada modelo RPBXXX de la casa comercial InPhotonics con dos canales, el láser enfocado es de onda continua y presenta una longitud de onda de 532 nm que, como ya se ha descrito, es resonante para este tipo de muestras. Asimismo, y en contraposición a técnicas empleadas más adelante, en la presente metodología se emplearán ambos canales.

La distancia óptima de colocación de la muestra según el fabricante, es de 1 cm para recolectar la señal de la forma más eficiente posible en la configuración de retrodispersión. Por otro lado, el esquema del sistema experimental descrito para este tipo de medidas de intensidad de señal con el paso del tiempo se puede ver en la Figura 2.10 a.

Debido a que las muestras objeto de estudio para este tipo de técnica son de tomates, y como lo que se pretende estudiar es la evolución de contenido de licopeno en la piel, no es necesaria la configuración de transmisión, siendo más adecuada la que aquí se emplea, es decir, a  $180^\circ$ .

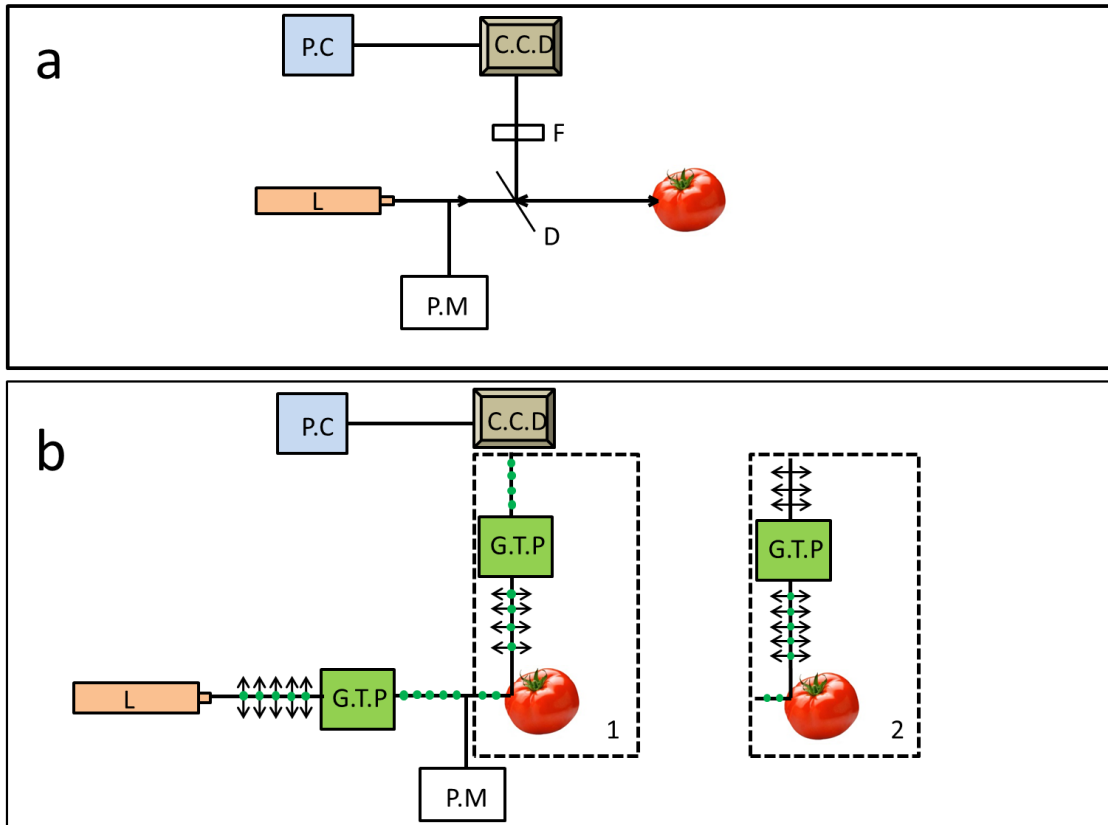
### *2.5.2. Espectroscopia Raman Resonante con Sonda a $90^\circ$ empleando Luz Polarizada*

Para las medidas de evolución de la Polarización con el tiempo se empleó el equipo experimental que se muestra en la Figura 2.10 b. En este caso, la configuración de recolección de muestra ha cambiado y ahora es a  $90^\circ$ .

Como novedad respecto a la obtención de espectros con sonda acoplada a fibra a  $180^\circ$ , en vez de enfocar el láser con una lente a través de la fibra óptica, se ha colocado un sistema de espejos cuya finalidad es conducir la radiación hasta la muestra tras atravesar el primer polarizador. Además, de igual manera que sucedía con el sistema comentado en la sección 2.4, se varió el ángulo de un segundo polarizador Glan-Taylor. Tal y como se aprecia en la imagen 2.10 b., en la posición 1 de la figura, el segundo polarizador está colocado en disposición paralela con respecto a la radiación incidente sobre la muestra. En la parte 2 de

la misma figura el segundo polarizador se orienta de manera perpendicular con respecto a dicha radiación.

Es preciso indicar en este punto, tal y como se dejó entrever con anterioridad, que en las medidas realizadas con la presente técnica, únicamente se empleó el canal de detección de la sonda, ya que la excitación se produce a través del sistema de espejos antes mencionado y no enfocando el láser en la fibra óptica como sucedía en otras metodologías.



**Figura 2.10:** Montaje experimental para la medida de: (a) Señal Raman de carotenoides en tomates en configuración de Backscattering 180° (b) Cocientes de despolarización de las bandas Raman de los carotenoides presentes en el pericarpio exterior de los tomates a 90°. **PC:** Ordenador, **CCD:** Detector, **F:** Filtro, **D:** Dicroico, **P.M:** Medidor de potencia, **L:** Láser de diodo (CW,  $\lambda=532\text{nm}$ ), **G.T.P:** Polarizador de Glan-Taylor. 1) Configuración paralela, i.e.  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ . 2) Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$  Donde  $\hat{\epsilon}$  Representa el vector unitario del campo eléctrico.

Como se ha mencionado en la sección 2.4.2, es fundamental, eliminar la posible dependencia del detector respecto a la polarización de la luz incidente, por ello, después del segundo polarizador la radiación pasa por una fibra multimodal, que se emplea para aleatorizar dicha polarización, lo que reduce significativamente la radiación Raman polarizada eliminando de esta manera cualquier dependencia de la polarización en lo que al sistema de detección se refiere.

### 2.5.3. Condiciones experimentales

A través de esta técnica, mediante la adición de la sonda y la fibra óptica se pudieron detectar las señales de evolución temporal de los distintos tipos de tomate.

En la parte 1 de la Figura 2.10 b se muestra de manera esquemática la disposición del equipo empleado. Todas las medidas se realizaron tras los tratamientos de muestras explicados en la sección inicial de este capítulo. Cada espectro fue el resultado de un promedio de 30 adquisiciones de diez segundos cada una empleando una potencia de láser de 46-50 mW con una temperatura en la cámara de detección  $\leq -90^{\circ}\text{C}$ .

Al igual que en otras metodologías, para estar seguros de que se mide siempre en el mismo punto, la muestra se ubica en un porta-muestras previamente fijado mediante tornillos.

Gracias a los procedimientos anteriormente descritos, la fluorescencia se elimina con el Software *Scarff Application*<sup>6,7</sup>, y una vez sustraída se toma la intensidad máxima del modo vibracional  $\nu_1$  a cada tiempo, dando como resultado gráficas de evolución temporal.

Para los cálculos de cocientes de despolarización, los espectros se superponen y se tiene en cuenta la intensidad de los máximos empleando la expresión [2.1], que como se ha indicado anteriormente es uno de los parámetros a estudiar en este apartado de la Tesis.

Finalmente, los resultados se representan en una gráfica y se ajustan a una ecuación matemática.

## **2.6. Espectroscopia Raman Resonante a 514.5 nm**

Para las medidas de extractos ricos en licopeno y de patrones de  $\beta$ -caroteno y su variación con el tiempo de tratamiento térmico, el sistema experimental fue diferente a los empleados hasta el momento.

Los espectros Raman se obtuvieron con un espectrómetro de triple monocromador Jobin-Yvon T64000 en configuración directa (distancia focal 0.640 m, apertura f/7.5) equipado con una rejilla holográfica de 1800 surcos por mm. Por otro lado, se puede destacar que la apertura de la rendija fue de 200  $\mu\text{m}$ . El sistema es similar al descrito en la referencia<sup>9</sup>.

La dispersión elástica Rayleigh se eliminó con un filtro Notch, capaz de reducir su intensidad un factor de  $10^6$ . El Sistema de detección se mantuvo enfriado con nitrógeno líquido a lo largo de todos los experimentos.

La longitud de onda del láser empleado como fuente de excitación fue de 514.5 nm correspondiente a la línea del  $\text{Ar}^+$  (modelo Coherent, Innova 90C-04). Es importante reseñar, que a pesar de no coincidir con la longitud de onda empleada hasta el momento, continúa siendo resonante con la transición electrónica  $\pi \rightarrow \pi^*$ , tal y como sucedía con la empleada anteriormente y tal como se desprende de los espectros de absorción presentados con anterioridad. La potencia que recibió la muestra fue menor de 1 mW en el conjunto de medidas. Asimismo, todos los espectros obtenidos se registraron gracias a un objetivo Olympus MSPlan 50x. Finalmente, es preciso destacar que gracias al acoplamiento de un microscopio confocal sólo se registraban las zonas de la muestra que se encontraban dentro del foco. Todos los espectros fueron registrados mediante 10 adquisiciones de 15 segundos cada una.

### **2.7. Espectroscopia Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR)**

Para los análisis cinéticos referentes a la estabilidad térmica de  $\beta$ -caroteno y la evolución temporal de los extractos de licopeno con la temperatura, la técnica empleada fue la de Espectroscopia Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR).

Se empleó un espectrómetro de Infrarrojo modelo Vertex70 de la casa comercial Bruker con la versión de software *Opus 7.5*. Debido a que el espectro obtenido por ATR no se corresponde de manera exacta con el logrado por transmisión, es necesario aplicar un factor de corrección (Extended ATR Correction) gracias a un algoritmo incorporado el software antes citado. En todos los casos el factor empleado fue de 1, ya que con este valor la aproximación a los espectros obtenidos por transmisión era casi total.

Cada espectro fue adquirido en el intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ , promediando 128 adquisiciones en cada medida.

El sistema se encuentra a baja temperatura, enfriado con nitrógeno líquido, y con un flujo constante de nitrógeno para evitar las señales asociadas al  $\text{CO}_2$ . Finalmente, se puede resaltar que, en todos los espectros se ha aplicado una corrección de posibles señales producidas por la humedad y el  $\text{H}_2\text{O}$  presente en el ambiente mediante una función disponible en el software ya descrito.

## 2.8. Modelización Molecular

En los estudios de modelización molecular llevados a cabo referentes al  $\beta$ -caroteno, sus productos de descomposición esperados y el licopeno, es interesante mencionar que se emplearon dos métodos diferentes aunque con resultados similares.

Los cálculos se desarrollaron a través del programa Gaussian 03w y 09w con sus versiones (G03w y G09w, respectivamente)<sup>10,11</sup> mediante dos métodos DFT (Density Functional Theory). Debido a que las funciones de polarización son importantes a la hora de llevar a cabo estudios de estructuras en disposición todo *trans* y son esenciales para tener en cuenta las polarizabilidades de los electrones  $\pi$  en sistemas conjugados<sup>12-14</sup>, el conjunto de bases elegido para los cálculos fue aquel que tiene en cuenta todas las funciones de polarización de cualquier átomo diferente a hidrógeno, es decir, el 6-31G\*.

En primer lugar, se tuvieron en cuenta los cálculos de tipo *mPW1PW91/6-31G\** ya que presenta un buen compromiso entre la precisión de los resultados obtenidos y el coste computacional requerido. Por otro lado, la relevancia de los efectos de dispersión e interacciones a largo alcance fue evaluada de manera análoga mediante la realización de cálculos teniendo en cuenta el método/base de cálculo<sup>15</sup>  $\omega$ B97xD/6-31G\* con resultados muy parecidos.

Asimismo, se llevó a cabo una optimización de la geometría mediante el Algoritmo de Berny<sup>16</sup>, empleando coordenadas internas redundantes y considerando los criterios de convergencia por defecto de los programas<sup>10, 11</sup>. Se compararon las geometrías obtenidas y se realizaron el resto de cálculos con las más estables.

Los cálculos vibracionales de frecuencias (incluidas las actividades Raman) se desarrollaron para todas las geometrías previamente optimizadas al mismo nivel teórico, con la finalidad de verificar la convergencia a un mínimo real, o lo que es lo mismo, sin autovalores negativos.

Las moléculas optimizadas, ángulos obtenidos, distancias de enlace, espectros calculados, energías, orbitales frontera y el resto de parámetros pueden calcularse gracias al software antes citado, y pueden evaluarse mediante el software GaussView empleando la versión 5<sup>17</sup>.

## **2.9. Tratamientos Térmicos de las Muestras**

Para la evaluación de la descomposición térmica de las muestras, tanto las muestras (patrones de  $\beta$ -caroteno y extractos de licopeno) fueron calentadas y expuestas a condiciones atmosféricas mediante intervalos conocidos de temperatura en un horno. Tras cada intervalo se llevaron a cabo análisis mediante espectroscopia infrarroja y Raman con las características antes descritas.

Las temperaturas de trabajo para el patrón de  $\beta$ -caroteno fueron 90°C, 100°C, 115°C y 130°C. Por el contrario, para el extracto de licopeno fue de 115°C, dado que como se explica en la sección 6.1.2 la señal de seguimiento presenta una intensidad baja que hace difícil el estudio de la cinética completa, eligiéndose la citada temperatura como representativa por su valor intermedio con respecto a las estudiadas en el  $\beta$ -caroteno.

## **2.10. Evaluación de la Capacidad Antioxidante**

Con la finalidad de evaluar el poder antioxidante del  $\beta$ -caroteno, y su variación con el proceso de descomposición, se realizaron estudios de capacidad antioxidante de acuerdo con los procedimientos descritos por otros investigadores<sup>18</sup>. Primeramente, se prepararon disoluciones metanólicas a distintas concentraciones tanto del producto a  $t = 0$  h como de las muestras que habían estado en el horno 4 y 8 horas. A continuación, a cada disolución de  $\beta$ -caroteno de concentración variable se le añadió una disolución de 0.1 mg/mL de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) en metanol para posteriormente medir la absorbancia a 517 nm mediante espectroscopia UV-Vis tras 30 minutos de interacción.

## 2.11. Referencias

1. Lavechia, R., and Zuorro, A. (2009). Process for the extraction of lycopene. Número de publicación: EP2086562 A1. Número de solicitud: EP20070847115. Número de PCT: PCT/EP2007/061923.
2. González, A. G., and González-Ureña, A. (2012). Transmission Resonance Raman Spectroscopy: Experimental Results Versus Theoretical Model Calculations. *Appl. Spectrosc.* **66**: 1163–1170.
3. Kohler, B. E., and Samuel, I. D. W. (1995). Experimental Determination of Conjugation Lengths in Long Polyene Chains. *J. Chem. Phys.* **103-14**: 6248-6252.
4. Matousek, P., and Parker, A. W. (2006). Bulk Raman Analysis of Pharmaceutical Tablets. *Appl. Spectrosc.* **60**: 1353-1357.
5. Matousek, P., and Parker, A. W. (2007). Non-Invasive Probing of Pharmaceutical Capsules Using Transmission Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **38**: 563-567.
6. Brandt, N. N., Brovko, O. O., Chikishev A.Y., O. D. Paraschuk O. D. (2006). Optimization of the Rolling-Circle Filter for Raman Background Substraction. *Appl. Spectrosc.* **60**: 288-293.
7. González, A. G., González-Ureña, A., Lewis, R. J., and van der Zwan, G. (2012). Spectroscopy and Kinetics of Tyrosinase Catalyzed *trans*-Resveratrol Oxidation. *Phys. Chem. B.* **116(8)**: 2553-2560.
8. Carey, P. R. (U.S.A). (1982). Biochemical applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. Academic Press INC, pg. 99.
9. Vueba, M. L., Batista de Carvalho, L. A. E., Veiga, F., Sousa, J. J., and Pina, M. E. (2006). Influence of Celulose Ether Mixtures on Ibuprofen Release: MC25, HPC and HPMC K100M. *Pharm. Dev. Technol.* **11**: 213-228.
10. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, Jr., J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts,

R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C., Pople, J. A., Gaussian 03, Revision D.01, in: Gaussian 03, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

11. Frisch, G. W. T. M. J., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, J. R. C. M. A., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, H. N. G. A., Caricato, Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov J. B. A. F, Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada, M., Ehara, K. T. M, Fukuda, R, Hasegawa J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda O. K. Y., Nakai H., Vreven, T., Montgomery, Jr. J. A., Peralta Jr. F. O. J. E., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers, E., Kudin, V. N. S. K, Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, A. R. K., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J, Cossi, N. R. M., Millam, J. M., Klene, M., Knox J. E., Cross, J. B., Bakken, C. A. V., Jaramillo J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, A. J. A. O., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, K. M. R. L., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador, J. J. D. P., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, J. B. F. O., Ortiz J. V., Cioslowski J., and Fox D. J., (2009). Gaussian 09, Revision A.02, in: Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT,

12. Lee, H. M., Kim, J., Kim, C.-J., and Kim, K. S. (2002). *Ab initio* study of the isomerization of retinal chromophore and its derivatives. *J. Chem. Phys.* **116(15)**: 6549-6559.

13. Lee, J. Y., Hahn, O., Lee, S. J., Choi, H. S., Shim, H., Mhin, B. J., and Kim, K. S. *Ab Initio* study of *s-trans*-1,3-Butadiene Using Various Levels of Basis Set and Electron Correlation: Force Constants and Exponentially Scaled Vibrational Frequencies. (1995). *J. Phys. Chem.* **99(7)**: 1913-1918.

14. Lee, J. Y., Hahn, O., Lee, S. J., Mhin, B. J., Lee, M. S., and Kim, K. S. (1995). *J. Phys. Chem.* Vibrational Spectra of all-*trans*-1,3,5,7-Octatetraene. **99(8)**: 2262-2266.

15. Chai, J.-D., and Head-Gordon, M. (2008). Long-range corrected hybrid density functionals with damped-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**: 6615-6620.
16. Peng, C., Ayala, P.Y., Schlegel, H.B., and Frisch, M.J. (1996) Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comput. Chem.* **17(1)**: 49-56.
17. Dennington, R., Keith, T., and Millam, J. (2009). GaussView, Version 5, in: GaussView, Version 5, Gaussian, Inc., Shawnee Mission KS.
18. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* **40**: 945-948.



**3. RESULTADOS**

**EXPERIMENTALES I:**

**Espectroscopia Raman de**

**carotenoides**



### **3. RESULTADOS EXPERIMENTALES I: Espectroscopia Raman de carotenoides**

En el presente capítulo se exponen los resultados alcanzados a lo largo de esta Tesis Doctoral de espectroscopia Raman de carotenoides presentes en muestras de diversos frutos tales como zanahorias, mangos, tomates Rambo y tomates cherry. Dichos resultados se dividen en varias partes: la primera de ellas se centra en el estudio del  $\beta$ -caroteno presente en rodajas de zanahoria y sus medidas espectroscópicas en función del radio; la segunda parte hace referencia a la variación del parámetro óptico de cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) en varias muestras y condiciones experimentales, tanto con el espesor a un tiempo fijo como con el tiempo a espesor fijo. Finalmente, se exponen los valores de los cocientes de despolarización de las bandas Raman más significativas para diversos tipos de tomates en función del tiempo post-cosecha así como los resultados de la evolución temporal del cociente  $\nu_1/\nu_4$ .

La parte central de este trabajo se basa en la espectroscopia Raman resonante de carotenoides. Concretamente se han desarrollado estudios espectroscópicos sobre muestras que contenían  $\beta$ -caroteno y licopeno. Estos analitos, han sido medidos en algunos casos directamente sobre los propios tejidos biológicos (*in vivo*) y en otros en matrices inorgánicas de KBr o en extractos ricos en licopeno.

#### **3.1. Espectros Raman Resonantes, descripción de bandas fundamentales**

El principal objetivo del siguiente apartado es tener una idea de los modos vibracionales más significativos de las diferentes matrices tanto biológicas como inorgánicas, para ello, se exponen algunos de los espectros obtenidos pertenecientes a las muestras ya mencionadas. La principal observación que se puede destacar, es la sencillez en cuanto a número de bandas presente en todos los espectros a pesar de la complejidad de las matrices y de la cantidad de sustancias diferentes a los carotenoides presentes en este tipo de tejidos. La gran selectividad observada se debe al carácter resonante de la excitación Raman que simplifica considerablemente los resultados espectrales<sup>1</sup>.

A continuación, se explicarán de forma detallada los espectros de cada tipo de fruto indicándose la disposición geométrica en la que fueron adquiridos, así como la descripción de los modos vibracionales más significativos.

Como ya se ha comentado, a todos los espectros Raman realizados se les ha aplicado la corrección de la fluorescencia descrita en el Capítulo 2 de esta memoria, que emplea el software *SCARFF Application* que es una variación del *Rolling Circle Filter*<sup>2,3</sup> ya que, debido al efecto resonante, inevitablemente en todos ellos existe una contribución de fluorescencia significativa.

### *3.1.1. $\beta$ -caroteno*

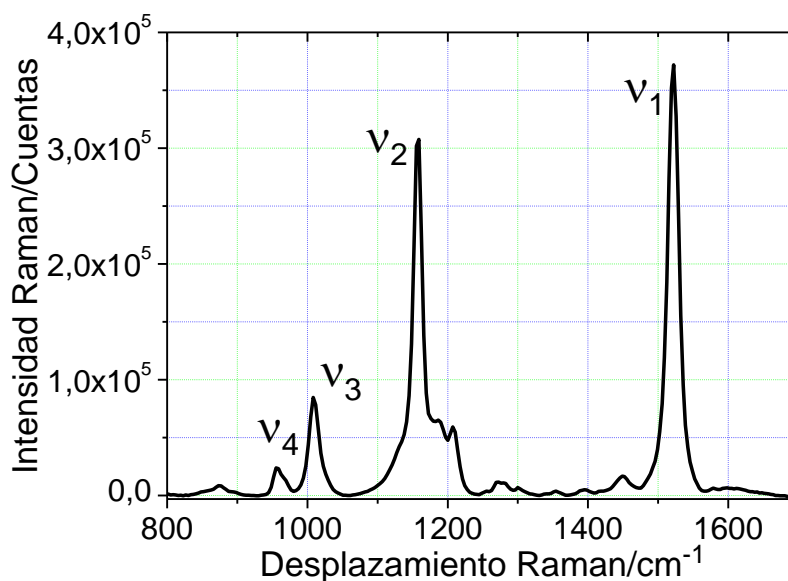
El  $\beta$ -caroteno es un pigmento presente en gran número de frutos tales como: calabazas, boniatos, zanahorias y mangos. Teniendo en cuenta estos datos, el presente estudio se focaliza en algunos de ellos (los dos últimos) con el fin de ampliar el conocimiento existente sobre los mismos. Para ello, se llevaron a cabo medidas espectroscópicas no sólo para detectar dicho pigmento en los tejidos sino también para analizar la evolución de ciertos parámetros ópticos. La estructura de este polieno se puede ver en la Figura 2.1 que se encuentra en el Capítulo 2.

### *Zanahoria*

El contenido de carotenoides en zanahorias es bien conocido ya que en los últimos años ha sido ampliamente estudiado mediante diferentes técnicas como HPLC<sup>4</sup> y UV-VIS<sup>5, 6</sup>. Además, en otros estudios se ha empleado la técnica Raman para su determinación<sup>7, 8</sup>, siendo una de las variantes más aceptadas el Raman Resonante<sup>9</sup> debido a la alta simplificación espectral y al aumento de la sensibilidad ya comentados.

Antes de estudiar la distribución espacial de carotenoides en zanahoria y la variación del cociente de despolarización con el espesor y el tiempo en diversos tipos de frutos, es necesario conocer sus bandas Raman más significativas. Para ello, se obtuvieron algunos espectros en muestras de rodajas de zanahoria de 5 mm de espesor, este grosor permite que la luz pueda traspasar el medio turbio de la matriz en su camino hacia el detector, proporcionando una señal bien definida. Por lo tanto, dicha muestra se fijó en un soporte anclado a un micrómetro XY tal y como se explica en el Capítulo 2 de esta misma memoria, midiendo posteriormente las señales Raman.

En la Figura 3.1 se muestra un espectro adquirido para una rodaja de zanahoria tipo Nantesa en configuración geométrica de transmisión y obtenido con un láser de longitud de onda de 532 nm que cumple las condiciones de resonancia.



**Figura 3.1:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de zanahoria de 5 mm de espesor. 66 adquisiciones de 10 segundos cada una.

En la figura se aprecian fundamentalmente cuatro señales a los números de ondas 1522, 1158, 1008 y 955  $\text{cm}^{-1}$  asignados a los modos  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  y  $\nu_4$  respectivamente. Estas señales tan intensas, son las pertenecientes a los modos vibracionales resonantes del  $\beta$ -caroteno con la excitación Raman a 532 nm. La asignación de dichas vibraciones, y la de otras menos importantes se fundamentan en algunos estudios llevados a cabo por otros investigadores, donde fueron determinadas tras la realización de cálculos computacionales<sup>10</sup> y en base a datos obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación<sup>11</sup>.

Es interesante mencionar la semejanza de la banda más intensa alrededor su eje central, es decir, la simetría de la señal etiquetada como  $\nu_1$  que hace pensar que la contribución de licopeno al pico observado es mínima. Esto se debe a que el licopeno tiene su banda desplazada a unos pocos  $\text{cm}^{-1}$  con respecto a la del  $\beta$ -caroteno, y la presencia de ambos resultaría en una banda asimétrica. Además, la citada afirmación es consistente con algunos estudios realizados por otros grupos de investigación, en los que se puso especial atención a zanahorias tipo Nantesa y Mokum donde no se detectó ninguna aportación debida al licopeno<sup>12</sup>.

En este primer espectro, se expondrán todas las bandas y contribuciones; más adelante y por simplicidad, únicamente se pondrá atención a los cuatro modos más intensos,

exceptuando de los casos en los que se especifique claramente. En la Tabla 3.1 se presentan las asignaciones de todas aquellas señales apreciables en la figura antes mostrada.

**Tabla 3.1:** Asignaciones para el espectro Raman Resonante de Rodaja de Zanahoria de 5 mm de espesor.

<b>Desplazamiento Raman e Intensidad/ cm<sup>-1</sup></b>	<b>Asignación Vibracional</b>
873 w	$\nu$ (C-C)
955 w	$\omega_{op}$ (C=C-H) ( $\nu_4$ )
1008 m	$\rho_{ip}$ (CH <sub>3</sub> ) ( $\nu_3$ )
1158 s	$\nu_2$ (C-C) ( $\nu_2$ )
1186 m	$\nu$ (C-C)
1272 w	$\rho_{ip}$ (C-H)
1279 w	$\rho_{ip}$ (C-H)
1452 w	$\delta_{as}$ (-CH <sub>3</sub> )
1522 s	$\nu_1$ (C=C) ( $\nu_1$ )

*Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\omega$ , flexión;  $\rho$ , balanceo; intensidades: s, fuerte; m, medio, w, suave.; simetrías: as, asimétrico; contribuciones: op, fuera del plano; ip, en el plano.*

El modo denominado  $\nu_4$  tal y como se mostrará más adelante, ha sido asignado teniendo en cuenta algunos estudios desarrollados por otros grupos de investigación<sup>10, 13-16</sup>. Los autores citados lo identifican con una deformación fuera del plano que se encuentra acoplada a la torsión del enlace y es sensible a las distorsiones de la configuración plana del carotenoide.

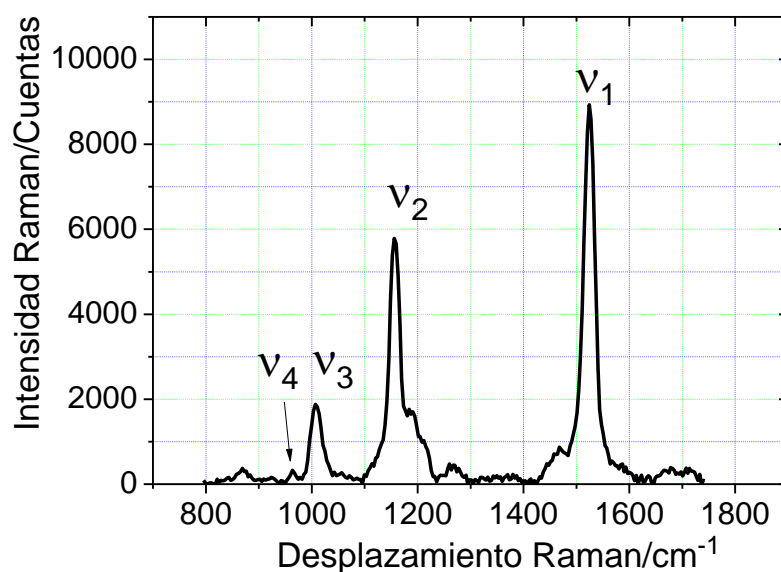
### *Mango*

El mango es un fruto rico en carotenoides, ya que según diversos estudios posee una cantidad de entre 1920-5500  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . La variedad cv. Keitt es la que presenta mayor contenido en polienos en general siendo el  $\beta$ -caroteno en su disposición todo *trans* el que se encuentra en mayor cantidad<sup>17-19</sup>.

Debido a estos altos contenidos y al poder de la técnica resonante, se adquirieron espectros de una rodaja de este fruto cortada con un espesor determinado (0.7 mm) con la finalidad

de estudiar los modos vibracionales resonantes en esta matriz ya que con esta anchura de muestra se alcanza un buen compromiso entre la señal y su atenuación.

Estos datos son de vital importancia debido a que, posteriormente nuestros estudios se centrarán en la evolución temporal del cociente de despolarización y para ello es necesario conocer las señales más significativas. En consecuencia, a modo ilustrativo en la Figura 3.2 se presenta el espectro obtenido a tiempo 0, es decir, nada más haber cortado la rodaja con micrótopo. En este punto la muestra aún conserva la mayor parte de su humedad inicial.



**Figura 3.2:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de mango con 0.7 mm de espesor obtenido a tiempo 0 horas.

Es fácil darse cuenta de que no existen variaciones significativas en comparación con el espectro de zanahoria antes mostrado a excepción de la intensidad y un pequeño desplazamiento en número de ondas que puede ser achacado a las diferencias en la matriz tal y como se explicará en el siguiente capítulo.

En la figura aparecen los cuatro modos vibracionales característicos que cabe esperar para el espectro del  $\beta$ -caroteno adquirido en condiciones de resonancia.

Los desplazamientos de las señales Raman a los que se hace referencia se muestran de forma esquemática en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2:** Asignaciones del espectro Raman Resonante de Rodaja de mango de 0.7 mm de espesor a t= 0 horas.

<b>Desplazamiento Raman e Intensidad / cm<sup>-1</sup></b>	<b>Asignación Vibracional</b>
963 w	$\omega_{op}$ (C=C-H) ( $\nu_4$ )
1006 m	$\rho_{ip}$ (CH <sub>3</sub> ) ( $\nu_3$ )
1156 m	$\nu_2$ (C-C) ( $\nu_2$ )
1524 s	$\nu_1$ (C=C) ( $\nu_1$ )

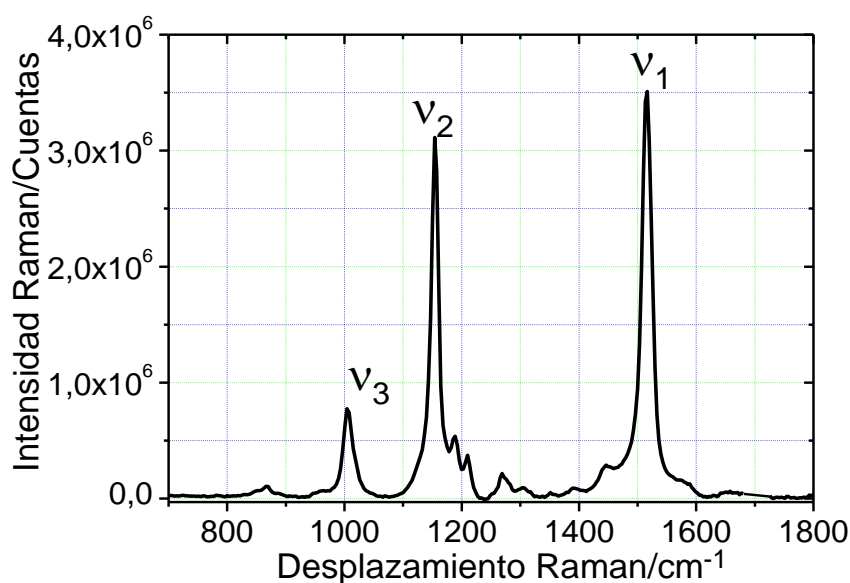
*Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\omega$ , flexión;  $\rho$ , balanceo; intensidades: w, suave.; s, fuerte; m, medio; contribuciones: op, fuera del plano, ip en el plano.*

Otro punto digno de mención, es el relativo a las bandas  $\nu_2$  y  $\nu_3$  ya que se continúan apreciando con claridad. La banda  $\nu_4$  por el contrario se observa, aunque con una menor intensidad en comparación con el resto de señales.

#### *Pastillas de $\beta$ -caroteno en KBr*

Con el propósito de realizar medidas experimentales comparables a todos los espectros adquiridos en tejidos biológicos y para poder llevar a cabo estudios en los que se tenga en cuenta la variación de la señal con la cantidad de carotenoide, es decir, con la concentración, se adquirió un espectro de una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno en una pastilla de KBr.

En la Figura 3.3 se presenta dicho espectro realizado con un alto número de acumulaciones con la finalidad de describirlo de la manera más nítida posible y con una relación señal-ruido óptima.



**Figura 3.3:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una pastilla de 0.1mg de patrón de  $\beta$ -Caroteno en 50 mg de KBr. 500 Adquisiciones de 10 segundos cada una a 60 mW de potencia.

A pesar de contar con una cantidad muy baja de carotenoide en la muestra, (0.1 mg) la señal de los modos resonantes es muy intensa con respecto al ruido.

Los modos vibracionales más significativos, así como los desplazamientos Raman a los que aparecen se muestran en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3:** Asignaciones del espectro Raman Resonante de una pastilla con 0.1 mg de  $\beta$ -caroteno patrón en 50 mg de KBr.

Desplazamiento Raman e Intensidad / $\text{cm}^{-1}$	Asignación Vibracional
1004 m	$\rho_{ip}(\text{CH}_3)$ ( $v_3$ )
1153 s	$v_2(\text{C-C})$ ( $v_2$ )
1516 s	$v_1(\text{C=C})$ ( $v_1$ )

*Vibraciones: v, tensión;  $\rho$ , balanceo. Intensidades: s, fuerte; m, medio; contribuciones: ip en el plano.*

De la figura mostrada se pueden mencionar algunos aspectos significativos, el primero de ellos y más destacable es la desaparición del modo vibracional  $v_4$ . Por otro lado, si se comparan los espectros Raman de las matrices biológicas ya presentadas con las expuestas en este punto, conviene mencionar que en éstos últimos, las señales se encuentran

ligeramente desplazadas hacia menores números de ondas unos pocos  $\text{cm}^{-1}$ . Este efecto no es nuevo ya que fue observado con anterioridad en muestras similares y está bien descrito en la bibliografía<sup>11</sup> aunque este hecho que se comentará más adelante.

### 3.1.2. *Lycopeno*

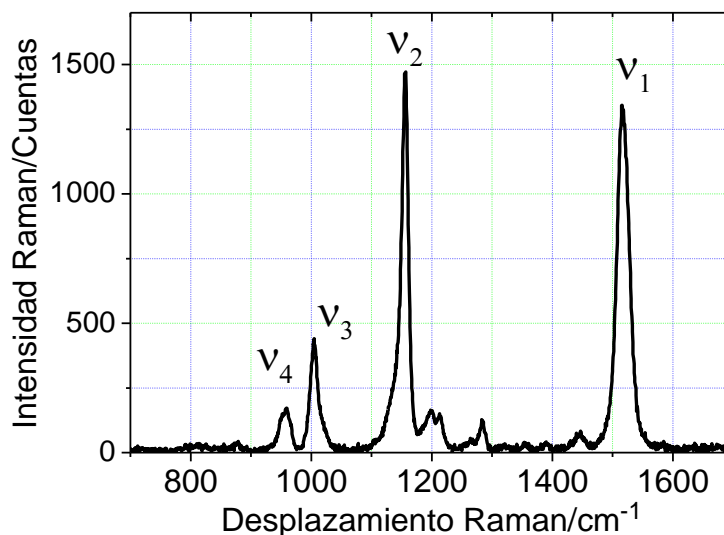
El licopeno es el carotenoide más efectivo a la hora de llevar a cabo la desactivación del oxígeno singlete, como así demuestran algunos estudios<sup>20</sup>, y al no poder ser sintetizado por el organismo su importancia en la dieta es elevada. Se trata de una molécula que presenta una conjugación efectiva de 13 enlaces, cuya estructura se puede ver en la Figura 2.7 de esta misma memoria. El alimento que lo contiene en mayor proporción es el gac<sup>21, 22</sup>, pero su consumo no está tan extendido como el del tomate, que es la segunda fuente de este pigmento. Según algunos autores, la forma molecular predominante en la que se encuentra presente en la mayoría de tejidos biológicos en la naturaleza es la de todo *trans* licopeno<sup>23, 24</sup>, llegando a alcanzar en frutos como el tomate valores de entre 80-97%<sup>25</sup>. Además, algunos grupos de investigación<sup>26-28</sup> han reportado cantidades de licopeno en tomates de 2.5-200 mg/100g.

En los estudios que se han llevado a cabo a lo largo de esta Tesis Doctoral, se ha realizado un seguimiento detallado del periodo de maduración con el fin de llegar a conclusiones acerca de la cinética del proceso y de las etapas del mismo. Por ello, más adelante se estudiará la señal en función del tiempo.

En la Figura 3.4 se puede observar el espectro proporcionado por el licopeno presente en extractos de tomates. Dichos extractos contienen un alto contenido en el mencionado carotenoide ya que han sido obtenidos con disolventes orgánicos, siendo en este tipo de solventes donde se solubiliza más rápidamente y de manera cuantitativa. Los disolventes más ampliamente utilizados son metanol, acetona, éter de petróleo, hexano, benceno y cloroformo<sup>29-33</sup>. Además, una de las ventajas más significativas de realizar las extracciones con este tipo de compuestos orgánicos está relacionada con la estabilidad de los extractos, sobre todo si se obtienen con mezclas de hexano/acetona y hexano/etanol<sup>23, 34</sup>.

El espectro mostrado, se corresponde con el de un extracto obtenido con hexano y será empleado a modo de guía ya que sus bandas son las mismas que las encontradas en patrones por otros investigadores<sup>35</sup> y tal y como se comentará más adelante se compone mayoritariamente de licopeno. El espectro que se presenta a continuación, al igual que los

anteriores, fue adquirido en condiciones de resonancia, aunque en este caso a 514.5 nm de longitud de onda tal y como se describe en el Capítulo 2.



**Figura 3.4:** Espectro Raman Resonante de un extracto de licopeno obtenido con excitación a 514.5 nm. Se han promediado 10 espectros de 15 segundos cada uno. Potencia de láser  $\leq 1$  mW.

En la Tabla 3.4 se pueden ver los modos vibracionales resonantes característicos para este tipo de extractos y sus asignaciones.

**Tabla 3.4:** Asignaciones para el espectro Raman Resonante de un extracto de licopeno.

Desplazamiento Raman e Intensidad / $\text{cm}^{-1}$	Asignación Vibracional
959 w	$\omega_{op}$ (C=C-H) ( $v_4$ )
1005 m	$\rho_{ip}$ ( $\text{CH}_3$ ) ( $v_3$ )
1157 s	$\nu_2$ (C-C) ( $v_2$ )
1516 s	$\nu_1$ (C=C) ( $v_1$ )

*Vibraciones:*  $\nu$ , tensión;  $\omega$ , flexión;  $\rho$ , balanceo. *Intensidades:* w, suave.; s, fuerte; m, medio; *contribuciones:* op, fuera del plano, ip, en el plano.

En la figura mostrada, al tratarse de un carotenoide diferente al estudiado en páginas anteriores (patrones), y al provenir de una muestra biológica (extracto de tomate) el modo  $\nu_4$  se distingue con claridad.

Respecto a las muestras de tomate que se van a comentar a continuación, se puede reseñar, tal y como se especificó en el capítulo anterior, que todos los espectros correspondientes a la evolución temporal de intensidades se adquirieron en configuración de retrodispersión a  $180^\circ$  (backscattering), por el contrario, aquellos en los que se hace un seguimiento del cociente de despolarización, fueron obtenidos en configuración a  $90^\circ$ .

Antes de estudiar la evolución temporal de las señales de las muestras de tomates, es necesario mencionar que, aunque en la bibliografía se refleja el aumento de concentración de este carotenoide a lo largo de la maduración del tomate con el consiguiente cambio de coloración<sup>36</sup>, y a pesar de que el licopeno se encuentre en mayor proporción con respecto a otros pigmentos presentes, como el  $\beta$ -caroteno y la luteína, siendo la contribución de ésta última despreciable<sup>8, 37</sup>, debido a la resolución espectral con la que se trabaja ( $4\text{cm}^{-1}$ ) todas las medidas asignadas tanto de intensidad como de evolución temporal de las bandas Raman en este tipo de frutos, estarán atribuidas a la combinación de ambos polienos. Por el contrario, en el caso de los extractos se puede afirmar que el componente mayoritario es el licopeno como se discutirá en el Capítulo 5.

En esta parte de la memoria se estudiaron tomates cherry de varios colores y tomates Rambo con el fin de observar tanto la evolución temporal de la banda Raman más intensa como la variación del cociente de despolarización.

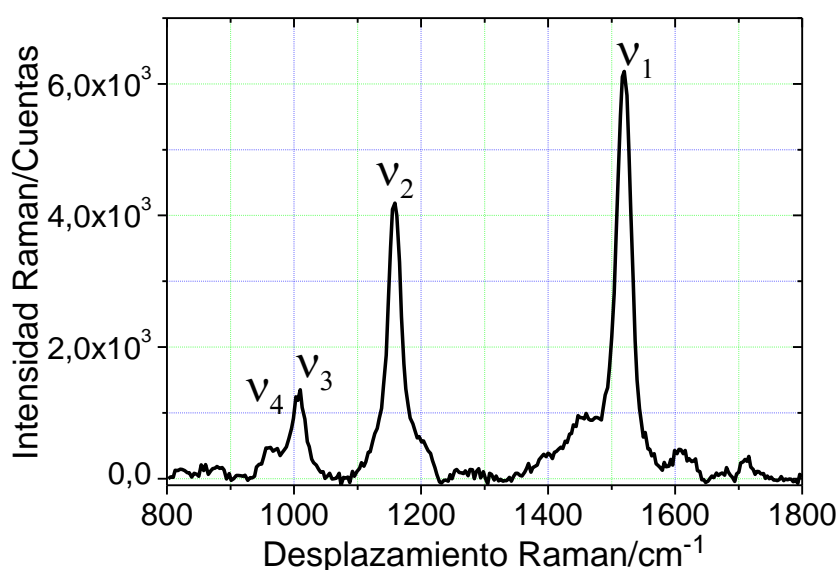
Los tomates fueron adquiridos en un estado de maduración inicial y se obtuvieron sus espectros Raman. En dichos espectros, se pueden observar las señales características de los polienos. Debido al poder de penetración del láser (1 mm), la mayor parte de la información que se presenta tiene que ver con la parte superficial del fruto, es decir, la parte de la piel, que es donde se encuentra la mayor cantidad de carotenoides, llegando a valores 5 veces superiores a los encontrados en la pulpa<sup>38, 39</sup>.

Para el desarrollo de los análisis que aquí se exponen, se adquirieron espectros a intervalos conocidos de tiempo. Como en esta parte de la memoria únicamente se hace el estudio vibracional, para que los resultados sean comparables todos los espectros que se adjuntan fueron obtenidos dentro de las primeras 48 horas transcurridas una vez realizada la primera medida ( $t = 0$  h). Dicho de otra manera, en el conjunto de espectros presentados los tomates se encuentran en las etapas iniciales de maduración. Además, cabe recordar en este punto que, tal y como se especifica en el Capítulo 2 los espectros en los que se estudia la evolución temporal de señal han sido adquiridos con una fibra óptica acoplada a una sonda

en la disposición geométrica que permite la recogida de la señal en retrodispersión, es decir a  $180^\circ$ .

#### *Tomate Rambo*

El primer tomate objeto de estudio fue de la variedad Rambo. Para el seguimiento de su maduración postcosecha se tomaron espectros a tiempos definidos que se detallarán más adelante, pero en este caso, tal y como se ha comentado, en la Figura 3.5 se presenta un espectro Raman a  $t = 48$  horas.



**Figura 3.5:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión con sonda de tomate Rambo a  $t = 48$  h.

En la Tabla 3.5 se presentan las asignaciones vibracionales extraídas de la Figura 3.5 para los modos más significativos, es decir, los resonantes con la excitación del láser.

Como ya se ha explicado, es muy interesante darse cuenta de la gran intensidad del espectro gracias a las condiciones de resonancia, donde sólo se aprecian con claridad los modos acoplados energéticamente a las transiciones electrónicas.

Al tratarse de muestras biológicas y no de patrones cristalinos como los presentados de  $\beta$ -caroteno, el modo vibracional  $v_4$  se puede distinguir con claridad.

**Tabla 3.5:** Asignaciones del espectro Raman Resonante de un tomate Rambo a  $t = 48$  h.

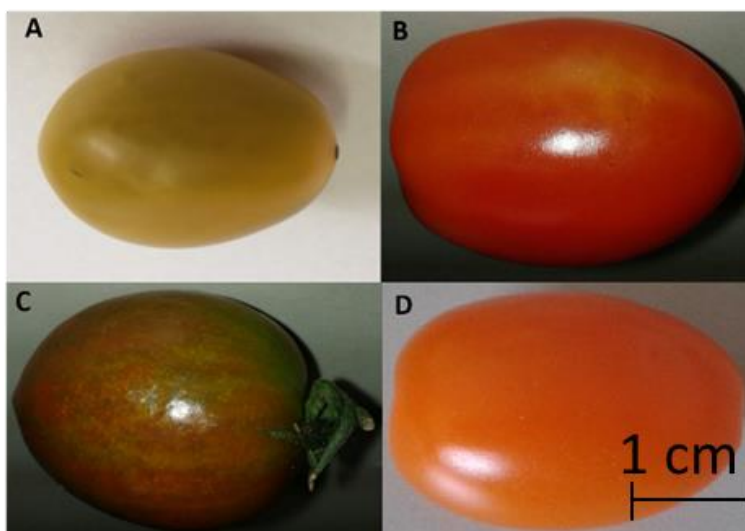
Desplazamiento Raman e Intensidad / $\text{cm}^{-1}$	Asignación Vibracional
966 w	$\omega_{op}$ (C=C-H) ( $\nu_4$ )
1013 m	$\rho_{ip}$ ( $\text{CH}_3$ ) ( $\nu_3$ )
1162 s	$\nu_2$ (C-C) ( $\nu_2$ )
1520 s	$\nu_1$ (C=C) ( $\nu_1$ )

*Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\omega$ , flexión;  $\rho$ , balanceo. Intensidades: w, suave.; s, fuerte; m, medio; contribuciones: op, fuera del plano, ip, en el plano.*

De los resultados se desprende la existencia de una gran similitud en lo que a bandas Raman se refiere con el resto de tomates que serán presentados a continuación.

#### *Tomates Cherry*

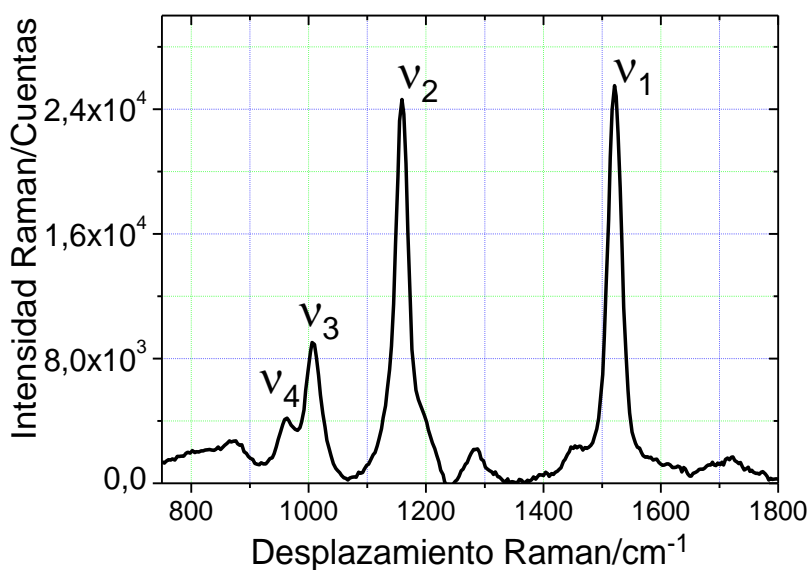
Además de las muestras ya mencionadas, se llevaron a cabo análisis espectroscópicos en tomates cherry de distintos colores y variedades. Dichos tomates fueron etiquetados con los nombres de amarillo ovalado, naranja ovalado, verde ovalado y rojo ovalado. En la Figura 3.6 se presenta una fotografía de las distintas muestras bajo investigación.



**Figura 3.6:** Tomates cherry objeto de estudio. **A:** Amarillo ovalado. **B:** Rojo ovalado. **C:** Verde ovalado. **D:** Naranja ovalado.

*Tomate cherry Amarillo Ovalado*

En la Figura 3.7 se presenta un espectro adquirido para el tomate cherry amarillo ovalado con las condiciones citadas en el párrafo anterior, en dicho espectro se aprecian las cuatro bandas fundamentales mencionadas a lo largo del presente capítulo. Nótese que el número de cuentas es ligeramente superior si se compara con el Rambo. Además, las bandas  $\nu_1$  y  $\nu_2$  tienen una intensidad muy similar.



**Figura 3.7:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión de un tomate amarillo ovalado a  $t = 48$  h.

En la Tabla 3.6 se presentan las asignaciones vibracionales propias de los espectros adquiridos para este tipo de tomates. Es interesante observar cómo permanecen las bandas más significativas que se vienen repitiendo en la mayor parte de los espectros realizados hasta el momento (excluyendo a aquellos en las que no aparecía la señal del modo vibracional  $\nu_4$ ).

**Tabla 3.6:** Asignaciones del espectro Raman Resonante de un tomate cherry amarillo ovalado a  $t = 48$  h.

<b>Desplazamiento Raman e Intensidad / <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Asignación Vibracional</b>
963 w	$\omega_{op}$ (C=C-H) ( $\nu_4$ )
1006 m	$\rho_{ip}$ (CH <sub>3</sub> )( $\nu_3$ )
1159 s	$\nu_2$ (C-C) ( $\nu_2$ )
1521 s	$\nu_1$ (C=C) ( $\nu_1$ )

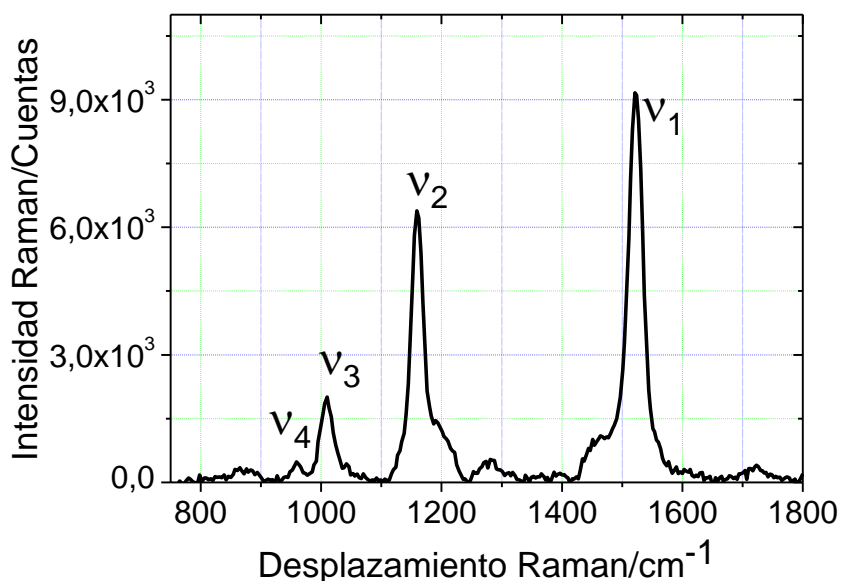
*Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\omega$ , flexión;  $\rho$ , balanceo. Intensidades: w, suave.; s, fuerte; m, medio; op, fuera del plano, ip, en el plano.*

Como ya se ha dejado entrever, las pequeñas variaciones en el desplazamiento encontradas en los espectros presentados a lo largo de este capítulo, están relacionadas con la matriz en la que se encuentra la sustancia, el polieno que se encuentra en mayor cantidad y las condiciones experimentales. Estos hechos observados en los resultados experimentales serán discutidos en el Capítulo 4.

#### *Rojo Ovalado*

Tal y como se ha especificado, el tomate rojo ovalado fue otra de las variedades tenida en cuenta para la realización de su seguimiento temporal, cuyo espectro fue adquirido en las mismas condiciones que el mostrado en la Figura 3.7 donde destacan los mismos modos vibracionales pero, en este caso, con una intensidad significativamente menor en número de cuentas; lo que hace pensar, que su contenido en carotenoides inicial es menor a ese tiempo.

Las cuatro señales fundamentales se siguen observando con claridad si se compara con el resto de espectros obtenidos a lo largo de este capítulo. A pesar de tratarse de distintas muestras, el efecto resonante continúa estando muy presente en este tipo de frutos y es por ello por lo que siguen apareciendo señales tan claras en los espectros.



**Figura 3.8:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión de un tomate rojo ovalado a  $t = 48$  h.

En la Tabla 3.7 se indican los modos vibracionales típicos en este tipo de frutos, así como sus desplazamientos Raman en  $\text{cm}^{-1}$  tal y como se ha hecho hasta ahora con las otras muestras estudiadas.

**Tabla 3.7:** Asignaciones del espectro Raman Resonante de tomate cherry rojo ovalado a  $t = 48$  h.

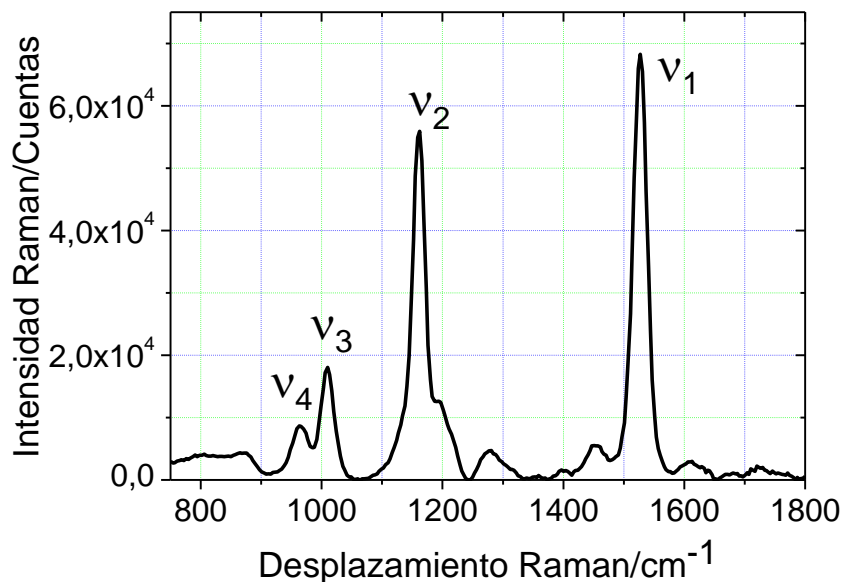
Desplazamiento Raman e Intensidad / $\text{cm}^{-1}$	Asignación Vibracional
966 w	$\omega_{op}$ (C=C-H) ( $v_4$ )
1013 m	$\rho_{ip}$ ( $\text{CH}_3$ ) ( $v_3$ )
1162 s	$v_2$ (C-C) ( $v_2$ )
1521 s	$v_1$ (C=C) ( $v_1$ )

*Vibraciones: v, tensión;  $\omega$ , flexión,  $\rho$ , balanceo. Intensidades: w, suave.; s, fuerte; m, medio; contribuciones: op, fuera del plano, ip, en el plano.*

#### Verde Ovalado

El tomate verde ovalado fue otra variedad que se consideró para realizar un estudio completo. Como se ha ido mostrando hasta ahora, en la Figura 3.9 se puede ver el espectro

Raman Resonante adquirido en las mismas condiciones que para los otros tomates cherry y Rambo anteriores.



**Figura 3.9:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión de tomate verde ovalado a  $t = 48$  h.

En la Tabla 3.8 aparece la asignación de bandas perteneciente a este tipo de muestras, muy similar al resto de las descritas hasta este punto.

**Tabla 3.8:** Asignaciones para el espectro Raman Resonante de tomate cherry verde ovalado a  $t = 48$  h

Desplazamiento Raman e Intensidad / $\text{cm}^{-1}$	Asignación Vibracional
963 w	$\omega_{op}(\text{C}=\text{C}-\text{H}) (v_4)$
1010 m	$\rho_{ip}(\text{CH}_3) (v_3)$
1162 s	$v_2(\text{C}-\text{C}) (v_2)$
1527 s	$v_1(\text{C}=\text{C}) (v_1)$

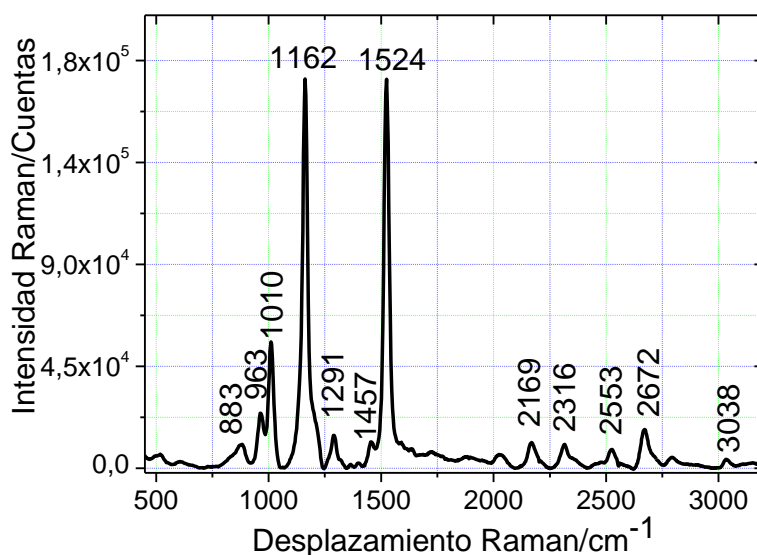
*Vibraciones: v, tensión;  $\omega$ , flexión;  $\rho$ , balanceo. Intensidades: w, suave.; s, fuerte; m, medio; contribuciones: op, fuera del plano, ip, en el plano.*

Más adelante, se comentará la evolución temporal sufrida por este tipo de muestras junto a las demás para tener una idea del proceso de maduración al que se enfrentan con el paso del tiempo.

*Naranja Ovalado*

El último fruto objeto de evaluación fue el etiquetado como Naranja Ovalado, se expone al final porque en los espectros pertenecientes a este tipo de tomates se observan de una manera clara, tanto ciertas bandas de combinación como algunos sobretonos. El espectro que se adjunta y que se puede ver en la Figura 3.10 presenta en un intervalo de desplazamientos Raman desde  $480\text{ cm}^{-1}$  hasta  $3250\text{ cm}^{-1}$ .

En la figura se pueden hacer dos observaciones fundamentales, la primera de ellas es la claridad con la que se aprecian los sobretonos y bandas de combinación, la segunda, tiene que ver con la gran intensidad de los modos más característicos ya que se aprecian con gran claridad y resolución.



**Figura 3.10:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión para un tomate naranja ovalado a  $t = 0\text{ h}$ .

En la Tabla 3.9 se pueden observar los diversos modos vibracionales encontrados para el espectro obtenidos en este tipo de muestras. Los modos más significativos han sido asignados con los estudios de las referencias<sup>10,40</sup>.

Como ya se ha comentado, el poder de penetración del láser es de hasta  $1\text{ mm}$  y por ello la mayoría de señal recibida pertenece únicamente a la zona de la piel aunque existen algunos estudios realizados en otro tipo de tejidos biológicos<sup>41-43</sup> en los que se han logrado penetraciones de  $0,9$ ,  $8,7$ , y hasta  $16\text{ mm}$ .

**Tabla 3.9:** Asignaciones del espectro Raman Resonante de tomate cherry naranja ovalado a  $t = 0$  h.

<b>Desplazamiento Raman e Intensidad / <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Asignación Vibracional</b>
883 w	$\nu$ (C-C)
963 w	$\omega_{\text{op}}$ (C=C-H) ( $\nu_4$ )
1010 m	$\rho_{\text{ip}}$ (CH <sub>3</sub> ) ( $\nu_3$ )
1162 s	$\nu_2$ (C-C) ( $\nu_2$ )
1291 w	$\delta_{\text{ip}}$ (=C-H) $\tau$ (CH <sub>2</sub> )
1457 w	$\delta$ (CH <sub>3</sub> )
1524 s	$\nu_1$ (C=C) ( $\nu_1$ )
2169 w	$\nu_2 + \nu_3$
2316 w	$2 \nu_2$
2533 w	$\nu_1 + \nu_3$
2672 w	$\nu_1 + \nu_2$
3038 w	$2 \nu_1$

*Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\omega$  flexión;  $\rho$ ; balanceo;  $\delta$ , deformación. Intensidades: w, débil; s, fuerte; m, medio; contribuciones: op, fuera del plano ip, en el plano.*

Asimismo, según un estudio ya mencionado<sup>37</sup> la estabilidad del licopeno, a los cambios de temperatura es bastante alta siempre que se encuentre en la matriz biológica, siendo estable también a la energía producida por la fuente de excitación (láser)<sup>44, 45</sup>.

El resto de modos vibracionales encontrados se identifican como bandas de combinación o como sobretonos y sus asignaciones han sido realizadas en base los resultados presentados por otros grupos de investigación<sup>46</sup>. Además, tal y como predice la teoría, debido a la escasa población existente a temperaturas moderadas en los niveles vibracionales diferentes al fundamental se pueden esperar señales menos intensas. Este hecho queda confirmado en la figura presentada que ha sido obtenida experimentalmente a temperatura ambiente.

### **3.2. Distribución Espacial de $\beta$ -caroteno y configuración molecular en rodajas de zanahoria mediante Espectroscopia de Transmisión Raman Resonante**

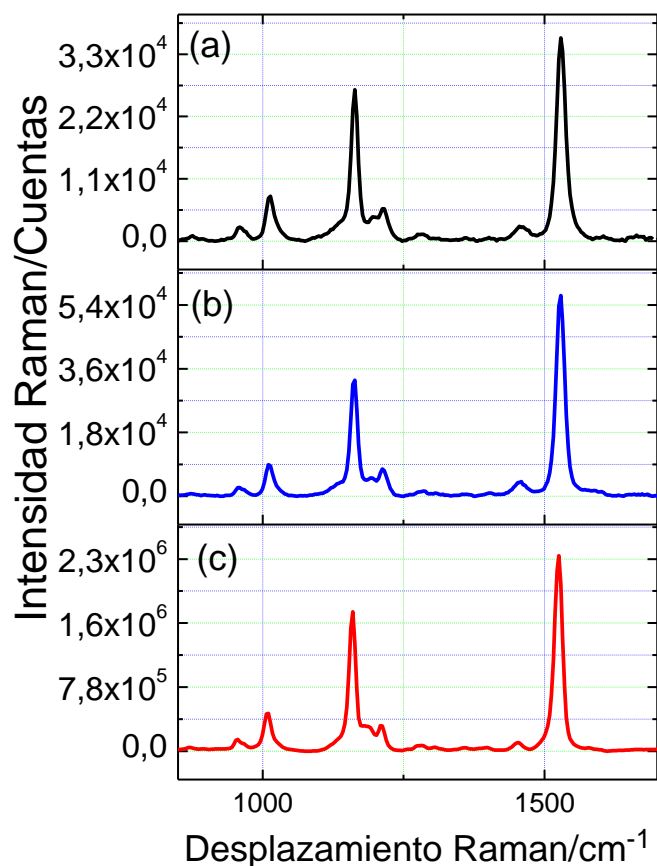
El análisis de la distribución espacial y de la homogeneidad del  $\beta$ -caroteno en zanahorias es fundamental para comprender la regulación de dicho pigmento en los frutos indicados. A pesar de que el contenido en carotenoides en distintos tipos de zanahoria es bien conocido, no existen demasiadas investigaciones que hagan referencia a cómo está distribuido espacialmente, por ello, en este capítulo se hará especial hincapié en dicho estudio.

Gracias a estos análisis se podrán demostrar las grandes posibilidades inherentes a la técnica de transmisión Raman resonante mediante un mapeo de la distribución de  $\beta$ -caroteno a lo largo de las rodajas de zanahoria en base a la intensidad de señal. En primer lugar, se adquirieron los espectros simples tanto de rodajas de zanahoria como de patrón que ya han sido presentados en este mismo capítulo.

Más tarde, se obtuvieron diversos espectros en función de la distancia al centro de rodajas de zanahoria de  $\sim 11$  cm de radio y  $500 \mu\text{m}$  de espesor para posteriormente realizar el mapa. En la Figura 3.11 se pueden apreciar algunos de los espectros obtenidos a las distancias del centro que se indican en el pie de figura.

Si se mira con detenimiento la intensidad Raman del pico más prominente, (el correspondiente al modo vibracional  $\nu_1$ ) se puede apreciar cómo ésta va aumentando con la distancia al centro de la zanahoria, en otras palabras, en la parte central, el espectro obtenido se corresponde con el de 0 mm y por lo tanto con el de menor intensidad.

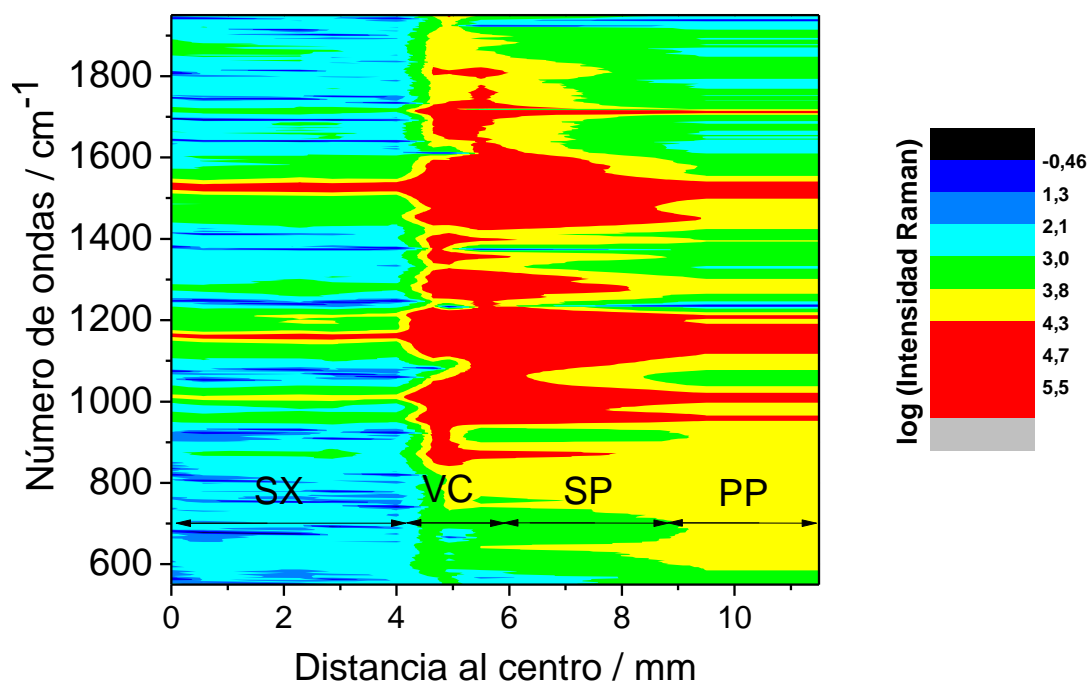
A medida que la distancia al centro aumenta, la señal se incrementa progresivamente, hasta llegar a una zona (la que se corresponde con los 4.65 mm) en la que la se hace máxima llegando a ser el número de cuentas, hasta dos órdenes de magnitud superior al de la distancia inicial.



**Figura 3.11:** Espectros adquiridos para una rodaja de zanahoria a radio (distancia al centro) **a)** 0mm (negro) **b)** 4 mm (azul) y **c)** 4.65 mm (rojo).

Estos datos, junto con otros obtenidos a distintos radios, se trataron con el objetivo de mostrar un mapa de distribución de señales de tres variables que se puede observar en la Figura 3.12.

La primera variable, representada en el eje de abscisas, es la distancia al centro de las rodajas de zanahoria, consideradas circulares (expresado en mm). En el eje de ordenadas aparece el número de ondas al que se encuentra cada señal Raman tanto de los espectros antes mostrados en la Figura 3.11 como del resto de los que se obtuvieron (expresado en cm<sup>-1</sup>). Finalmente, la tercera variable simboliza la intensidad de la señal Raman que es directamente proporcional a la concentración de  $\beta$ -caroteno y por lo tanto a la cantidad de dicho pigmento. La intensidad por tanto, queda representada mediante una escala de colores, siendo el rojo el que simboliza los mayores valores y el azulado el que se corresponde con los valores de menor intensidad.

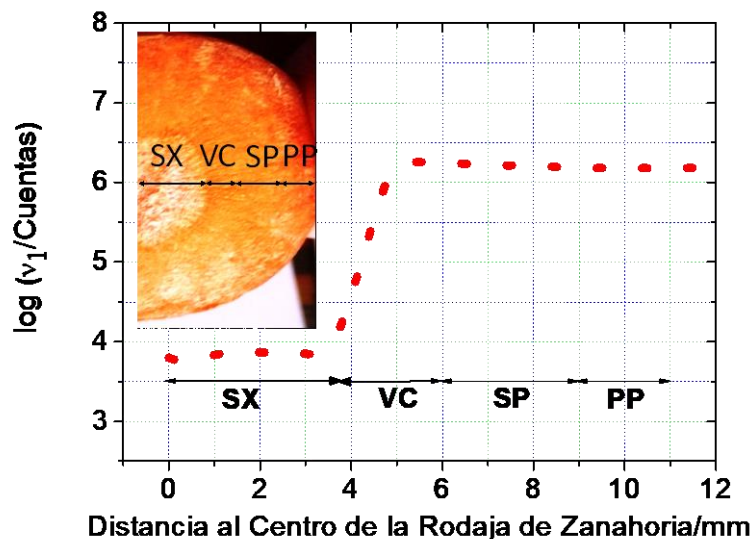


**Figura 3.12:** Mapa de contorno obtenido por Espectroscopia de Transmisión Raman Resonante. La acumulación de  $\beta$ -caroteno se da predominantemente en el floema secundario y en los tejidos vasculares de las rodajas de zanahoria. **SX:** xilema secundario; **VC:** Cambium Vascular; **SP:** Floema secundario; **PP:** Peridermis con periciclo.

La primera característica que se puede extraer con claridad de la figura mostrada tiene que ver con la zona cercana al centro de la rodaja; esta región presenta una baja concentración en carotenoides que se hace patente con la coloración azul, al seguir avanzando en la dirección del eje de abscisas la concentración aumenta progresivamente hasta alcanzar el valor máximo hacia los 4-6 milímetros de radio, hecho que se corresponde con la coloración rojiza en el mapa, estabilizándose finalmente hacia la región más alejada del centro de la rodaja. Por tanto, en esta figura se aprecia de forma nítida la distribución heterogénea del  $\beta$ -caroteno.

Para una mayor claridad, en la Figura 3.13 se representa un corte horizontal del mapa de la figura anterior, en concreto a la altura del modo vibracional  $\nu_1$ . En dicha figura se puede constatar la evolución de intensidad Raman de esta señal asociada al radio. En la zona central de la zanahoria, se observa un mínimo con una suave transición a través de la región intermedia de la rodaja (3-6 mm) para terminar en una meseta prácticamente constante. Esta zona, representa los valores máximos de contenido en  $\beta$ -caroteno y

coincide con los valores más altos de distancia al centro. Este hecho es consistente con los resultados obtenidos anteriormente.



**Figura 3.13:** Logaritmo de la Intensidad de la banda  $\nu_1$  frente al radio. Para una mayor ilustración, en el interior de la gráfica se muestra una fotografía. **SX:** xilema secundario; **VC:** Cambium Vascular; **SP:** Floema secundario; **PP:** Peridermis con periciclo.

Tal y como se puede observar, para una mejor descripción se ha empleado una representación semilogarítmica. Las medidas se realizaron en un régimen quasi-continuo con pasos de 300  $\mu\text{m}$  para que los datos fueran representativos. A modo aclaratorio, de forma paralela al eje de abcisas se indican las distintas zonas de las rodajas de zanahoria.

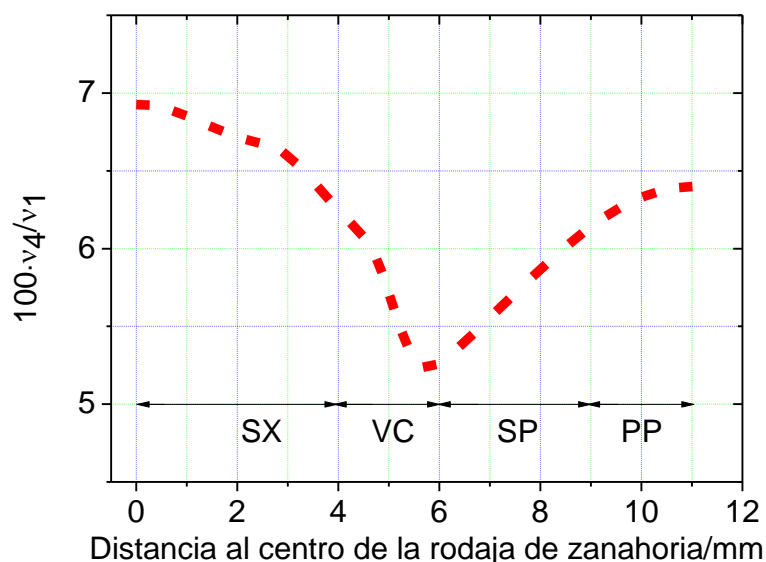
Una vez conocida la distribución espacial de  $\beta$ -caroteno en las rodajas de zanahoria estudiadas, el siguiente paso tiene que ver con la configuración molecular de dicho pigmento, es decir, en qué conformación se puede presentar el carotenoide dentro de la matriz biológica de la que forma parte. Para ello, es importante tener en cuenta el modo vibracional  $\nu_4$  que como ya se ha mencionado es un indicador de las desviaciones de la configuración plana.

Para tal fin, en la Figura 3.14 se muestra una representación del cociente del pico  $\nu_4/\nu_1$  multiplicado por 100 a lo largo de las distintas zonas pertenecientes a la zanahoria anteriormente citadas. Llama la atención la variación, que disminuye hasta un mínimo y posteriormente aumenta de nuevo. La línea punteada representa la tendencia que siguieron

los datos experimentales obtenidos en los diferentes espectros estudiados en función del radio.

Es preciso destacar que la región del mínimo, se corresponde con aquella donde la intensidad era máxima, siendo este dato muy significativo ya que, en ese punto, la concentración de  $\beta$ -caroteno es muy significativa; esta zona, tal y como se indicó antes, pertenece al cambium vascular, que se encuentra a una distancia de entre 3.8 y 6 mm del centro de las rodajas de zanahoria.

En el Capítulo 4, se discutirán los datos y variaciones obtenidos con más detalle, entendiendo así, por qué los datos se comportan de este modo.



**Figura 3.14:** Cociente de  $100 \cdot v_4/v_1$  en función de la distancia al centro de las rodajas de zanahoria, las medidas son en régimen quasi-contínuo, cada  $300\mu\text{m}$  como en el caso anterior. **SX:** xilema secundario; **VC:** Cambium Vascular; **SP:** Floema secundario; **PP:** Peridermis con periciclo.

### 3.3. Polarización de las bandas Raman

En los siguientes apartados se detallan las medidas obtenidas mediante la técnica desarrollada de Transmisión Raman Resonante con Luz Linealmente Polarizada, capaz de estimar el cociente de despolarización en distintas bandas pertenecientes a varios tipos de muestras, tanto biológicas como de patrones. Fundamentalmente, esta propiedad óptica ha sido medida en función del espesor en rodajas de zanahoria, a concentración variable en

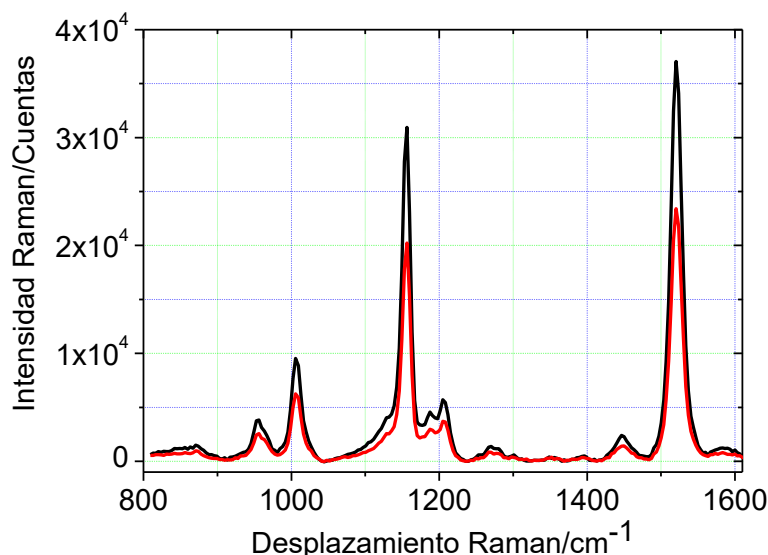
muestras de patrones y en función de tiempo de vida post-cosecha a grosor constante para rodajas de mango a  $180^\circ$  y para tomates a  $90^\circ$  (para más detalles véase Capítulo 2).

### 3.3.1. Polarización a espesor variable a $180^\circ$ en zanahoria

Antes de realizar las medidas relacionadas con la polarización, es necesario desarrollar una hipótesis de partida, que se tendrá en cuenta al objeto de racionalizar los resultados obtenidos. Dicha suposición está relacionada con el cociente de despolarización observado en matrices biológicas. Este parámetro no sólo depende de la simetría molecular, sino que además guarda una fuerte vinculación con el espesor óptico del tejido. Dicho espesor óptico puede sufrir variaciones según el grosor de la muestra de igual manera que puede experimentar cambios durante la vida post-cosecha y consecuentemente se encuentra relacionado con el grado de maduración.

Tal y como se indica en el Capítulo 2 las medidas realizadas se desarrollaron con los polarizadores en posición paralela y perpendicular para rodajas de zanahoria a espesores variables en el intervalo de 0.4 y 0.9 mm.

En la Figura 3.15 se presentan los espectros de transmisión Raman Resonante tanto para la configuración paralela como para la perpendicular de una rodaja de zanahoria.



**Figura 3.15:** Espectro de transmisión Raman Resonante de una rodaja de zanahoria de 0.4 mm de espesor. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ . Rojo: Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$ , donde  $\hat{\epsilon}_i$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es

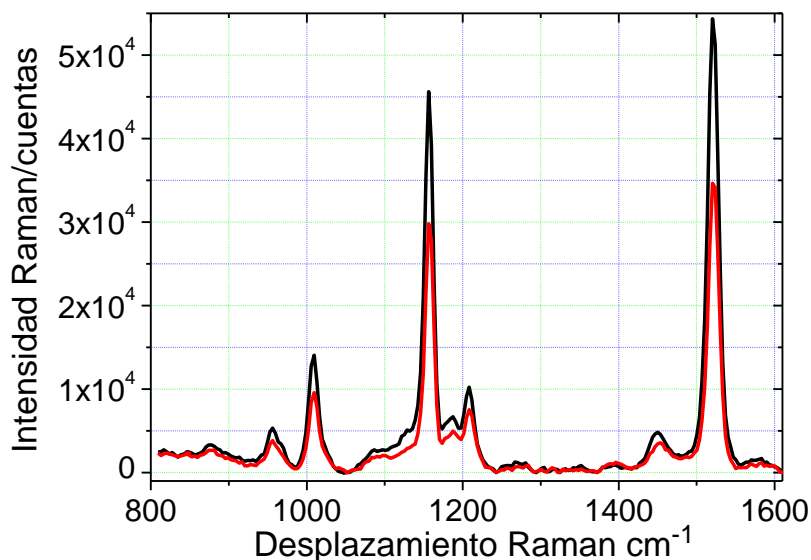
$$0.63.$$

Apréciase una vez más la aparición de las cuatro bandas Raman típicas mencionadas en apartados anteriores para este tipo de experimentos. En la figura mostrada el grosor fue de 0.4 mm y el cociente de despolarización fue de 0.63 para la banda  $\nu_1$ .

En la Figura 3.16 se exponen los espectros de Transmisión Raman Resonante obtenidos con las mismas características experimentales que en la figura anterior, aunque en este caso, la muestra se corresponde con una rodaja de 0.5 mm de espesor cuyo cociente de despolarización encontrado para la banda  $\nu_1$  fue de 0.63.

Al haber poca diferencia de anchura, también la hay el número de cuentas registrado y en el cociente de despolarización, que únicamente varía en una centésima, por lo que puede afirmarse que se trata de resultados muy similares.

Estos espectros, al igual que los de la figura anterior, se adjuntan a modo ilustrativo, con el único objetivo de comprender la manera en la que han sido calculados los cocientes de despolarización y en qué condiciones. En la figura, llama la atención la coincidencia del desplazamiento de las bandas Raman, este hecho es clave ya que permite calcular directamente el parámetro objeto de estudio.

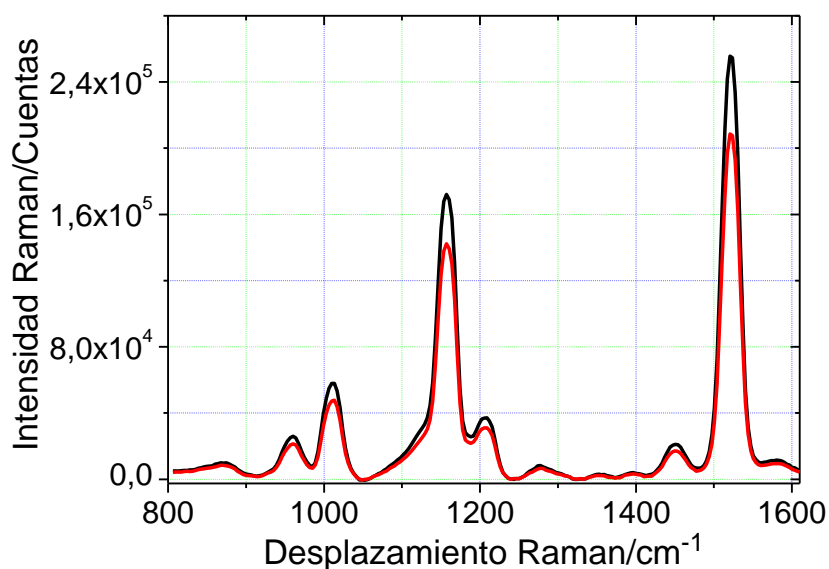


**Figura 3.16:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de zanahoria de 0.5 mm de espesor. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ . Rojo: Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$ , donde  $\hat{\epsilon}_i$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.64.

Para poder observar diferencias significativas con respecto a los valores del cociente de despolarización presentados anteriormente, (que eran muy similares entre sí) en la Figura 3.17 se muestra el espectro adquirido en paralelo y en perpendicular para una rodaja de zanahoria de 0.9 mm de anchura.

La característica más destacable de esta figura en comparación con las anteriores, está relacionada con el aumento del número de cuentas; este hecho se encuentra en consonancia con los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación<sup>11</sup> ya que en el citado estudio se analizaron algunas muestras mediante Transmisión Raman Resonante a distintos espesores obteniéndose un máximo de intensidad correspondiente a anchuras de rodaja cercanas a 1 cm.

Por último, es necesario destacar la gran variación que ha sufrido el cociente de despolarización, ya que en este caso, alcanza valores de 0.82 debido a que el grosor de la muestra es significativamente superior al de los casos anteriores y como ya se ha explicado, este parámetro cuenta con una fuerte dependencia de la densidad óptica.



**Figura 3.17:** Espectro de transmisión Raman resonante de una rodaja de zanahoria de 0.9 mm de espesor. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ . Rojo: Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$ , donde  $\hat{\epsilon}$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.82.

En la Tabla 3.10 se presentan los valores de  $\Gamma$  obtenidos a lo largo de estos estudios referidos a cada espesor, tanto para el modo vibracional  $\nu_1$  como para el  $\nu_2$ .

**Tabla 3.10:** Valores obtenidos para el cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) a distintos espesores para los modos vibracionales  $\nu_1$  y  $\nu_2$ .

Espesor /cm	$\Gamma (\nu_1)$	$\Gamma (\nu_2)$
0.4	$0.63 \pm 0.03$	$0.65 \pm 0.02$
0.5	$0.64 \pm 0.03$	$0.67 \pm 0.03$
0.6	$0.68 \pm 0.02$	$0.70 \pm 0.02$
0.7	$0.72 \pm 0.03$	$0.74 \pm 0.03$
0.8	$0.77 \pm 0.02$	$0.77 \pm 0.02$
0.9	$0.82 \pm 0.04$	$0.83 \pm 0.06$

A pesar de que estos resultados serán discutidos en el siguiente capítulo, se puede advertir cómo el cociente va incrementando su valor según lo hace el espesor y por lo tanto a medida que aumenta la densidad óptica, hecho, que según lo expuesto inicialmente era esperable ya que estos parámetros están íntimamente relacionados.

### 3.3.2. Variación del cociente de despolarización en muestras con espesor fijo a 180°

En el caso anterior se ha variado la densidad óptica cambiando el espesor de la muestra. A continuación, se quiere seguir estudiando la alteración de cociente de despolarización pero dicha densidad se modificará mediante otras metodologías.

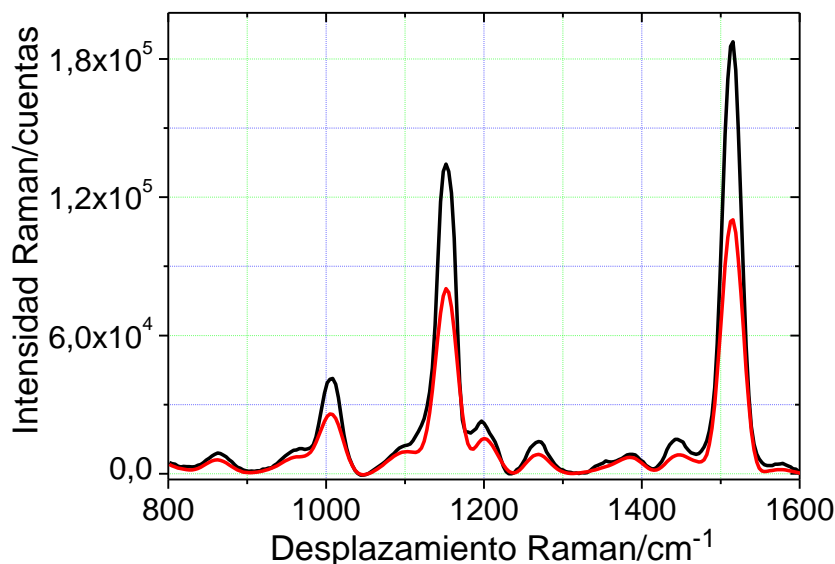
La primera forma en la que se alteró, fue a través de un espesor constante de muestra, cuya cantidad en carotenoide varía progresivamente. La manera de proceder en estos experimentos, por tanto, se relaciona con el empleo de patrones a distintas concentraciones; de este modo, aumenta progresivamente el número de moléculas de polieno haciéndolo también la densidad óptica del medio.

La segunda forma en la que va a variar dicha densidad tiene que ver con la evolución temporal de una rodaja de mango cortada y expuesta al aire. Cuando los procesos de oxidación de carotenoides y/o pérdida de humedad tengan lugar, se producirán cambios a nivel molecular que afecten al parámetro bajo investigación.

En conclusión, se realizarán dos análisis diferentes, con pastillas a concentraciones variables y con rodajas de mango a espesor constante, pero teniendo en cuenta su evolución temporal.

3.3.2.1. *Variación del cociente de despolarización en pastillas de patrón de  $\beta$ -caroteno a diferentes concentraciones*

Como se ha comentado, se llevaron a cabo estudios en pastillas con matriz de KBr cuyo grosor fue mantenido a lo largo de todos los experimentos (0.2 mm), variando los mg de  $\beta$ -caroteno que se añaden y midiéndose el cociente de despolarización. A modo de ejemplo, en la Figura 3.18 se presenta el espectro correspondiente a una concentración de  $8,12 \cdot 10^{-4}$  mg/mm<sup>3</sup> de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 3.18:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno en KBr de concentración  $8,12 \cdot 10^{-4}$  mg/mm<sup>3</sup>. **Negro:** Configuración paralela, es decir, configuración  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ . **Rojo:** Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$ , donde  $\hat{\epsilon}$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda v1 es 0.59.

Adicionalmente, los valores encontrados para todas las medidas realizadas a las diferentes concentraciones se presentan en la Tabla 3.11.

Una de las principales observaciones que se puede hacer en este punto, es la referente a los errores experimentales.

**Tabla 3.11:** Variación del cociente de despolarización  $\Gamma$  con la concentración de  $\beta$ -caroteno.

Concentración /( $\text{mg}\beta$ - caroteno/ $\text{mm}^3\text{KBr}$ )	$\Gamma$ ( $\nu_1$ )
$1.62 \cdot 10^{-2}$	$0.79 \pm 0.04$
$8.12 \cdot 10^{-3}$	$0.66 \pm 0.01$
$8.12 \cdot 10^{-4}$	$0.59 \pm 0.01$
$8.12 \cdot 10^{-5}$	$0.58 \pm 0.01$

Por regla general, son considerablemente menores si se comparan con los expuestos en las muestras de zanahoria. Esto se debe al tipo de matriz en la que se encuentra el analito. En este caso, la matriz pertenece a una sal en estado sólido y no a una de tipo biológica teniendo por ello, una mayor estabilidad con la consecuente disminución del error.

Como se puede apreciar en la tabla, dando sólo unas grandes pinceladas, el cociente de despolarización varía con la densidad óptica de la misma manera que lo hacía en las rodajas de zanahoria, es decir, dicha variable aumenta según lo hace la concentración. Por lo tanto, lo observado hasta el momento es consistente con lo que cabía esperar antes de llevar a cabo las medidas experimentales.

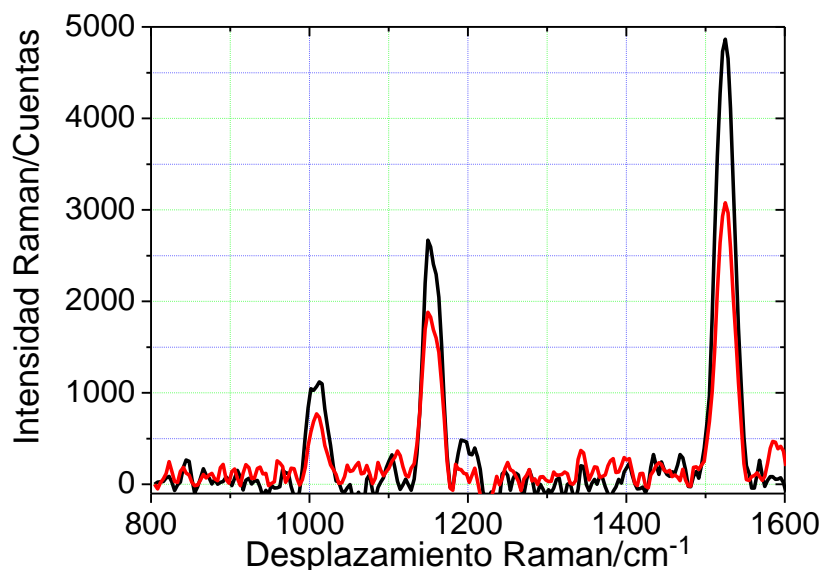
### 3.3.2.2. Variación del cociente de despolarización en rodajas de mango con el tiempo

En esta parte del capítulo, se quiere estudiar la variación del cociente de despolarización con la evolución temporal de una rodaja de mango a espesor constante (0.7 mm). De esta manera, se podrán achacar los cambios en  $\Gamma$  a procesos tanto físicos (pérdida de humedad) como químicos (posibles oxidaciones) que sucedan en la matriz biológica que se desea estudiar.

En la Figura 3.19 se pueden advertir dos espectros superpuestos que permiten calcular el cociente de despolarización para el modo vibracional  $\nu_1$  pertenecientes a una rodaja de mango de 0.7 mm de espesor a un tiempo de 19 horas después de haber sido cortado.

Una de las características más reseñables es que, tal y como se aprecia en la figura, la intensidad de las señales es considerablemente inferior en comparación con en el caso de la

zanahoria, aunque es suficiente para poder evaluar el cociente de despolarización, que para la banda  $\nu_1$  fue de 0.63.



**Figura 3.19:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de mango de 0.7mm de espesor. **Negro:** Configuración paralela, es decir, configuración  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ . **Rojo:** Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$ , donde  $\hat{\epsilon}$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.63.

En la Tabla 3.12 se recogen de manera resumida los valores de  $\Gamma$  con respecto al tiempo obtenidos para todos los experimentos realizados en rodajas de mango.

Tal y como sucedía en la matriz biológica de la zanahoria, los errores sistemáticos asociados a las medidas obtenidas son más altos en comparación con los de las muestras de matriz salina. De igual forma que lo ya comentado, este comportamiento se relaciona con el entorno en el que se encuentra la molécula objeto de estudio y por supuesto con sus interacciones respecto a las especies de alrededor.

**Tabla 3.12:** Variación del cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) con el tiempo de exposición al aire de una rodaja de mango.

Tiempo/h	$\Gamma$ ( $v_1$ )
0	$0.71 \pm 0.03$
5	$0.64 \pm 0.03$
19	$0.63 \pm 0.02$
26	$0.63 \pm 0.03$
48	$0.62 \pm 0.03$
72	$0.62 \pm 0.02$
78	$0.62 \pm 0.02$

En la Tabla 3.12 llama la atención la distribución y comportamiento del cociente de despolarización pudiendo afirmarse que, al principio, cuando la muestra presenta mayor humedad, es un poco más elevado, aunque posteriormente disminuye hasta estabilizarse.

En el siguiente capítulo se intentará dar una explicación en la que se razonen todos los resultados que han sido alcanzados con el objetivo de proporcionar una visión justificada de los mismos.

### **3.4. Evolución de la intensidad de las bandas Raman durante la postcosecha de los frutos**

En este apartado de la Tesis Doctoral, se describe el estudio de la maduración post-cosecha de diversos tipos de tomate una vez han sido recolectados. Por regla general, estos procesos suelen ir acompañados de una acumulación de carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno y licopeno, que se generan en primer lugar, en el interior del fruto y posteriormente se acumulan hacia el exterior del mismo con el consiguiente cambio de coloración. Por lo tanto, la evaluación del estado de maduración teniendo en cuenta únicamente el color de la superficie no es suficiente<sup>47</sup>.

Según lo afirmado y con el fin de estudiar el estado de maduración se llevó a cabo un seguimiento de la señal Raman producida por los carotenoides presentes en el fruto en

función del tiempo. Para ello, se realizaron dos bloques de medidas. En las primeras se tuvo en cuenta la variación del espectro Raman con respecto a un intervalo de tiempo conocido para evaluar cómo cambia el contenido en carotenoides. En el segundo tipo de medidas, se describe la evolución del cociente de despolarización con el tiempo post-cosecha del fruto.

Existen ciertas dudas acerca de la relación entre la evolución seguida por los carotenoides y los cambios ocurridos en el coeficiente de dispersión, ya que se trata de dos procesos que están relacionados<sup>47, 48</sup>. Por ello, es necesaria una descripción cinética de los roles específicos tanto de los coeficientes como de los carotenoides. Para una mejor ilustración de esta necesidad, bastaría con mencionar lo siguiente: mientras que en los tomates de mayor tamaño (Rambo) tal y como se ha comentado antes, se produce un marcado cambio de coloración<sup>36</sup>, para algunos tomates cherry la maduración tiene lugar sin alteraciones significativas de color en la superficie del fruto, lo que permite afirmar que las variaciones del coeficiente de dispersión pueden ser muy diferentes dependiendo del proceso madurativo.

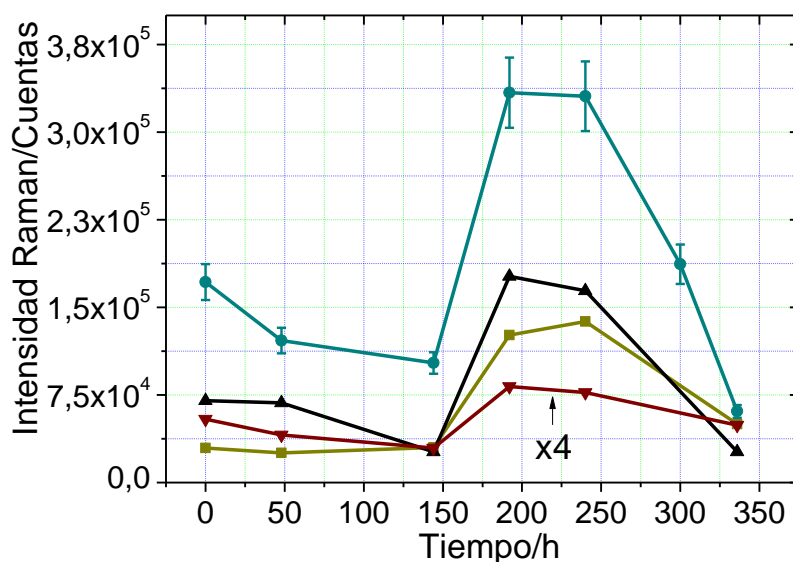
Por regla general, para ciertos tipos de tomate existen seis estados de maduración bien descritos en la bibliografía<sup>49</sup> que se denominan: *Green* (verde maduro), *breaker* (inicio de coloración), *turning* (cambiando), *pink* (rosado), *light red* (rojo pálido) y *red* (rojo) dependiendo de su color en superficie. Por comodidad a partir de este momento únicamente se mencionará el término en inglés.

En todas las medidas que se describen a continuación se han empleado técnicas de Espectroscopia Raman Resonante con sonda y recogida a 180° así como a 90° para el caso de las medidas de polarización tal y como se describió en el Capítulo 2 de esta misma memoria.

En todos los casos, se estudió la intensidad de señal perteneciente al modo vibracional  $\nu_1$  que es el más intenso, así como su evolución con el tiempo. En primer lugar, en diversos tipos de tomates cherry para posteriormente llevar a cabo el mismo análisis en muestras de tomates Rambo.

3.4.1. *Tomates Cherry*

En la Figura 3.20 se aprecia la evolución de la banda  $\nu_1$  antes citada. Lo más significativo es que a pesar de que las señales de cada tomate tienen intensidades diferentes, todos ellos muestran un comportamiento muy similar con respecto al tiempo. Un primer periodo en el que la señal varía de forma despreciable exceptuando cierta inclinación leve en algunos casos; posteriormente, a unas 150 horas, todas las muestras presentan un incremento reseñable en contenido de carotenoides, con el consiguiente aumento de la señal hasta alcanzar un valor máximo. Más tarde, justo antes de las 250 horas se empieza a producir una disminución de intensidad hasta alcanzar finalmente, cerca de las 350 horas valores similares a los iniciales.



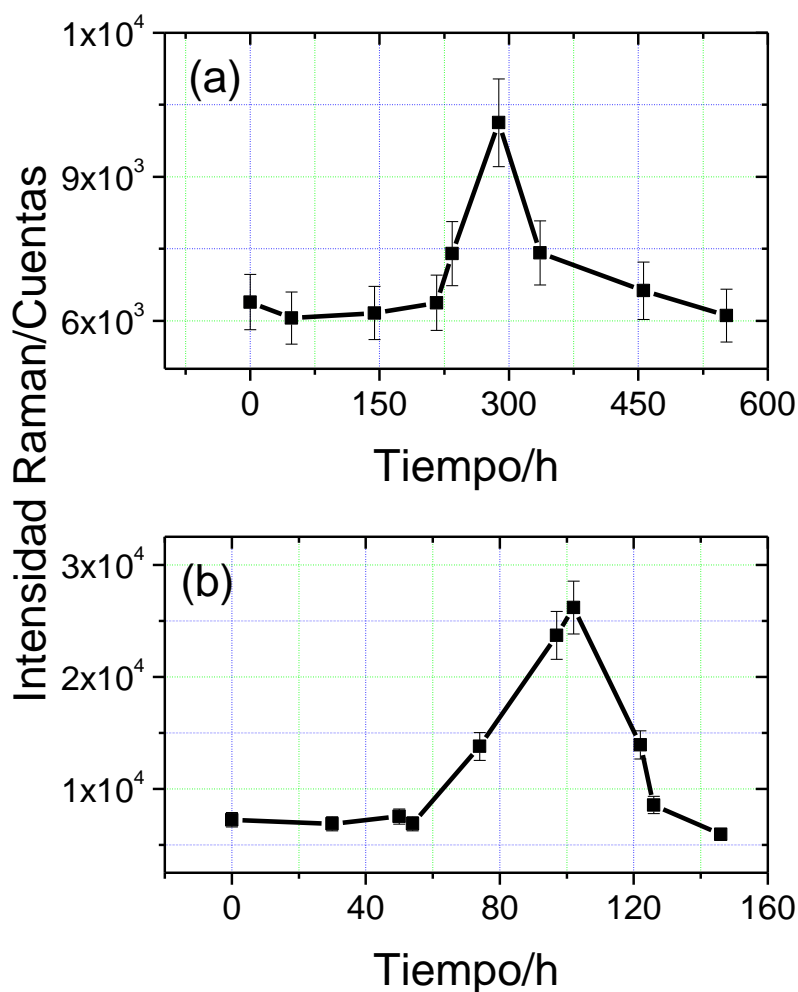
**Figura 3.20:** Intensidades de la banda  $\nu_1$  en distintos tipos de tomates. **Granate:** Rojo ovalado, **Amarillo:** Amarillo ovalado, **Negro:** Verde Ovalado, **Azul:** Naranja ovalado.

Tal y como se puede apreciar en la figura, los resultados de intensidad correspondientes al tomate rojo ovalado han sido multiplicados por 4 para reescalarlos con respecto al resto de muestras ya que de esta manera, pueden ser comparables observándose de una forma más ilustrativa el comportamiento general antes citado.

En el siguiente capítulo se discutirá esta evolución temporal mediante el empleo de un modelo cinético teórico y espectroscópico.

3.4.2. *Tomates Rambo*

Para tener una visión más general de la maduración, se obtuvieron espectros de tomates tipo Rambo durante el proceso, cuyo comportamiento fue muy similar a los mostrados en la primera parte de esta sección. Como consecuencia, la evolución de la intensidad de la banda  $\nu_1$  con el paso del tiempo se puede observar en la Figura 3.21



**Figura 3.21:** Evolución temporal de la intensidad de la banda  $\nu_1$  para dos tomates Rambo en distinto periodo inicial de maduración. (a) Tomate en la denominada fase “green”. (b) Tomate en la fase llamada “breaker”.

A pesar de tratarse de tomates significativamente diferentes si se comparan con los cherry en cuanto a tamaño, color y textura, se puede afirmar que el comportamiento de variación temporal de la señal es semejante, al menos de forma cualitativa.

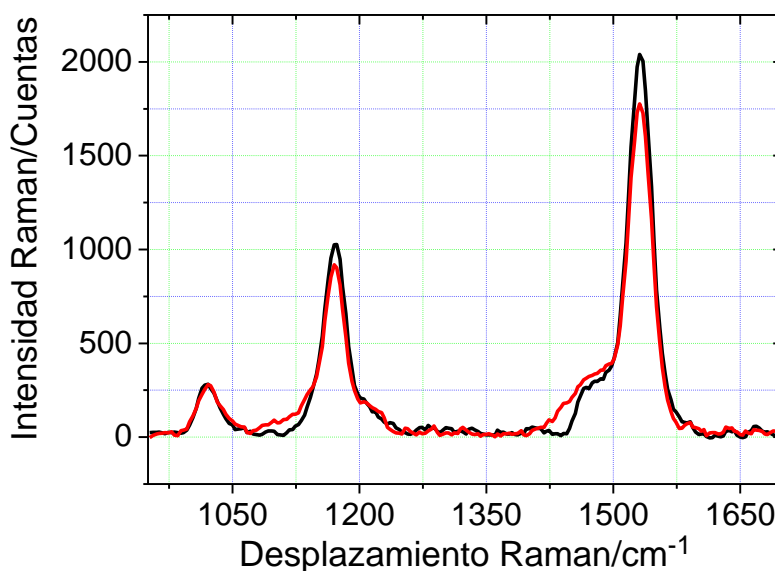
A modo de resumen, conviene recordar que todos los tomates bajo investigación sufren un aumento de señal con el paso del tiempo para finalmente decaer hasta los valores iniciales

tras alcanzar un máximo. Estos resultados relativos al aumento de la señal Raman de carotenoide, son consistentes con los estudios desarrollados por otros investigadores<sup>50, 51</sup> donde se apreciaba una pauta muy parecida.

### 3.5. Evolución de la polarización con el tiempo a 90°

Como en estudios anteriores (mango), en este apartado de la Tesis se obtuvo el cociente de despolarización para evaluar su evolución con respecto del tiempo. En este caso, se empleó un sistema que ya ha sido descrito en el capítulo anterior en la Figura 2.10 b. De hecho, el montaje empleado, ni se corresponde con una transmisión, ni con una configuración típica a 90° a través de todo el fruto, ya que tanto la zona de excitación como la región de recolección se localizan en la misma región de piel.

A modo de ejemplo, en la Figura 3.22 se expone el espectro Raman resonante de un tomate en estado de maduración *green* de la variedad Rambo donde se pueden apreciar tres de las cuatro bandas más características de este tipo de muestras  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  y  $\nu_3$  a  $1524\text{ cm}^{-1}$ ,  $1162\text{ cm}^{-1}$  y  $1010\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Para ser más concretos, realmente se presentan dos espectros superpuestos, que se corresponden con los distintos estados de polarización (paralela y perpendicular).



**Figura 3. 22:** Espectro Raman resonante medido a 90° de un tomate Rambo a tiempo cero. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\hat{\epsilon}_f \parallel \hat{\epsilon}_i$ ; Rojo: Configuración perpendicular  $\hat{\epsilon}_f \perp \hat{\epsilon}_i$ ; donde  $\hat{\epsilon}$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.87.

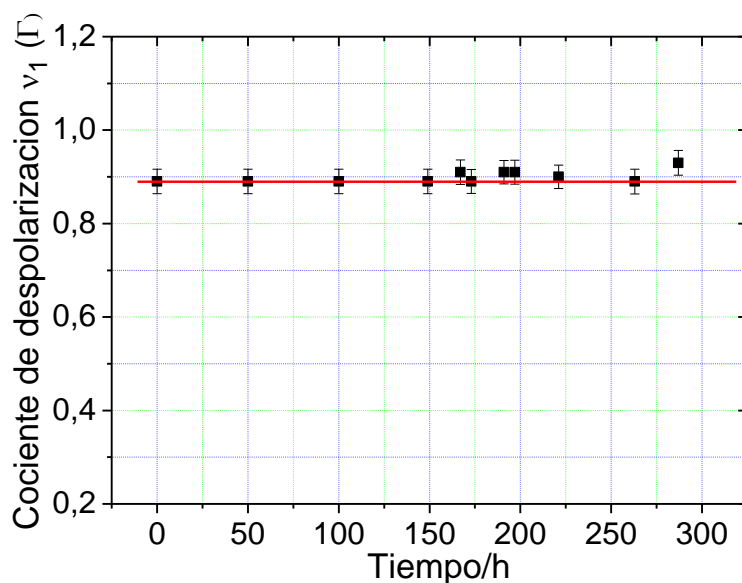
Aunque moderado, existe cierto efecto de despolarización que se manifiesta en la diferencia de intensidades presente en las bandas más características de dichos espectros.

En la Tabla 3.13 se exponen todos los resultados obtenidos mediante las medidas de cocientes de despolarización de tomates Rambo a cada tiempo estudiado.

**Tabla 3.13:** Resultados experimentales obtenidos para la evolución del cociente de despolarización con el paso del tiempo en tomate Rambo.

Tiempo /h	$\Gamma (v_1)$
0	$0.87 \pm 0.03$
4	$0.87 \pm 0.03$
24	$0.85 \pm 0.03$
28	$0.84 \pm 0.03$
48	$0.85 \pm 0.03$
52	$0.84 \pm 0.03$
76	$0.88 \pm 0.03$
96	$0.88 \pm 0.03$
100	$0.87 \pm 0.03$

Sin ánimo de ser redundantes, en vez de presentarse en tablas de valores, en la Figura 3.23 se muestran los puntos experimentales obtenidos para  $\Gamma$  en función del tiempo, pero en este caso pertenecientes a un tomate cherry rojo ovalado, donde se puede observar una línea de tendencia que sirve de guía para una mayor claridad a la hora de analizar la evolución temporal de los resultados.



**Figura 3.23:** Resultados experimentales obtenidos para la evolución del cociente de despolarización de la banda  $v_1$  con el paso del tiempo en tomate cherry rojo ovalado obtenidos de espectros adquiridos en configuración de  $90^\circ$ . La línea roja es una guía para ver la evolución.

A primera vista, se puede observar que no existen cambios significativos del cociente de despolarización  $\Gamma$  ( $v_1$ ) con respecto al tiempo en ninguna de las dos variedades de tomate, aunque este efecto será contrastado más adelante.

### 3.6. Evolución del cociente $v_4/v_1$ con el tiempo

Finalmente, se estudió el valor del cociente de las bandas  $v_4/v_1$  en tomates Rambo pero en esta ocasión en función del tiempo de maduración (y no del radio como se hizo en zanahorias) para analizar los posibles cambios a lo largo del proceso. En tomates, el objetivo principal del análisis tiene que ver con la posibilidad de emplear este cociente como referencia interna a la hora de evaluar la calidad de los frutos. Los resultados alcanzados se adjuntan en la Tabla 3.14.

Como se puede observar, existe una tendencia al alza del cociente según transcurre el tiempo. Dicho aumento, tiene lugar entre el valor a tiempo 0 y el valor a tiempo 72 horas y es de aproximadamente el 40%, un resultado muy superior al del error medio experimental que se corresponde con un 7% por lo que puede considerarse significativo

**Tabla 3.14:** Evolución temporal del cociente de intensidades de las bandas  $\nu_4/\nu_1$  en tomates Rambo

Tiempo /h	$\nu_4/\nu_1$
0	$0.102 \pm 0.006$
5	$0.104 \pm 0.006$
20	$0.106 \pm 0.006$
24	$0.117 \pm 0.007$
29	$0.112 \pm 0.007$
44	$0.125 \pm 0.007$
48	$0.125 \pm 0.007$
68	$0.145 \pm 0.008$
72	$0.140 \pm 0.008$

Estos resultados, al igual que los anteriores serán explicados y justificados en el siguiente capítulo con la finalidad de tener una idea general de los mismos.

### 3.7. Referencias

1. Morris, M. D., and Wallan, D.J. (1979). Resonance Raman Spectroscopy. *Anal Chem.* **51(2)**: 182A-192A. 1979.
2. Brandt, N. N., Brovko, O. O., Chikishev A.Y., O. D. Paraschuk O. D. (2006). Optimization of the Rolling-Circle Filter for Raman Background Substraction. *Appl. Spectrosc.* **60**: 288-293
3. González, A. G., González-Ureña, A., Lewis, R. J., and van der Zwan, G. (2012). Spectroscopy and Kinetics of Tyrosinase Catalyzed *trans*-Resveratrol Oxidation. *Phys. Chem. B.* **116(8)**: 2553-2560.
4. Jourdan, M., Gagné, S., Dubois-Laurent, C., Maghraoui, M., Huet, S., Suel, A., Hamana, L., Briard, M., Peltier, D., and Geoffriau E. (2015). Carotenoid Content and Root Color of Cultivated Carrot: A Candidate-Gene Association Study Using an Original Broad Unstructured Population. *PLoS ONE.* **10(1)**: e0116674. 2015.
5. Biswas, A.K., Sahoo, J., and Chatli M.K. (2011). A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of  $\beta$ -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *Food. Sci. Technol. (Campinas).* **44**: 1809-1813.
6. Karnjanawipagul, P., Nittayanuntaweck, W., Rojsanga, P. and Suntornsuk, L. (2010). Analysis of  $\beta$ -carotene in Carrot by Spectrophotometry. *J. Pharmaceutical Sci.* **37(1-2)**: 8-16.
7. Lawaetz, A. J., Christensen, S. M. U., Clausen, S. K., Jørnsgaard, B., Rasmussen, S. K., Andersen, S. B. and Rinnan, Å. (2016). Fast, cross cultivar determination of total carotenoids in intact carrot tissue by Raman Spectroscopy and Partial Least Squares calibration. *Food Chem.* **204**: 7-13.
8. Baranska, M., Schutze, W., and Schulz, H. (2006). Determination of Lycopene and  $\beta$ -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR and NIR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **78(24)**: 8456-8461.
9. Bhosale, P., Ermakov, I. V., Ermakova, M. R., Gellermann, W., and Bernstein. (2004). P. S. Resonance Raman Quantification of Nutritionally Important Carotenoids in Fruits, Vegetables, and Their Juices in Comparison to High-Pressure Liquid Chromatography Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 3281-3285.

10. Tschirner, N., Schenderlein, M., Brose, K., Schlodder, E., Mroginski, M.A, Thomsen, C., and Hildebrandt, P. (2009). Resonance Raman Spectra of  $\beta$ -carotene in solution and in photosystems revisited: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**: 11471-11478.
11. González A. G. y González-Ureña A. (2012). Transmission resonance Raman spectroscopy: Experimental results versus theoretical model calculations. *Appl. Spectrosc.* **66**: 1163-1170.
12. Barba, A. I. O., Hurtado, M.C., Mata, M. C. S., Ruiz, V.R., and Sáenz de Tejada, M. L. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chem.* **95**: 328-336.
13. Pudney, P. D. A., Gambelli, L., and Gidley J. (2011). Confocal Raman Microspectroscopic Study of the Molecular Status of Carotenoids in Tomato Fruits and Foods. *Appl. Spectrosc.* **65(2)**: 127-134.
14. Saito, S., and Tasumi, M. (1983). Normal-Coordinate Analysis of  $\beta$ -Carotene Isomers and Assignments of the Raman and Infrared Bands. *J. Raman Spectrosc.* **14(5)**: 310-321.
15. Weise, R.J., Merlin, J.C., Lugtenburg, J., Britton, G., Jansen, F. J. H. M., and Conrad, J. P. (1999). Semiempirical and Raman spectroscopic studies of carotenoids. *Biospectroscopy.* **5(1)**: 19-33.
16. Koyama, Y., Takatsuka, I., Nakata, M., and Tasumi, M. (1988). Raman and infrared spectra of the all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of  $\beta$ -carotene: Key bands distinguishing stretched or terminal-bent configurations from central-bent configurations. *J. Raman Spectrosc.* **19(1)**: 37-49.
17. Godoy, H. T., and Rodriguez-Amaya, D. B. (1989). Carotenoid composition of commercial mangoes from Brazil. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **22**: 100-103.
18. Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., and Britton, G. (1997). HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 120-123.
19. Hulshof, P. J. M., Xu, C., van de Bovenkamp, P., and West C.E. (1997). Application of a validated method for determination of provitamin A carotenoids in Indonesian foods of different maturity and origin. *J. Agric. Food Chem.* **45(4)**: 1174-1179.

20. Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274(2)**: 532-8.
21. Burke, D.S., Smidt, C.R. and Vuong, L.T. (2005). Momordica Cochinchinensis, Rosa Roxburghii, Wolfberry, and Sea Buckthorn-Highly Nutritional Fruits Supported by Tradition and Science. *Curr. Top. Nutraceutical Res.* **3(4)**: 259-266.
22. Kubola, J., Meeso, N., and Siriamornpun, S. (2013). Lycopene and beta carotene concentration in aril oil of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) as influenced by aril-drying process and solvents extraction. *Food Res. Int.* **50**: 664-669.
23. Shi J., and Le Maguer et al. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Biotech.* **20(4)**: 293-334.
24. Wilcox, J., Catignani, G., and Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43**: 1-18.
25. Huawei, Z., Xiaowen, W., Elshareif, O., Hong, L., Qingrui, S., and Lianfu Z. (2014). Isomerisation and degradation of lycopene during heat processing in simulated food system. *Int. Food Res. J.* **21(1)**: 45-50.
26. Takeoka, G. R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D. M., Jewell, W. T., Huebner, B., Bertow, D., and Ebeler, S. E. (2001). Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J. Agri. Food Chem.* **49**: 3713-3713.
27. Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., and Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agri. Food Chem.* **50**: 3010-3014.
28. Seybold, C., Frohlich, K., Bitsch, R., Otto, K., and Bohm, V. (2004). Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *J. Agri Food Chem.* **52**: 7005-7010
29. Kaur, D., Wani, A. A., Oberoi, D. P. S. and Sogi, D. S. (2008). Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. *Food Chem.* **108**: 711-718.
30. Al-Wandawi, H., Abul-Rahman, A. and Al-Shaikhly, K. (1985). Tomato processing wastes as essential raw materials source. *J. Agric. Food Chem.* **33**: 804-807.

31. Lin, C.H. and Chen, B.H. (2003). Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1012**: 103-109.
32. Sadler, G., Davis, J. and Dezman, D. (1990). Rapid extraction of lycopene and  $\beta$ -carotene from reconstituted tomato paste. *J. Food Sci.* **55**: 1460-1461.
33. Sharma, S.K., and Le Maguer, M. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage condition. *Food Res. Int.* **29(3-4)**: 309-315.
34. Van den Berg, H., Faulks, R., Fernando-Granado, H., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandman, G., Southon, S. and Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 880-912.
35. Hoskins L.C. (1984). Resonance Raman Spectroscopy of  $\beta$ -Carotene and Lycopene. *J. Chem. Educ.* **61(5)**: 460-462.
36. Zhu, Q., He, C., Lu, R., Mendoza, F.A. and Cen, H. (2015). Ripeness evaluation of “Sun Bright” tomato using optical absorption and scattering properties. *Postharvest Biol. Technol.* **103**: 27-34.
37. D’Evoli, L., Lombardi-Boccia, G., and Lucarini, M. (2013). Influence of Heat Treatments on Carotenoid Content of Cherry Tomatoes. *Foods.* **2(3)**: 352-363.
38. Lazos, E.S., and Kalathenos, P. (1988). Composition of tomato processing wastes. *Int. J. Food Sci. Tech.* **23(6)**: 649-652.
39. Sharma S.K., and Le Maguer, M. (1996). Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Ital. J. Food Sci.* **8(2)**: 107-113.
40. Trebolazabala, J., Maguregui, M., Morillas, H., de Diego, A., and Madariaga, J.M. (2013). Use of portable devices and confocal Raman spectrometers at different wavelength to obtain the spectral information of the main organic components in tomato (*Solanum Lycopersicum*) fruits. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **105**: 391-399.
41. Baker, R., Matousek, P., Ronayne, K.L., Parker, A.W., Rogers, K., and Stone N. (2007). Depth profiling of calcifications in breast tissue using picosecond Kerr-gated Raman Spectroscopy. *Analyst.* **132**: 48-53.

42. Stone, N., Baker, R., Rogers, K., Parker, A.W., and Matousek, P. (2007). Future Possibilities in the diagnosis of breast cancer by subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS). *Analyst*. **132**: 899-905.
43. Matousek, P., and Stone, N. (2007). Prospects for the diagnosis of breast cancer by non-invasive probing of calcifications using transmission Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **12(2)**: 024008. [doi: 10.1117/18934].
44. Withnall, R., Chowdhry, B. Z., Silver, J., Edwards, H. G. M., and de Oliveira, L. F. C. (2003). Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim. Acta A*. **59**: 2207-2212.
45. Abramczyk, H., Kolodziejci, M. and Waliszewska, G. (1999). Vibrational relaxation of  $\beta$ -carotene in acetonitrile solution and in carrot in situ. *J. Mol. Liq.* **79(3)**: 223-233. 1999.
46. Okamoto, H., Sekimoto, Y., and Tasumi, M. (1994). Assignment and anharmonicity analysis of overtone and combination bands observed in resonance Raman spectra of carotenoids. *Spectrochim. Acta A*. **50(8/9)**: 1467-1473.
47. Qin, J., Chao, K. and Kim, M. S. (2012). Nondestructive evaluation of internal maturity of tomatoes using spatially offset Raman spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* **71**: 21-31.
48. Shao, Y., He, Y. H., Gómez, A. H., Pereir, A. G., Qiu, Z. and Zhang, Y. (2007). Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato "Heatwave" (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics". *J. Food Eng.* **81(4)**: 672-678.
49. USA Agriculture Marketing Service (AMS). United States standards for grades of fresh tomatoes. [http://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato\\_Standard%5B1%5D.pdf](http://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato_Standard%5B1%5D.pdf). Última consulta 18/07/2017.
50. Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W. and Bramley, P.M. (1994). Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development. *Plant Physiol.* **105**: 405-413.
51. Qin J., Chao K. and Kim M.S. (2011). Investigation of Raman chemical imaging for detection of lycopene changes in tomatoes during postharvest ripening. *J. Food Eng.* **107**: 277-288.



# **4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES I**



## 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES I

En esta parte de la memoria se discutirán los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo 3. De esta manera, y de forma detallada se razonarán los valores hallados en los diversos tipos de medidas realizadas, siendo consecuentes con los datos expuestos.

La organización de apartados será muy similar a la ya presentada en el capítulo anterior. Por lo tanto, la estructuración se hará en base a varios bloques. El primero de ellos estará referido a la espectroscopia de carotenoides donde se llevó a cabo la asignación vibracional de espectros. En el segundo bloque se detallarán los aspectos relacionados con la distribución espacial. En un tercer bloque se hará referencia a la dependencia de los cocientes de despolarización con el espesor a un tiempo dado y con el tiempo a espesor constante para finalmente, presentar una sección referente a la evolución temporal de señales y cocientes de despolarización por un lado y a la evolución temporal del cociente  $v_4/v_1$  por otro.

### 4.1. Espectros Raman Resonantes, descripción de bandas fundamentales

En la primera sección de este capítulo se pretenden caracterizar algunos de los analitos que serán estudiados a lo largo de la Tesis Doctoral. Para ello, en el Capítulo 3 se han presentado espectros pertenecientes a muestras de carotenoides en diversas matrices tanto de frutos (*in vivo*) como inorgánicas (KBr). La mayor parte de los espectros mostrados contaban con cuatro bandas muy significativas. Dichas señales son las correspondientes a los modos vibracionales que se ven involucrados con las transiciones electrónicas tal y como se explicó en el Capítulo 2.

En principio, una molécula no lineal presenta  $3N-6$  modos vibracionales, siendo  $N$  el número de átomos, por lo que en nuestro caso, tanto para el  $\beta$ -caroteno como para el licopeno ( $C_{40}H_{56}$ ), al ser moléculas no lineales, se pueden esperar 282 vibraciones diferentes, muchas de las cuales serán activas en espectroscopia Raman tal y como se mostrará en la sección de Modelización Molecular en capítulos sucesivos.

En los resultados expuestos, se han adquirido espectros empleando la línea de excitación de 532 nm en la mayoría de muestras, y la longitud de onda de excitación de 514.5 nm para el caso de los extractos de licopeno (aunque estos últimos serán comentados en capítulos posteriores), cumpliendo ambas longitudes de onda las condiciones de resonancia. Al trabajar en estas circunstancias se mejoran

significativamente las señales, ya que la intensidad Raman aumenta considerablemente respecto a los obtenidos en condiciones no resonantes<sup>1</sup> en todas las muestras, aunque únicamente se magnificarán aquellos modos que se encuentren acoplados energéticamente a la transición electrónica más importante.

La transición electrónica más significativa permitida para los carotenoides en la región de longitudes de onda perteneciente al UV-Vis cercano está descrita como  $1^1A_g^* \rightarrow 1^1B_u^{*+}$  ( $S_0 \rightarrow S_n$ , típicamente  $n = 2$ ) correspondiente con la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  permitida<sup>2-5</sup>. Por el contrario, la absorción al estado  $S_1$  ( $2^1A_g^{*-}$ ), el estado singlete excitado de más baja energía, está prohibida por simetría desde el estado fundamental y por ello no es accesible mediante procesos de un sólo fotón<sup>6</sup>. Así, los modos vibracionales previamente mencionados estarán acoplados energéticamente a la transición  $S_0 \rightarrow S_2$  antes explicada.

La principal característica de los espectros adquiridos para muestras de carotenoides en condiciones resonantes, tiene que ver con la mejora de ciertos modos vibracionales, especialmente los que se relacionan con las vibraciones de esqueleto, en este caso el  $\nu_1$  y el  $\nu_2$ , sin embargo, también se pueden producir mejoras en otros modos acoplados al  $\nu_1$  que es en el que se produce un mayor acoplamiento fonón-electrón y por lo tanto una magnificación en la señal<sup>4</sup> más ostensible.

Las asignaciones fundamentales, se han realizado para las bandas más significativas. Gracias a la intensidad de dichas bandas, es posible intuir la cantidad de carotenoide presente en las muestras, cómo se distribuye a lo largo de ciertos frutos y en qué configuración molecular se encuentra. Por otro lado y teniendo en cuenta las dos bandas más importantes ( $\nu_1$  y  $\nu_2$ ) se podrán estudiar tanto sus cocientes de despolarización como sus variaciones, pasando por su dependencia con el espesor y con el tiempo. Finalmente, gracias a la banda  $\nu_4$  es factible realizar estudios de la cantidad de agua presente y de la cantidad de carotenoide que se encuentra formando dímeros y/o estructuras más complejas en ciertos frutos, ya que dicha señal está directamente relacionada con las contribuciones fuera del plano.

Por otro lado, es muy destacable la similitud de desplazamientos Raman existente en los carotenoides objeto de estudio, ya que presentan una semejanza estructural manifiesta de dobles enlaces conjugados. A modo de resumen, en la Tabla 4.1 se presentan los

desplazamientos para aquellos tipos de muestra que contienen mayoritariamente  $\beta$ -caroteno.

**Tabla 4.1:** Desplazamientos del modo vibracional  $\nu_1$  y  $\nu_2$  en distintos tipos de muestras.

Tipo de muestra	Desplazamiento Raman de la banda $\nu_1$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Desplazamiento Raman de la banda $\nu_2$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
Zanahoria (5mm espesor)	1522	1158
Mango (0.7 mm espesor)	1524	1155
Patrón $\beta$ -caroteno (0.1mg/50mg KBr)	1516	1153

Hay varios factores que pueden hacer cambiar la posición de la banda  $\nu_1$  de los carotenoides. Algunos de ellos son: la matriz en la que se hallan<sup>7, 8</sup>, la configuración en la que se encuentran *cis* o *trans*<sup>9</sup>, la longitud de la conjugación efectiva<sup>4, 8, 10, 11</sup> e incluso la longitud de onda empleada para la realización de las medidas<sup>12</sup>.

Tanto las zanahorias como las muestras de mango ricas en  $\beta$ -caroteno, presentan espectros muy similares a los observados para el patrón de  $\beta$ -caroteno en cuanto a bandas se refiere, aunque existe un ligero desplazamiento a mayores números de ondas en las muestras biológicas. Dicho desplazamiento también fue observado por otros investigadores<sup>7, 8</sup>. El citado en último lugar, razonó este suceso en base a la interacción natural existente entre la matriz y los carotenoides que fuerza a los polienos a variar ligeramente su forma química y/o estructura física, siendo esta acción crucial, ya que puede producir pequeños desplazamientos como los que aquí se observan. Por este motivo, la diferencia de desplazamiento de las señales pertenecientes a las muestras de zanahoria y mango es significativamente superior si se compara con los presentados por el patrón.

Análogamente, en los espectros pertenecientes a tomates también se observaron ligeros desplazamientos en las señales principales, cuyo origen es el mismo que el observado en el  $\beta$ -caroteno.

Ya que no existe resolución espectral suficiente para sacar conclusiones en cuanto al modo vibracional  $\nu_1$  y su posición en los casos en los que están presentes tanto el

licopeno como el  $\beta$ -caroteno (sobre todo en tomates), únicamente se pudo obtener una idea clara en el caso de las sustancias puras o ricas en uno de los dos componentes como sucedía con los extractos, con los patrones y con las muestras de mango y zanahorias.

A pesar de lo mencionado, debido al carácter resonante de las medidas, lo que se detecta mayoritariamente es la señal de los carotenoides presentes en diversos tipos de frutos, permitiendo este hecho hacer un seguimiento de su variación tanto con el tiempo, como con el radio de rodajas cortadas, así como de la variación del cociente de despolarización con el tiempo (a espesor constante) y con el espesor (a un tiempo dado).

Por último, es interesante hacer una aclaración sobre el modo vibracional  $\nu_4$  que aparece en todas las muestras biológicas entre  $955\text{-}966\text{ cm}^{-1}$ . Tal y como describen algunos autores, la intensidad espectral de la citada vibración es sensible a la configuración en la que se encuentra el carotenoide, es decir, está relacionada con las distorsiones de la configuración planar<sup>13-16</sup>. De esta manera, la banda puede presentar una intensidad débil indicando así una configuración plana relajada o, por el contrario, se puede presentar como una banda más intensa siempre que existan distorsiones significativas fuera del plano. Gracias a dicho efecto, que será discutido más adelante, algunos autores<sup>17</sup> han podido llevar a cabo análisis acerca de la configuración de ciertos polienos como por ejemplo la neoxantina en complejos captadores de luz (coloquialmente conocidos como complejos antena).

### *Tomate Naranja Ovalado*

De todos los espectros simples presentados en el capítulo anterior, llama la atención el de la Figura 3.10, ya que se pueden ver con claridad ciertos sobretonos y bandas de combinación. Este hecho no es nuevo, ya que fue observado en otros estudios<sup>18</sup> a bajas temperaturas.

Está bien descrito<sup>16, 19, 20</sup> que la mayor parte de los sobretonos se encuentran asociados a los modos vibracionales totalmente simétricos de tensión: C=C ( $\nu_1$ ), C-C ( $\nu_2$ ) y de balanceo en el plano de los grupos CH<sub>3</sub> ( $\nu_3$ ) tanto en estado sólido como en disolución.

En la siguiente tabla se comparan los valores alcanzados para los sobretonos y bandas de combinación en los experimentos del presente estudio, con los observados por otros grupos de investigación<sup>18</sup>.

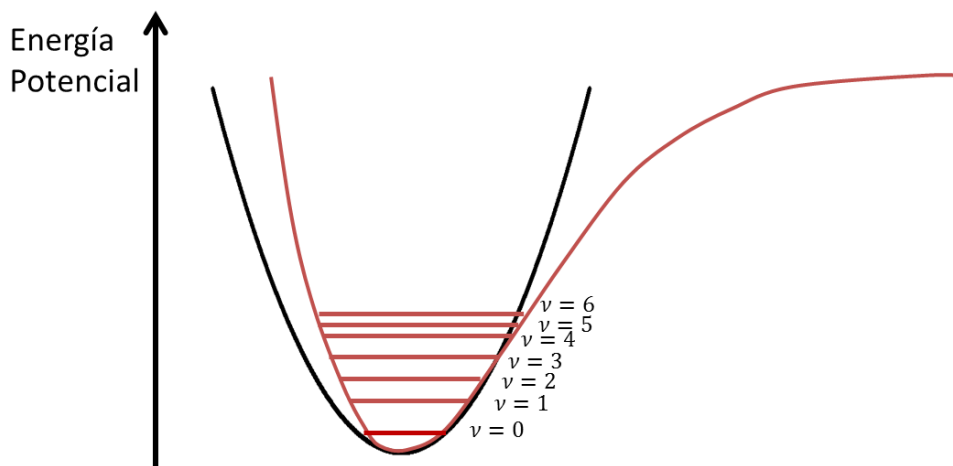
**Tabla 4. 2:** Valores obtenidos para bandas de combinación y sobretonos comparados con los estudios de la referencia 18.

Bandas estudiadas	Desplazamiento Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Presente estudio)	Desplazamiento Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Referencia 18)	
		Calculadas	Experimentales
$\nu_2 + \nu_3$	2169	2164	2163
$2\nu_2$	2316	2315	2315
$\nu_1 + \nu_3$	2533	2528	2529
$\nu_1 + \nu_2$	2672	2681	2680
$2\nu_1$	3038	3048	3048

Debido a que nuestros análisis no han sido realizados a bajas temperaturas como sucedía con los citados<sup>18</sup> pueden existir ciertos cambios en los niveles poblacionales, además en el caso de este tomate las señales provienen de una matriz biológica y no de los estándares puros como provenían las de los citados autores, por ello, es normal que existan ligeras diferencias al comparar los valores de ambos estudios. Por otro lado, las medidas del estudio de comparación fueron realizadas en disoluciones vítreas (glassy solutions) pudiendo influir dicha circunstancia en las diferencias presentadas.

#### *Cálculo de constantes de anarmonicidad*

Las moléculas reales, cuando vibran no se comportan como un oscilador armónico, sino que existen ciertas contribuciones a la anarmonicidad<sup>21</sup>. En la Figura 4.1 se representa el potencial de una molécula diatómica, que vibra como un oscilador armónico cuyo potencial se asemeja a una parábola superpuesto al potencial de una molécula diatómica que presenta anarmonicidad, siendo este último comportamiento parecido al descrito por un potencial de Morse.



**Figura 4.1:** Aproximación de la curva de energía potencial del movimiento nuclear de una molécula diatómica. **Negro:** Oscilador armónico. **Rojo:** Oscilador anarmónico.

En un oscilador anarmónico las energías de los niveles vibracionales vienen dadas por la siguiente expresión

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) \tilde{\nu}_e - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 \tilde{\nu}_e \chi_e \quad [4.1]$$

Donde  $v$  hace referencia al nivel vibracional ( $v = 0, 1, 2 \dots v_{\max}$ ),  $\tilde{\nu}_e$  es la frecuencia fundamental del oscilador armónico y  $\chi_e$  es la constante de anarmonicidad. A modo aclaratorio, se puede mencionar que el número de niveles vibracionales en un oscilador anarmónico es finito. Como se puede observar en la expresión, el segundo término de la ecuación va tomando más importancia según aumenta el número cuántico  $v$ , hasta que  $E_v$  se hace nulo.

En este punto se puede calcular la energía teórica en cada nivel. De este modo, las energías de los tres primeros niveles (0, 1, 2) son las siguientes

$$\begin{cases} E_0 = \frac{1}{2} \tilde{\nu}_e - \frac{1}{4} \chi_e \tilde{\nu}_e & (a) \\ E_1 = \frac{3}{2} \tilde{\nu}_e - \frac{9}{4} \chi_e \tilde{\nu}_e & (b) \\ E_2 = \frac{5}{2} \tilde{\nu}_e - \frac{25}{4} \chi_e \tilde{\nu}_e & (c) \end{cases} \quad [4.2]$$

Y por lo tanto el número de ondas de la banda fundamental y el primer sobretono, viene dada por la diferencia de energías entre los niveles b-a y c-a respectivamente, por lo tanto

$$\begin{cases} \tilde{\nu}_{v=0 \rightarrow v=1} = \tilde{\nu}_e - 2\chi_e \tilde{\nu}_e & (d) \\ \tilde{\nu}_{v=0 \rightarrow v=2} = 2\tilde{\nu}_e - 6\chi_e \tilde{\nu}_e & (e) \end{cases} \quad [4.3]$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se pueden calcular las constantes de anarmonicidad y la frecuencia fundamental.

Para el caso de la vibración C=C, se ha obtenido un valor de  $\tilde{\nu}_e = 1543\text{cm}^{-1}$  y un producto de  $\chi_e\tilde{\nu}_e = 7.99\text{ cm}^{-1}$  siendo la energía en el punto cero  $E_0 = 769\text{ cm}^{-1}$ , mientras que para la vibración C-C los resultados obtenidos son de  $\tilde{\nu}_e = 1170\text{ cm}^{-1}$  siendo el producto  $\chi_e\tilde{\nu}_e = 3.98\text{ cm}^{-1}$  y  $E_0 = 584\text{cm}^{-1}$ .

Si se comparan estos valores con los obtenidos por los investigadores de la referencia 18, se observa que presentan el mismo orden de magnitud, aunque con algunas diferencias. En el caso de las frecuencias de las vibraciones de equilibrio  $\nu_1$  y  $\nu_2$  se han obtenido valores de  $1543\text{ cm}^{-1}$  y  $1170\text{ cm}^{-1}$  siendo los obtenidos por la referencia<sup>18</sup>, de  $1535.1\text{ cm}^{-1}$  y  $1167.1\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

Como es bien sabido, estos datos dependen del potencial. Dicho potencial, podría verse afectado por las interacciones intermoleculares que a su vez se relacionan con la temperatura y la matriz en la que se encuentren. Por ello, cuando existen interacciones intermoleculares, éstas no se comportan de la misma forma en un medio o en otro o a una temperatura u otra. Como consecuencia, los desplazamientos que se han obtenido a mayores números de ondas en comparación con los del citado estudio, tienen que ver con el tipo de muestra y temperatura de trabajo (patrón en disolución vítrea a 77 K frente a muestra biológica a temperatura ambiente) a las que se han realizado las medidas. Debido a que la constante de anarmonicidad depende directamente del número de ondas, también se verá afectado el producto  $\chi_e\tilde{\nu}_e$ , ya que en el caso del estudio que se está empleando para comparar<sup>18</sup>, los productos fueron de  $2.3\text{ cm}^{-1}$  y  $1.8\text{ cm}^{-1}$  en los sobretonos de las vibraciones C=C y C-C respectivamente, mientras que los nuestros presentan valores superiores:  $7.99\text{ cm}^{-1}$  y  $3.98\text{ cm}^{-1}$ .

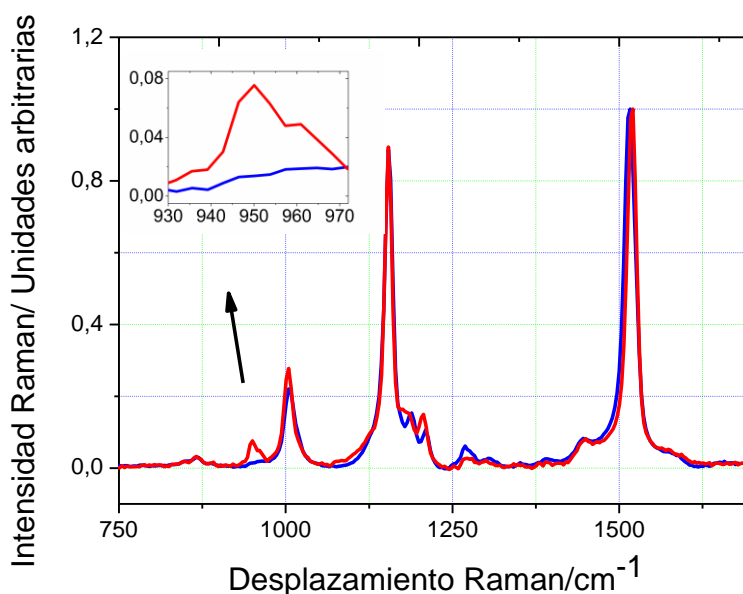
#### **4.2. Distribución Espacial de $\beta$ -caroteno y configuración molecular en rodajas de zanahoria**

Una vez obtenidos los espectros simples tanto de las rodajas de zanahoria como de los patrones, se hizo una superposición de los mismos para poder compararlos.

Así, en la Figura 4.2 se puede ver con claridad que la diferencia fundamental radica en el modo vibracional que se ha denominado en el capítulo anterior como  $\nu_4$ . Tal y como

se ha señalado anteriormente, en el caso del patrón, dicha vibración es prácticamente despreciable, mientras que en la muestra de matriz biológica se aprecia con claridad.

Contemplando el hecho antes descrito en cuanto a los pequeños desplazamientos en diferentes matrices, y para que ambos sean comparables, en la figura presentada se ha aplicado una pequeña corrección trasladando ligeramente el espectro de la muestra patrón hacia mayores números de ondas.



**Figura 4.2:** Comparación entre los espectros Raman Resonantes adquiridos en configuración de transmisión de 10  $\mu\text{g}$  de un estándar de  $\beta$ -caroteno diluidos en KBr hasta alcanzar los 50mg totales de muestra (**línea azul**) y una rodaja de zanahoria de 0,5 mm de espesor (**línea roja**). En ambos espectros la banda v1 ha sido normalizada a 1. La diferencia queda mejor reflejada en el recuadro de la figura.

Haciendo especial hincapié en la parte ampliada de la figura, se puede vislumbrar que, aunque mal resueltos, existen dos picos que aparecen a  $950 \text{ cm}^{-1}$  y  $961 \text{ cm}^{-1}$  pertenecientes a la muestra de zanahoria. Este hecho no es nuevo, ya que dichas señales también fueron observadas en espectros Raman de carotenoides pertenecientes a cloroplastos aislados de *Arabidopsis* por otros investigadores<sup>15</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, la contribución a la señal del pico en cuestión, depende de la configuración espacial de los carotenoides<sup>17</sup>. Lamentablemente, la baja intensidad obtenida para esta banda en los estudios que se han desarrollado, hace imposible seguir la evolución del doblete en las medidas Raman en función de la distancia al centro de la muestra, es decir en función del radio (Véase más adelante).

De todas maneras, a pesar de la limitación señalada, la característica más destacable puede asociarse a la alta sensibilidad de la técnica de Transmisión Raman Resonante, que permite que la citada banda sea detectada.

A modo de conclusión, se puede resaltar que la existencia del modo vibracional denominado  $\nu_4$  en la muestra de zanahoria y su ausencia en las muestras de patrones, sugiere una configuración del  $\beta$ -caroteno diferente en ambas matrices. Por todo lo expuesto, el análisis de dicha banda y su evolución puede revelar información de la configuración espacial de los carotenoides presentes en este tipo de tejidos biológicos.

Observando la variación de la señal Raman, según nos alejamos del centro de rodajas de zanahoria se puede estimar cómo está repartido el  $\beta$ -caroteno en la matriz de las muestras objeto de estudio. Para ello, como ya se ha explicado en otros epígrafes (véase Capítulo 3), se han realizado medidas a pequeños desplazamientos estudiándose la variación en el número de cuentas Raman.

El análisis de la distribución espacial del  $\beta$ -caroteno, es uno de los elementos que tiene más interés en estos estudios. De hecho, en investigaciones realizadas con anterioridad en otros grupos<sup>22</sup> mediante técnicas de mapeo ya se logró revelar información detallada del contenido relativo de carotenoides, así como de su distribución espacial en distintos tipos de zanahorias, destacándose la heterogeneidad en lo referente al reparto del  $\beta$ -caroteno a lo largo de distintas secciones del fruto. En la parte de resultados se ha presentado un mapa de contorno que varía con el radio, donde se puede inferir con claridad dónde se localiza el polieno en las muestras.

Si se observa con detenimiento la Figura 3.12 presentada en el capítulo anterior, es fácil darse cuenta de que el carotenoide se acumula predominantemente, en la zona del floema secundario, y en la región de la peridermis. Adicionalmente, se puede afirmar que la menor cantidad de carotenoide se encuentra en el xilema secundario que es un tejido vegetal formado por células más rígidas.

Estos hechos fueron ratificados mediante la representación del logaritmo decimal de la intensidad del modo vibracional  $\nu_1$  presente a  $1528\text{ cm}^{-1}$  frente al radio (véase Figura 3.13), donde además se puede percibir la existencia de un gradiente de concentración con una tendencia al alza en la zona de distancias intermedias. Como se puede deducir, la figura se encuentra en consonancia con el mapa comentado anteriormente, ya que la

menor cantidad de señal se encuentra en la zona del xilema secundario, entre los  $\pm(0-5)$  mm de radio. Finalmente, como ya se ha expuesto, existe un gradiente de concentraciones que va aumentando a través de la región perteneciente al cambium vascular hasta alcanzar un valor máximo que también es consistente con lo observado en el mapa de distribución.

Según la revisión bibliográfica llevada a cabo, no existen investigaciones detalladas en las que se comparen activamente el modo vibracional  $\nu_1$  y  $\nu_4$  permitiendo así obtener una idea de la configuración molecular presente en la matriz biológica y por consiguiente capaz de dar una idea del estado de agregación molecular.

Tal y como se ha mencionado, la banda  $\nu_4$  se relaciona con la desviación de la planaridad dentro de una muestra que contiene carotenoides. Por ello, y con el fin de conocer la conformación espacial del pigmento, se realizó un análisis exhaustivo de la variación de su intensidad a lo largo de la muestra empleando para ello la banda  $\nu_1$  a modo de referencia interna, ya que ésta no depende de las contribuciones fuera del plano.

Para tal fin, se realizó el análisis del cociente de ambos modos vibracionales y su variación con el radio, conociendo de esta manera en qué magnitud se producían dichas desviaciones de la planaridad en función de las diferentes partes de la matriz biológica objeto de estudio.

En los datos presentados en la Figura 3.14, se puede apreciar con claridad cómo el cociente  $\nu_4/\nu_1$  alcanza su mínimo absoluto en la región del cambium vascular. Este hecho sugiere que, independientemente de la cantidad de pigmento, la menor fracción de carotenoide presente en configuración torsionada (fuera del plano) se produce en la citada zona. Esta afirmación se encuentra en consonancia con estudios realizados por otros grupos de investigación<sup>23</sup> en otros medios y matrices, donde se consideraba el papel desempeñado por el agua en la formación de estructuras agregadas de carotenoides, mostrando que las moléculas de agua son capaces de estabilizar los dímeros de  $\beta$ -caroteno mediante interacciones débiles con enlaces de hidrógeno de tipo  $\pi$ . De hecho, el citado estudio revela que las estructuras del polieno formadas en presencia de moléculas de agua destacan por un aumento significativo de la banda  $\nu_4$  asociada a la configuración torsionada de la estructura molecular.

Además, en la Figura 3.14 presentada en el capítulo anterior, se muestra cómo la región que exhibe un mayor cociente  $v_4/v_1$  es la correspondiente al xilema que es donde se debería esperar una concentración de agua superior al resto de los tejidos ya que se encarga de transportarla desde el suelo hasta el resto de la planta, incluidas las hojas.

En este punto, aún no se puede ofrecer una explicación plausible para justificar por qué el menor valor del cociente  $v_4/v_1$  se encuentra en la región del cambium vascular, y únicamente se puede ofrecer una hipótesis que deberá ser contrastada con futuros experimentos.

Está bien descrito<sup>24</sup> que, durante el crecimiento secundario de la raíz, el cambium vascular se forma entre el xilema y el floema dividiéndolos y produciendo nuevas células en el xilema, que formarán el xilema secundario hacia el interior del cambium así como nuevas células del floema que se encargarán de componer el floema secundario hacia el exterior.

En este escenario, es bastante probable que los agregados de carotenoides o las proteínas enlazadas unidas mediante moléculas de agua atrapadas, puedan tener una menor probabilidad de cruzar al cambium vascular que la que tendría un monómero libre o un carotenoide con una configuración más plana, menos torsionada; en otras palabras, la marcada actividad de crecimiento del meristemo tanto hacia el interior como hacia el exterior, desde un punto de vista estructural o estereoquímico puede no ser el mejor entorno para el almacenamiento o estabilidad de los complejos de carotenoides y agregados. Así pues, la región del cambium podría convertirse en una barrera natural para el flujo de complejos de carotenoides hacia el interior de la zanahoria facilitando, de este modo, que el alimento transportado desde las hojas, mediado por el floema, pueda almacenarse en el floema secundario y en la peridermis. En resumen, la actividad específica del cambium vascular en el meristemo puede ser la responsable del bajo cociente encontrado en dicha zona.

Todos estos hallazgos han servido para resaltar la gran capacidad de la técnica de transmisión Raman resonante gracias a su alta simplicidad y sensibilidad que permite medir con una alta resolución los modos vibracionales más activos en tejidos biológicos y además ha posibilitado tener una idea completa tanto del contenido de pigmento como de su distribución espacial.

Asimismo, la sensibilidad inherente a la técnica ha posibilitado tener más conocimiento acerca de la configuración molecular dentro de las diferentes zonas del tejido biológico bajo estudio. En resumen, gracias al sistema experimental empleado, se puede comprender mejor, no sólo la estructura de la planta, sino también su fisiología, lo que lo convierte en un aspecto de especial relevancia.

### 4.3. Polarización de las bandas Raman. Modelo teórico

#### 4.3.1. Aspectos previos y modelo teórico

Para interpretar los resultados obtenidos en las medidas de despolarización presentados en el Capítulo 3 resulta necesario hacer una pequeña presentación teórica para enmarcar el modelo que se ha desarrollado.

En esta sección, por tanto, se va a profundizar creando una extensión de otro modelo previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación<sup>7</sup>. Fundamentalmente, en dicho modelo se considera que la muestra presenta un carácter homogéneo y la dispersión de la luz se describe mediante tres parámetros básicos: la sección eficaz Raman  $\sigma_R(\lambda)$ , la sección de atenuación del láser  $\sigma_a(\lambda_{exc})$  y la sección eficaz de atenuación Raman  $\sigma_R^a(\lambda)$ . En este contexto  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda$  representan la longitud de onda de excitación y de la señal Raman respectivamente.

La ecuación de partida que se ha empleado es la número 8 de la referencia 7, que viene dada en [4.4]. Dicha expresión, indica la intensidad total de la señal Raman  $I_R^a$  y los factores de los que depende.

$$I_R^a(\lambda, x) = P_0 \frac{\sigma_R(\lambda)}{\sigma_a(\lambda_{exc})} [(1 + \gamma)(1 - e^{-Bx}) - \gamma Bx] \quad [4.4]$$

Así,  $P_0$  representa la densidad de potencia del láser,  $x$  el espesor de la muestra,  $B = \sigma_a \cdot N_s$  siendo  $N_s$  un indicador de la concentración de partículas de muestra y  $\gamma = \sigma_R^a / \sigma_a$  donde  $\sigma_a$  es la sección de atenuación del láser y  $\sigma_R^a$  es la sección de atenuación Raman. En lo sucesivo se eliminará el paréntesis para  $\sigma_a$  y  $\sigma_R^a$ . En este tipo de muestras se puede desarrollar la expansión del tipo  $e^{-Bx} \simeq 1 - Bx + \frac{1}{2} B^2 x^2 + \dots$  despreciando los términos superiores al cuadrático.

Por brevedad, no se especifica todo el tratamiento matemático desarrollado, aunque después de reagrupar algunos términos se obtiene la siguiente expresión.

$$I_R^a(\lambda, x) = \frac{P_0}{\sigma_a} \sigma_R(\lambda) Bx \left[ 1 - \frac{1}{2} Bx(1 + \gamma) \right] \quad [4.5]$$

En este punto, se puede considerar que la luz incidente del láser que interactuará con la muestra se encuentra linealmente polarizada y por lo tanto se tendrán en cuenta dos secciones eficaces de dispersión Raman, la paralela con respecto a la luz incidente  $\sigma_R^{\parallel}(\lambda)$  y la perpendicular  $\sigma_R^{\perp}(\lambda)$ .

Asimismo, es posible definir dos secciones de atenuación diferentes  $\sigma_R^{a(\parallel)}$  y  $\sigma_R^{a(\perp)}$  que representan la sección de atenuación del Raman polarizado tanto paralela como perpendicularmente.

En principio, y dado que hasta este momento se ha considerado que la muestra es homogénea, no deberían existir diferencias significativas entre las dos secciones de atenuación del láser, por lo tanto, se va a adoptar la igualdad en la que  $\sigma_a^{\parallel} = \sigma_a^{\perp}$ . Teniendo en cuenta todas las aproximaciones expuestas [4.5] se puede dividir en las dos expresiones siguientes

$$I_R^{a\parallel}(\lambda, x) = \frac{P_0}{\sigma_a} \sigma_R^{\parallel}(\lambda) Bx \left[ 1 - \frac{1}{2} Bx(1 + \gamma^{\parallel}) \right] \quad [4.6 (a)]$$

$$I_R^{a\perp}(\lambda, x) = \frac{P_0}{\sigma_a} \sigma_R^{\perp}(\lambda) Bx \left[ 1 - \frac{1}{2} Bx(1 + \gamma^{\perp}) \right] \quad [4.6 (b)]$$

Llegados a este punto, el cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) queda descrito de la forma  $I_R^{a(\parallel)}/I_R^{a(\perp)}$ . Así, empleando las expresiones [4.6] (a) y [4.6] (b)  $\Gamma$  viene dado por la ecuación [4.7].

$$\Gamma = \rho \frac{1 - \frac{1}{2} Bx(1 + \gamma^{\perp})}{1 - \frac{1}{2} Bx(1 + \gamma^{\parallel})} \quad [4.7]$$

Donde  $\rho = \sigma_R^{\perp}(\lambda)/\sigma_R^{\parallel}$  representa el cociente de despolarización a espesor cero (molecular) y  $\gamma^{(i)} = \sigma_R^{a(i)}/\sigma_a$  con  $i = \parallel$  ó  $\perp$ .

En el Apéndice I.a. se demuestra que  $\Gamma$  puede expresarse de la siguiente forma

$$\Gamma = \rho + \frac{1}{2}\rho(1 - \rho)\sigma_R^{a(l)}N_s x + \frac{1}{4}\rho(1 - \rho)\sigma_R^{a(l)}\sigma_a N_s^2 x^2 \quad [4.8]$$

Dicha ecuación se puede reescribir del siguiente modo

$$\Gamma = \sum_{i=0}^2 a_i x^i \quad [4.9]$$

Donde  $a_0 = \rho$ ,  $a_1 = 0.5\rho(1 - \rho)\mu_R^{all}$  y  $a_2 = 0.25\rho(1 - \rho)\mu_R^{all}\mu_{\lambda_{exc}}^{all}$ .

Para llegar hasta este punto, se han empleado los coeficientes de atenuación denominados como  $\mu_R^{all}$  y  $\mu_{\lambda_{exc}}^{all}$  referentes a las longitudes de onda Raman y de excitación que vienen dadas según  $\mu_R^{all} = \sigma_R^{a(l)}N_s$  y  $\mu_{\lambda_{exc}}^{all} = \sigma_{\lambda_{exc}}^{all}N_s$  respectivamente.

Como es bien sabido, el coeficiente de atenuación se expresa mediante  $\mu_R^{all} = \mu_a^{||} + \mu_s^{||}$ , siendo  $\mu_a^{||}$  y  $\mu_s^{||}$  los coeficientes de absorción y de dispersión paralelos respectivamente, dependientes de la longitud de onda Raman correspondiente. Para el caso de  $\mu_{\lambda_{exc}}^{all}$  se mantiene una expresión similar. Debido a las pequeñas diferencias existentes entre las longitudes de onda de las líneas Raman y la longitud de onda de excitación se puede afirmar que ambos coeficientes de dispersión son iguales, es decir,  $\mu_s(\lambda) \simeq \mu_s(\lambda_{exc})$ . Adicionalmente, la dispersión de la luz es el factor predominante a la hora de producirse la pérdida de la polarización inicial y por lo tanto también se asume que a una longitud de onda dada  $\mu_s^{||}(\lambda) = \mu_s^{\perp}(\lambda)$ .

La expresión [4.8] describe que el cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) aumenta si lo hacen tanto el coeficiente de absorción como el de dispersión. Por regla general, la validez de esta ecuación está restringida a muestras delgadas y siempre que  $x > x_{m\acute{a}x}$  donde  $x_{m\acute{a}x}$  representa el valor máximo para el cual la polarización inicial se pierde completamente, es decir  $\Gamma(x_{m\acute{a}x})$  es igual a 1.

Si se tiene en cuenta [4.8], se pueden dar dos situaciones: La primera de ellas con una muestra a un espesor dado en la que aumenta la concentración de partículas, y la segunda, una muestra a una concentración dada cuyo espesor aumenta. Estos dos escenarios han sido estudiados en los resultados presentados.

Debido a que en [4.8] existen 3 incógnitas (el coeficiente de absorción del láser, el coeficiente de absorción Raman a una longitud de onda dada y el coeficiente de

dispersión) se ha aprovechado el carácter resonante de la técnica de transmisión que se está utilizando y se han empleado como valores de siembra<sup>25</sup> los pertenecientes al coeficiente de absorción extraído del propio espectro de absorción del principal agente dispersor de luz, en este caso el  $\beta$ -caroteno cuya absorción resonante mejora la señal Raman Stokes.

Asimismo, la expresión [4.8] se puede emplear para estudiar la evolución temporal del cociente de despolarización a espesor constante. En muestras delgadas, dicha ecuación se puede reescribir empleando únicamente el término lineal del siguiente modo

$$\Gamma = \rho + 0.5\rho(1 - \rho)\mu_R^{\text{all}}x \quad [4.10]$$

Algunos autores<sup>26, 27</sup>, han observado que los coeficientes de atenuación (tanto de absorción como de dispersión), disminuyen en muestras de nectarinas con el aumento de la vida post-cosecha hasta alcanzar un valor constante tras el proceso de maduración, no obstante en otros frutos como tomates, por ejemplo, dicho comportamiento finaliza con un repunte del citado coeficiente<sup>28</sup>. Por ello, se puede suponer que existe un decaimiento exponencial del coeficiente  $\mu_R^{\text{all}}$  con el tiempo según

$$\mu_{(t)}^{\text{all}} = (\mu^0 - \mu^\infty)e^{-kt} + \mu^\infty \quad [4.11]$$

Por simplicidad no se muestran los superíndices paralelos, asimismo  $\mu^0$  y  $\mu^\infty$  hacen referencia al tiempo inicial ( $t = 0$  h) y final ( $t = \infty$  h) y  $k$  indica la tasa de decaimiento.

Introduciendo [4.10] en [4.11] y tras operar, la dependencia temporal de  $\Gamma$  queda descrita de la siguiente forma

$$\Gamma(t) = (\Gamma^0 - \Gamma^\infty)e^{-kt} + \Gamma^\infty \quad [4.12]$$

Donde  $\Gamma^0 = \rho + 0.5\rho(1 - \rho)\mu^0x$  siendo además  $\Gamma^\infty = \rho + 0.5\rho(1 - \rho)\mu^\infty x$ .

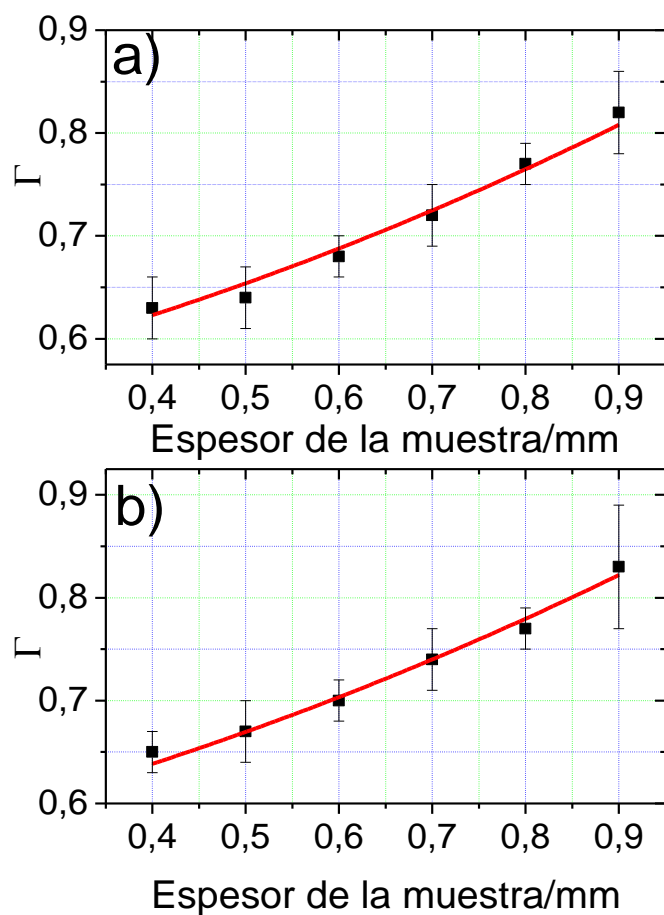
#### 4.3.2. Polarización a espesor variable a 180° en zanahoria

Con el modelo matemático desarrollado, se llevó a cabo un método de iteración para el ajuste de los datos experimentales alcanzados. Así, en la Figura 4.3 se representan los ajustes obtenidos para los cocientes de despolarización de las bandas  $\nu_1$  y  $\nu_2$ .

En dicha figura, se puede apreciar con claridad la variación del cociente de despolarización con el espesor entre 0.4 mm y 0.9 mm. En ambos casos la línea sólida

representa el mejor ajuste para los resultados experimentales llevado a cabo con el modelo presentado. La ecuación empleada para el ajuste fue la [4.8] antes descrita.

Es interesante apreciar la capacidad del modelo para ajustarse fielmente a los resultados experimentales.



**Figura 4.3:** a) Cociente de despolarización de la banda  $v_1$  del  $\beta$ -caroteno presente en muestras de zanahoria en función del espesor de la muestra. Puntos: Valores experimentales. Línea sólida: mejor ajuste empleando [4.8]. b) Misma representación para la banda  $v_2$ .

En la Tabla 4.3 se exponen los valores de los parámetros obtenidos tras el ajuste para los coeficientes indicados.

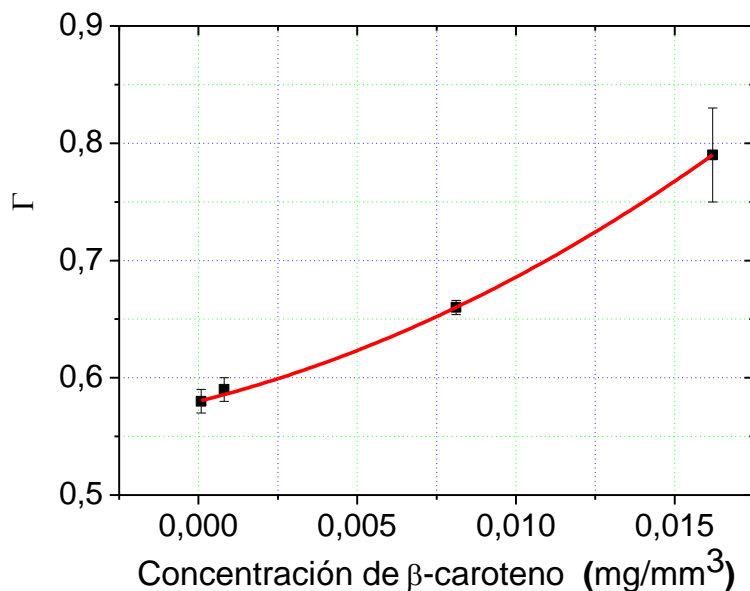
**Tabla 4.3:** Valores óptimos tras el ajuste del coeficiente de absorción y del coeficiente de dispersión empleando [4.8].

Muestra	Banda	$\mu_a^{\parallel} / \text{mm}^{-1}$	$\mu_s / \text{mm}^{-1}$
<b>Rodajas de zanahoria</b>	$\nu_1$	$0.20 \pm 0.01$	1.1
	$\nu_2$	$0.45 \pm 0.02$	1.0

#### 4.3.3. Polarización a espesor fijo a $180^\circ$

*Variación del cociente de despolarización en pastillas de patrón a diferentes concentraciones*

Procediendo del igual modo y teniendo en cuenta los resultados presentados en el capítulo anterior de los cocientes de despolarización en muestras de patrones, se llevó a cabo el mismo tipo de ajuste para los puntos experimentales. En la Figura 4.4 se puede ver, por tanto, la dependencia de dichos valores con la concentración así como una línea sólida que representa el mejor ajuste obtenido empleando la ecuación [4.8].



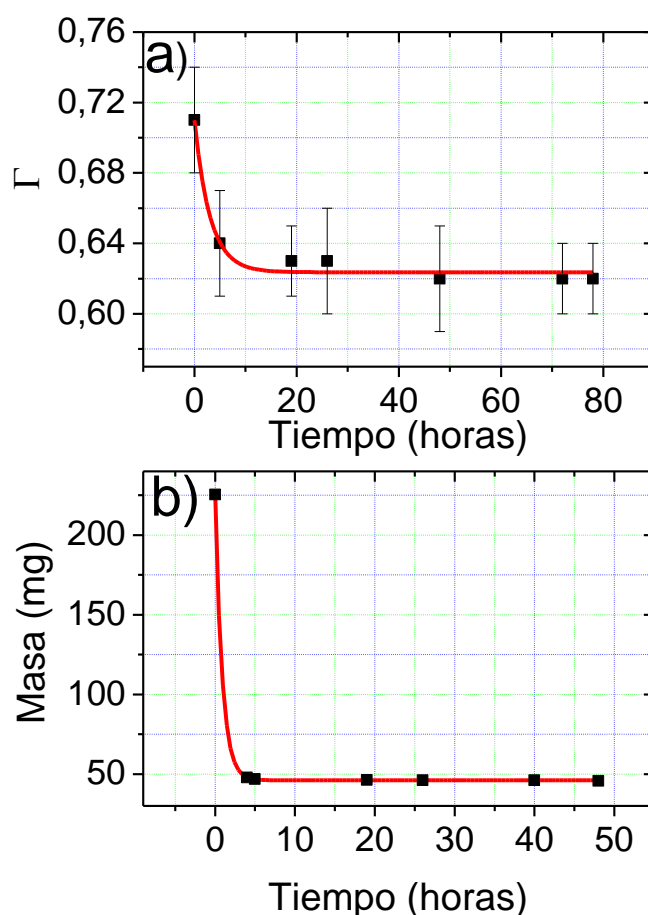
**Figura 4.4:** Cociente de despolarización de una pastilla de  $\beta$ -caroteno (KBr) de 0.2 mm de espesor en función de la concentración expresada en  $\text{mg}/\text{mm}^3$ . La masa total de la pastilla fue de 50 mg. **Puntos:** Resultados experimentales. **Línea sólida:** Mejor ajuste empleando

En principio el comportamiento es el que cabría esperar, es decir, similar al de las rodajas de zanahoria a espesor variable.

*Variación del cociente de despolarización en rodajas de mango con el tiempo*

Tal y como se ha presentado en el Capítulo 3 para completar las medidas anteriores, también se llevaron a cabo análisis a espesor constante con rodajas de mango para estudiar la evolución del cociente de despolarización de la banda  $\nu_1$  con el tiempo una vez que las rodajas de mango habían sido cortadas.

Los resultados obtenidos y su ajuste al modelo teórico desarrollado teniendo en cuenta la expresión [4.12] se presentan en la Figura 4.5 junto con los resultados asociados a la pérdida de masa en función del tiempo. Este efecto sobre la masa es consecuencia directa de (véase más adelante) la pérdida de agua y otras sustancias volátiles.



**Figura 4.5:** a) Cociente de despolarización de una muestra de mango de 0.7 mm de espesor en función del tiempo b) Evolución temporal de la masa de la misma rodaja de mango **Rojo:** ajuste a la función exponencial decadente [4.12].

Teniendo presente la figura, se puede visualizar una disminución en el cociente de despolarización hasta alcanzar un valor prácticamente constante en tiempos cercanos a

las 50 horas. El parámetro de ajuste obtenido mediante [4.12] tomó un valor de  $k_T = 0.33h^{-1}$ .

Con la finalidad de comparar los resultados con los de variación del cociente de despolarización, se representó la pérdida de masa de la rodaja de mango en función del tiempo ajustándose los datos a una función exponencial decadente obteniendo un coeficiente cuyo valor fue  $k_{evap} = 1.14h^{-1}$ .

A modo de resumen en la Tabla 4.4 se exponen y comparan los datos a espesor cero alcanzados a lo largo de estos experimentos gracias a los ajustes, con algunos valores bibliográficos presentados por otros investigadores<sup>29</sup> en estudios similares.

**Tabla 4.4:** Valores óptimos de los cocientes de despolarización obtenidos empleando [4.8] para el ajuste en distintas muestras y su comparación con los resultados observados en la bibliografía.

<b>Muestra</b>	<b>Banda</b>	<b><math>\rho</math></b>	<b>Referencia</b>
<b>Rodajas de zanahoria</b>	$v_1$	0.52	Referencia 29
	$v_2$	0.58	Referencia 29
<b>Disolución en acetoniitrilo</b>	$v_1$	0.22	Referencia 29
<b>Rodajas de zanahoria</b>	$v_1$	0.53	Presente trabajo
	$v_2$	0.54	Presente trabajo
<b>Estándar de <math>\beta</math>-caroteno en KBr</b>	$v_1$	0.55	Presente trabajo
<b>Rodajas de Mango</b>	$v_1$	0.66	Presente trabajo

*Comentarios e interpretación de los datos experimentales*

Como se ha dejado entrever, algunos grupos de investigación<sup>29</sup> llevaron a cabo medidas de cocientes de despolarización del  $\beta$ -caroteno tanto en matrices de zanahorias como en disoluciones líquidas de acetonitrilo empleando una geometría a  $90^\circ$  y un láser de argón de 514 nm de longitud de onda. Lo primero que destaca, es la similitud existente entre los resultados de dicho estudio y los obtenidos en el presente trabajo, incluyendo los determinados para los patrones de  $\beta$ -caroteno en KBr a pesar del hecho de que en los de la referencia 29 se emplearon distintas geometrías experimentales, diversas longitudes de onda de láser y muestras de zanahoria con características diferentes a las empleadas para el estudio que se expone en esta Tesis Doctoral.

Es muy significativa la diferencia encontrada por dichos autores si se compara el caso de los cocientes de despolarización hallados en matrices de zanahoria (0.5) con los obtenidos en las muestras disueltas en acetonitrilo (0.22). Este comportamiento fue racionalizado en base a la diferente naturaleza de las fases en las que se encontraban las muestras. Cuando éstas se presentan en disolución, las moléculas pueden rotar en el seno del disolvente; este hecho, dificultaría su alineamiento u orientación molecular y por lo tanto se puede describir como una muestra con moléculas distribuidas al azar. Sin embargo, en el caso del  $\beta$ -caroteno impregnado en la matriz biológica cabe esperar cierto alineamiento molecular.

Si se tiene en cuenta el mayor valor de cocientes de despolarización a espesor cero en el trabajo que sirve de referencia<sup>29</sup>, éste se corresponde con el de las muestras de zanahoria (0.52), ya que el obtenido para las disoluciones en acetonitrilo es significativamente inferior (0.22). Este hecho, se puede explicar, tal y como se discute en el Apéndice I.b, teniendo en cuenta que la ecuación más comúnmente empleada<sup>30</sup> para los cálculos de cocientes de despolarización (véase ecuación [A.4] del apéndice), no es válida en este caso, ya que generalmente, la orientación molecular de un sistema viene dada por su función de distribución de orientación  $N(\theta)$  que a su vez está determinada por la expansión de los polinomios de Legendre y como consecuencia siempre que  $\langle P_4 \rangle$  no sea nulo este coeficiente aumentará.

De hecho, mientras que el espectro Raman de líquidos isotrópicos depende de  $\langle P_2 \rangle$ , los pertenecientes a muestras ordenadas, como los que aquí se exponen, también poseen

una fuerte dependencia de  $\langle P_4 \rangle$  además de la ya existente de  $\langle P_2 \rangle$ . Dicha dependencia es la responsable de los mayores valores de  $\rho$  en este tipo de muestras.

Por ello, tal y como cabe esperar, el cociente de despolarización a espesor distinto de cero ( $\Gamma$ ), aumenta si lo hace el grosor de la muestra. En el caso de las zanahorias estos cocientes varían desde 0.62 hasta 0.82 mientras que el espesor lo hace de 0.4 mm a 0.9 mm. Adicionalmente, la configuración de transmisión de la técnica empleada garantiza de manera manifiesta que los fotones dispersados a bajos ángulos mantengan su estado de polarización inicial, mientras que los fotones dispersados a ángulos mayores, sufren diversos efectos que destruyen su estado de polarización inicial.

Por lo tanto, se puede esperar que cuando el espesor óptico  $\tau$  ( $\tau = \mu_s \cdot x$ ; siendo  $\mu_s$  el coeficiente de dispersión y  $x$  el espesor físico de la muestra) aumente, la fracción de fotones que mantienen la polarización inicial se vaya reduciendo gradualmente hasta que quede completamente distribuida al azar de tal manera que en el límite, el cociente de despolarización será 1 y el grado de polarización  $P$  que viene dado por la expresión  $P = (1 - \rho) / (1 + \rho)$  tomará el valor de 0. Este hecho, además ya ha sido demostrado por estudios tanto teóricos como experimentales<sup>31-33</sup>.

De esta manera, se manifiesta claramente la pérdida de la polarización inicial de la luz dispersada con el aumento del espesor, a pesar del alto valor de  $\rho$  asociado al cierto grado de alineamiento de la matriz sólida.

Los resultados del ajuste presentados en la Tabla 4.3, se han obtenido tras emplear como valores de siembra para los coeficientes de absorción, los alcanzados por otros autores<sup>25</sup> respecto a las longitudes de onda correspondientes a la excitación del láser de las líneas Raman Stokes. Los mejores resultados fueron  $(0.20 \pm 0.01) \text{ mm}^{-1}$  y  $(0.45 \pm 0.02) \text{ mm}^{-1}$  para las bandas  $\nu_1$  y  $\nu_2$  respectivamente.

A modo de comparación, se pueden tener en cuenta las investigaciones desarrolladas para el estudio de este mismo coeficiente en manzanas del tipo Golden Delicious<sup>34</sup> en el intervalo espectral 500-1000 nm empleando la técnica de imagen hiperespectral resuelta espacialmente. En dicho estudio, se obtuvo un valor para el coeficiente de absorción de  $0.25 \text{ mm}^{-1}$  a 500 nm, el cual fue asociado al hombro de absorción de los carotenoides presentes en este tipo de manzanas<sup>34</sup>. Como se puede apreciar, este valor es muy similar al obtenido en nuestro caso tras el ajuste del modelo que aquí se desarrolla.

Por otro lado, los valores de coeficientes de absorción obtenidos son consistentes con los esperados para la extinción molar del  $\beta$ -caroteno encontrados en la literatura<sup>25</sup> a esas dos longitudes de onda, es decir a 578.99 nm y 567.24 nm asociados a las bandas  $\nu_1$  y  $\nu_2$  respectivamente. Por tanto, al dividir las absortividades correspondientes a dichas bandas se obtiene un valor de 0.44, mientras que si se realiza el mismo cálculo en los coeficientes de absorción calculados se obtiene el mismo resultado. De hecho, tal y como se ha demostrado para espectroscopia Raman resonante del  $\beta$ -caroteno, la dependencia de la longitud de onda de la señal guarda una relación de proporcionalidad con el coeficiente de absorción molecular a la longitud de onda específica de excitación<sup>35</sup>. Por ello, no sorprende que los coeficientes Raman de absorción de las matrices de zanahoria mantengan la misma proporcionalidad que la del  $\beta$ -caroteno en vista de que dicho pigmento es el que predomina en el tejido vegetal.

Teniendo en cuenta los valores de coeficientes de dispersión, según la búsqueda realizada, no se han encontrado medidas directas de dichos parámetros para las matrices que se están investigando en esta tesis. Sin embargo, existen otros estudios en los que sí se ha analizado la influencia de las propiedades ópticas de la señal del Raman resonante del  $\beta$ -caroteno mediante medidas realizadas con un modelo físico (phantom) y simulaciones con el método Monte Carlo<sup>36,37</sup>.

Estas simulaciones teóricas demostraron de manera concluyente que la señal Raman es aproximadamente proporcional a  $1/\mu_a$  para los coeficientes de absorción en el intervalo  $0.1 - 4 \text{ mm}^{-1}$  mientras que la influencia de los coeficientes de dispersión se consideraron menos importantes.

Específicamente, el espectro Raman medido para la banda centrada en  $1524 \text{ cm}^{-1}$  de las medidas phantom es el realizado para una disolución de  $\beta$ -caroteno con un coeficiente de absorción de  $\mu_a = 0.2 \text{ mm}^{-1}$  reproducido con ese mismo valor para las simulaciones Monte Carlo<sup>36</sup> y empleando un valor para  $\mu_s$  de  $0.5 - 1.5 \text{ mm}^{-1}$ , es decir, un intervalo consistente con el valor obtenido en esta parte del trabajo de  $(1.1 \pm 0.1) \text{ mm}^{-1}$ .

En la Figura 4.5(a) se presentaban los valores experimentales obtenidos para la evolución del cociente de despolarización con respecto del tiempo  $\Gamma(t)$  en rodajas de mango de 0.7 mm de espesor (puntos sólidos de la figura) junto a su ajuste empleando [4.12] (línea sólida roja). En dicha figura, se puede apreciar con claridad una descripción satisfactoria de la evolución temporal mediante una función exponencial

decaiente característica de un proceso de primer orden de cuyo coeficiente de velocidad se puede extraer un tiempo de vida de  $\tau = 1/0.33 \text{ h}^{-1} \simeq 3.00 \text{ h}$ .

Si en este punto se asume que el coeficiente de atenuación general del mango es similar al de la zanahoria, mediante [4.10] se puede obtener un valor límite para  $\rho$  de 0.66, que es un poco mayor si se compara con el estimado para la zanahoria.

En la parte b de la Figura 4.5 también se muestra la evolución de la pérdida de masa debida a la evaporación observándose una similitud cualitativa con la variación de cociente de despolarización antes presentado. Sin embargo, el decaimiento es mayor para este proceso ya que  $k_{\text{evap}} = 1.14 \text{ h}^{-1}$  en comparación con el antes citado  $k_{\Gamma} = 0.33 \text{ h}^{-1}$ .

La diferencia existente entre ambas constantes podría deberse no sólo a la evaporación de parte del agua y sustancias volátiles presentes en la muestra, sino que también pueden producirse diversos procesos de oxidación que destruyan parte del carotenoide presente en la matriz mientras dicho proceso de evaporación tiene lugar.

#### 4.4. Modelo teórico para las intensidades Raman

Antes de profundizar en los resultados obtenidos, conviene recordar lo que se ha comentado en el capítulo anterior. En el caso de tomates, existen diversos estados para describir la etapa de maduración en la que se encuentran en función de su coloración denominados como: *green*, *breaker*, *turning*, *pink*, *light red* y *red*<sup>38</sup>.

##### *Intensidad Raman*

En esta sección, es necesario el desarrollo de un modelo teórico a partir de otro previamente desarrollado con el fin de extenderlo y estudiar de este modo el comportamiento post-cosecha de los tomates analizados<sup>7</sup>.

El punto de partida en este caso será la expresión 1 de la referencia 7. Dicha expresión describe la señal Raman a una longitud de onda y espesor dados  $I_R(\lambda, x)$  mediante la siguiente ecuación diferencial

$$dI_R(\lambda, x) = P(x)N_c\sigma_R(\lambda)dx \quad [4.13]$$

Donde  $P(x)$  es la densidad de potencia del láser a la distancia  $x$  que viene dada por

$$P(x) = P_0 e^{-(\mu_a + \mu_s)x} \quad [4.14]$$

Siendo  $P_0$  la densidad de potencia del láser incidente y  $\mu_a$  y  $\mu_s$  los coeficientes de absorción y de dispersión de la muestra respectivamente. En [4.13] además  $N_c$  representa la concentración de partículas de carotenoide y  $\sigma_R(\lambda)$  hace referencia a la sección eficaz de dispersión Raman a una longitud de onda dada.

Para muestras biológicas en general y para muestras de frutos en particular como las que aquí se estudian, el efecto de la dispersión predomina sobre el proceso de absorción, pudiéndose adoptar la siguiente aproximación<sup>39</sup>

$$\mu_a + \mu_s \simeq \mu_e \quad [4.15]$$

Por lo tanto, para el desarrollo del presente modelo, uno de los parámetros clave será el coeficiente de dispersión efectivo  $\mu_e$  junto a la sección de dispersión Raman.

Introduciendo [4.14] y [4.15] en [4.13] se tiene para  $I_R(\lambda, x)$  lo siguiente

$$dI_R(\lambda, x) = P_0 e^{-\mu_e x} N_c \sigma_R(\lambda) dx \quad [4.16]$$

Como en esta sección las medidas se han realizado en configuración de retrodispersión (backscattering), de ahora en adelante la intensidad de la señal será etiquetada como  $I_B$ , siendo necesario evaluar la intensidad de señal Raman que también viaja de vuelta hacia el canal de detección una distancia  $x$  desde la superficie de la muestra. De esta manera, la intensidad de señal diferencial de retrodispersión  $dI_B(\lambda, x)$  se atenúa por un factor adicional de  $e^{-\mu_e x}$ , es decir,  $dI_B(\lambda, x) = dI_R(\lambda, x)e^{-\mu_e x}$ . Como consecuencia se obtiene la expresión presentada a continuación

$$dI_B(\lambda, x) = P_0 e^{-2\mu_e x} N_c \sigma_R(\lambda) dx \quad [4.17]$$

En este punto la intensidad que ha sido etiquetada como  $I_B$  se puede obtener mediante integración definida de [4.17] desde  $x = 0$  hasta  $x = d$ , siendo  $d$  la profundidad de penetración del láser. Así, la ecuación obtenida tras los cálculos viene dada por

$$I_B(\lambda, d) = P_0 \frac{\sigma_R(\lambda) N_c}{2\mu_e} [1 - e^{-2\mu_e d}] \quad [4.18]$$

Que puede ser reescrita de la siguiente manera

$$I_B(\lambda, d) = P_0 \sigma_R(\lambda) [F(\mu_e d)] N_c / \mu_e \quad [4.19]$$

Siendo  $F(\mu_e d) = \left(\frac{1}{2}\right) [1 - e^{-2\mu_e d}]$

Recuérdese que [4.18] se ha obtenido para el caso en el que el detector está perfectamente colimado a  $180^\circ$ .

Considerando los datos alcanzados por otros autores<sup>40</sup>, la evolución temporal de la concentración de carotenoides que tiene lugar durante la maduración de los tomates se puede aproximar a una cinética de primer orden mediante la siguiente expresión



En la que CP y C representan la molécula de precursor del carotenoide y la de carotenoide generada en el proceso respectivamente, siendo k el coeficiente de velocidad. De acuerdo con lo mencionado, se puede escribir la ecuación diferencial en función de dicho coeficiente

$$-\frac{dN_{CP}}{dt} = \frac{dN_C}{dt} = kN_{CP} \quad [4.21]$$

Donde  $N_{CP}$  y  $N_C$  representan la concentración de precursor y la concentración de carotenoide respectivamente.

Mediante integración de [4.21] es posible obtener lo siguiente

$$N_{CP}(t) = N_{CP}(0)e^{-kt} \quad [4.22]$$

Si todo el precursor se convierte en carotenoide se tiene

$$N_C(t) = N_{CP}(0) - N_{CP}(t) \quad [4.23]$$

Y sustituyendo [4.22] en [4.23] se alcanza por tanto

$$N_C(t) = N_{CP}(0)[1 - e^{-kt}] = N_C^\infty[1 - e^{-kt}] \quad [4.24]$$

Donde se ha sustituido la concentración inicial de precursor, por la del valor asintótico de la concentración de carotenoide cuando  $t \rightarrow \infty$ , es decir,  $N_C^\infty$ .

En lo referente a las propiedades ópticas de determinados frutos, está descrito<sup>41</sup> que el coeficiente de dispersión se encuentra asociado con la estructura celular, con la densidad de la fruta y con tamaño de partícula. Los autores mencionados, investigaron las propiedades de dispersión de los tomates en el intervalo 700-900 nm encontrando que los coeficientes de dispersión del citado fruto mostraban un comportamiento

bimodal durante la maduración. Específicamente, mientras que el coeficiente de dispersión disminuye en los estados iniciales de maduración, es decir, desde *green* hasta *turning*, desde el estado *pink* hasta el *red* se muestra una conducta opuesta ya que en dichas fases sufre un aumento.

El comportamiento y evolución de los valores del coeficiente de dispersión se razonaron mediante una combinación de dos factores: el primero de ellos, tiene que ver con la despolimerización de las paredes celulares y la degradación de celulosa en los estados iniciales, que pueden favorecer a la disminución de dicho parámetro. Por el contrario, el segundo factor determinante en la variación tiene que ver con el incremento de la densidad de partículas originado por la producción de pequeñas fracciones de celulosa y pectinas solubles que pueden ser las responsables del crecimiento del mencionado coeficiente<sup>41, 42</sup>.

Basándonos en estos datos, se ha asumido que la evolución dependiente del tiempo del coeficiente de dispersión efectivo podría describirse mediante la siguiente expresión

$$\mu_e(t) = \mu_e \exp\left(\beta \left(\frac{t-t_{\min}}{t_{\min}}\right)^2\right) \quad [4.25]$$

Donde  $\mu_{\min}$  es el valor mínimo que alcanza el coeficiente de dispersión pudiendo expresarse según  $\mu_s(t = t_{\min}) = \mu_{\min}$ . Además, considerando [4.25] se puede afirmar que el parámetro  $\beta$  viene dado por  $\beta = \ln(\mu_0/\mu_{\min})$ , en donde  $\mu_0$  se corresponde con el valor inicial, y por lo tanto  $\mu_e(t = 0)$ . Consecuentemente, queda claro que un alto valor de  $\beta$  tendrá como principal implicación un gran cambio en el coeficiente de dispersión con el paso del tiempo.

En cuanto a la estimación de la profundidad de penetración de la luz láser en la muestra, es decir, el valor de  $d$ , es importante comentar que se describe normalmente como la distancia a la que viaja la luz, hasta que su intensidad se reduce en un factor de  $1/e$  y que habitualmente se estima como el valor recíproco del coeficiente efectivo de atenuación<sup>43</sup> donde  $d(t) = 1/\mu_e(t)$ . Sin embargo, existen otras aproximaciones donde la profundidad de penetración viene definida por fracciones de reducción de la luz diferentes<sup>39</sup>, como por ejemplo, el 1% en el caso de que  $d$  venga dada (empleando la ley de Lambert-Beer) mediante la relación  $d(t) = 4.61/\mu_e(t)$ . En el modelo que aquí se desarrolla, se ha adoptado la aproximación que considera que  $\mu_e(t)d(t) = z$  donde  $z$  es

una constante independiente del tiempo y como consecuencia de este hecho, la función  $F(\mu_e, d)$  también lo será.

Introduciendo [4.24] y [4.25] en [4.18] se alcanza la ecuación final para la señal Raman dependiente del tiempo que se muestra a continuación

$$I_B(\lambda, d) = A[1 - e^{-\ln 2t/\tau_{1/2}}]/\exp\left(\beta\left(\frac{t-t_{\min}}{t_{\min}}\right)^2\right) \quad [4.26]$$

Donde  $A$  es un factor independiente del tiempo que viene dado por la siguiente expresión

$$A = P_0 F(\mu_e d) \sigma_R(\lambda) N_C^\infty / \mu_{\min} \quad [4.27]$$

En [4.26],  $\tau_{1/2}$  hace referencia al tiempo en el cuál la concentración de carotenoide ha aumentado hasta la mitad de su valor asintótico, es decir,  $N_C(t = \tau_{1/2}) = N_C^\infty / 2$ .

Principalmente, la ecuación del modelo afirma que la evolución temporal de la señal Raman producida por los cambios dependientes del tiempo de un carotenoide dado se relaciona, por un lado con la concentración controlada por los parámetros  $N_C(t)$  y  $\tau_{1/2}$  y por el otro con la variación que se produce en las propiedades ópticas del fruto, es decir, las modificaciones en el coeficiente de dispersión efectivo a lo largo de su vida post-cosecha.

#### *Modelo teórico para los cocientes de despolarización*

En este punto, es muy interesante tener en cuenta la dependencia temporal del cociente de despolarización Raman para una banda dada. Como se ha demostrado con anterioridad existe una ecuación simple para este parámetro que ya ha sido descrita (véase [4.10]) que se puede reescribir de la siguiente manera

$$\Gamma = \rho + 0.5\rho(1 - \rho)\mu_e d \quad [4.28]$$

Donde si recordamos,  $\rho$  es el cociente de despolarización a espesor teórico 0, esto es, molecular. Si en este punto se inserta la relación antes mencionada de  $\mu_e d \cong z$  en [4.28] queda reducida a  $\Gamma = \rho + 0.5\rho(1 - \rho)z$ .

Esta expresión describe el cociente de despolarización de forma independiente al tiempo ya que la configuración experimental no implica un espesor de muestra preseleccionado (fijo). De hecho, el sistema experimental con el que se han realizado estas medidas, ni se trata de una configuración de transmisión, ni de una configuración típica a  $90^\circ$  donde el láser atraviese la totalidad de la matriz del fruto ya que, en este caso tanto la excitación como la colección de la señal se llevan a cabo en la misma zona de la piel.

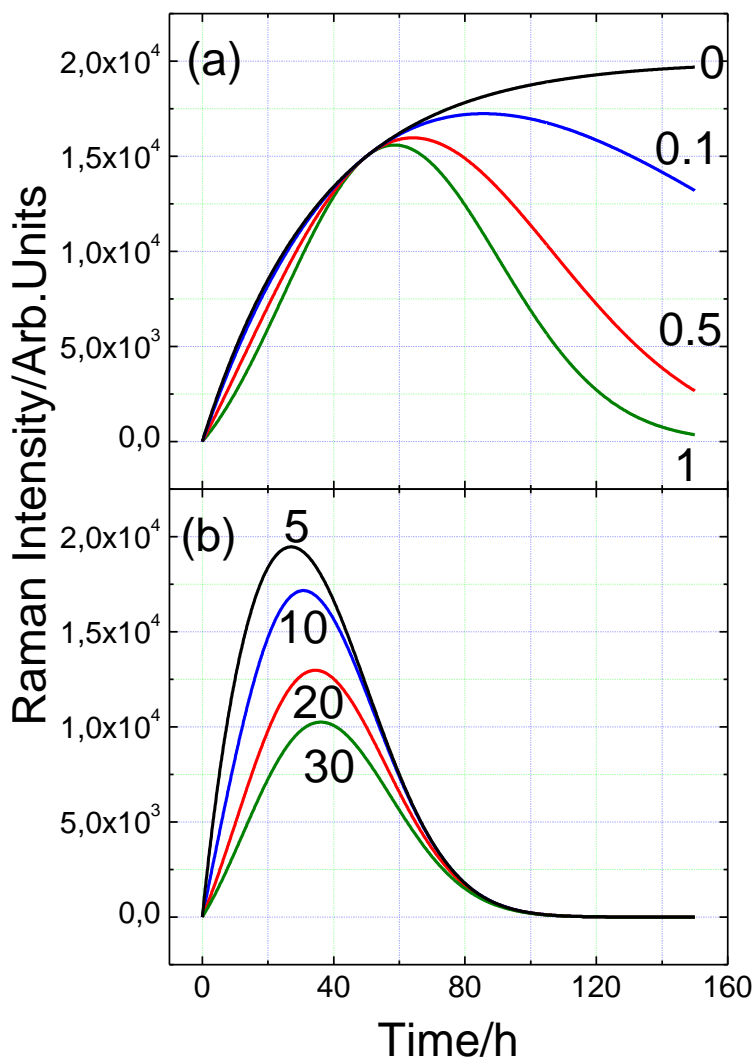
#### **4.5. Cálculos desarrollados aplicando el modelo**

Con la finalidad de ilustrar el sentido físico del modelo previamente descrito, la Figura 4.6 muestra una serie de modelizaciones llevadas a cabo con las consiguientes variaciones de la intensidad de señal Raman en función del tiempo empleando [4.26] a diferentes tiempos de vida medios,  $\tau_{1/2}$  y distintos valores del parámetro  $\beta$ .

El resto de parámetros vienen dados por  $A=20\ 000$ ,  $t_{\min}=50$  h y  $\tau_{1/2}=25$  h, que son, tal y como se explicará más adelante, valores típicos para este tipo de variables.

En la parte (a) de la figura, llama la atención que un valor elevado del parámetro  $\beta$ , implica una mayor variación del coeficiente de dispersión, lo que conlleva una caída más rápida de la señal Raman en la región que viene inmediatamente después del citado máximo, que a partir de este momento pasará a denominarse PTMP por sus siglas en inglés (Post-Turning Maturation Period).

Además, los resultados indican la aparición de un máximo absoluto, para todos los casos a excepción de aquel en el que el parámetro  $\beta$  toma el valor de 0. Por lo que se puede deducir que, a mayores valores de  $\beta$  menor será el PTMP y menor será la anchura a media altura FWHM, por sus siglas en inglés (Full Width Half Maximum) en la función Raman dependiente del tiempo.



**Figura 4.6:** Cálculos para el modelo presentado en función del tiempo. Se ha empleado [4.26] del texto: (a) Intensidad Raman, empleando diversos valores de  $\beta$ . Como se ha indicado el resto de valores de siembra han sido:  $A=20\,000$ ,  $\tau_{1/2}=25\text{h}$  y  $t_{\min}=50\text{h}$ . (b) Intensidad Raman descrita por el modelo empleando diferentes valores de  $\tau_{1/2}$  siendo los valores de siembra:  $A=20\,000$ ,  $\beta=0.5$ , y  $t_{\min} 50\text{h}$ .

En el caso límite donde  $\beta$  toma el valor de 0, se tendrá un tomate tipo, en el que lo único observable será el cambio de coloración debido al aumento de concentración de carotenoide, pero sin cambio alguno en la estructura celular, densidad de la fruta y/o tamaño de partícula. Un fruto inmaduro, independientemente de su coloración, que no sería adecuado para el consumo humano debido a su dureza y a su ausencia de sabor. Dicho de otra manera, cuando el parámetro  $\beta$  toma el valor de 0, se tiene un fruto que no experimenta ni degradación de tejidos post-cosecha ni por supuesto ablandamiento en la piel, siendo estas dos características fundamentales para la maduración.

Por otro lado, en la parte (b) de la misma figura se puede apreciar con claridad cómo en el caso en el que  $\tau_{1/2}$  presenta un valor mínimo, la señal Raman aumenta considerablemente y el máximo aparece a tiempos menores. Los parámetros de siembra para el ajuste han sido  $A=20\ 000$ ,  $\beta=0.5$  (con el fin de representar el caso intermedio) y  $t_{\min}=50$  h. Obsérvese, que cuanto menor es el tiempo  $\tau_{1/2}$ , es decir, cuanto más rápido se produce la síntesis de carotenoides, más intensidad alcanzan los picos Raman con un ligero desplazamiento tanto en el máximo como en el periodo de post-maduración hacia menores tiempos.

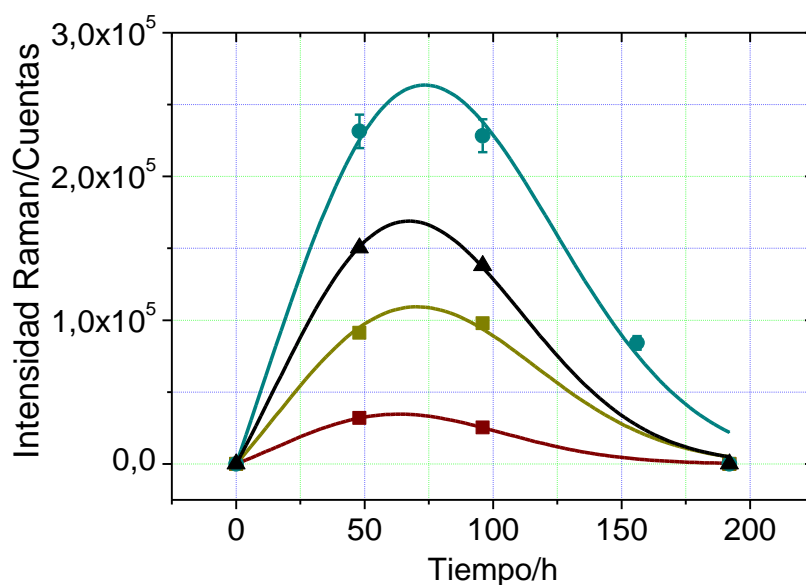
#### **4.6. Evolución de la intensidad de las bandas Raman durante la postcosecha de los frutos**

En el capítulo anterior se han presentado los resultados obtenidos para la variación de la señal Raman con el tiempo. En este punto, se ajustará el modelo a los resultados para obtener valores óptimos de los parámetros que se desean conocer.

Una de los aspectos más característicos en los datos presentados fue que, a pesar de tratarse de muestras diferentes y de distintas variedades de tomates con intensidades iniciales muy diferentes, el patrón de comportamiento era muy similar.

En la Figura 4.7 se muestran los valores experimentales ajustados al modelo teórico empleando [4.26]. Para construir esta figura, se han tomado los puntos experimentales presentados en la Figura 3.20 del capítulo anterior, desplazándose de manera que el punto a tiempo 0 se corresponda con el previo a la subida experimentada por la señal. Por otra parte, la distribución de los datos se ha ajustado a una línea base de tal manera que los puntos iniciales de cada tomate se corresponden con aquellos que tienen las coordenadas (0,0) con la finalidad de referir las cuentas al tiempo umbral en el que la señal Raman empieza a aumentar, es decir  $t = t_{th}$ .

Como ya se comentó en el capítulo anterior con respecto al tiempo inicial, en la Figura 3.20 se podía observar que después de aproximadamente 150 horas, todas las muestras de tomates cherry mostraban un aumento en concentración de carotenoides hasta un valor máximo. Este periodo de maduración, se identifica con la fase *turning*, ya descrita. Posteriormente, existe una etapa que se ha etiquetado como PTMP para diferenciarlo de la totalidad del proceso, que comprendería desde la etapa de inmadurez total *green* hasta la completa maduración *red*.



**Figura 4.7:** Intensidades de la banda  $\nu_1$ . El número de cuentas está referido al total de cuentas con respecto a  $t = t_{th}$  siendo  $t_{th}$  el tiempo en el que la señal Raman comienza a crecer. **Granate:** Rojo ovalado, **Amarillo:** Amarillo ovalado, **Negro:** Verde Ovalado, **Azul:** Naranja ovalado. **Puntos sólidos:** datos experimentales. **Líneas continuas:** ajuste realizado mediante [4.26].

Una vez que ha comenzado el aumento de señal en el antes citado PTMP, se alcanza un máximo absoluto sobre las 75 horas con respecto al tiempo umbral, y con el consiguiente post-máximo que decae hasta las casi 200 horas aproximadamente, es decir, unos 8 días después del comienzo de la subida, alcanzando prácticamente el mismo nivel de señal observado a tiempo cero.

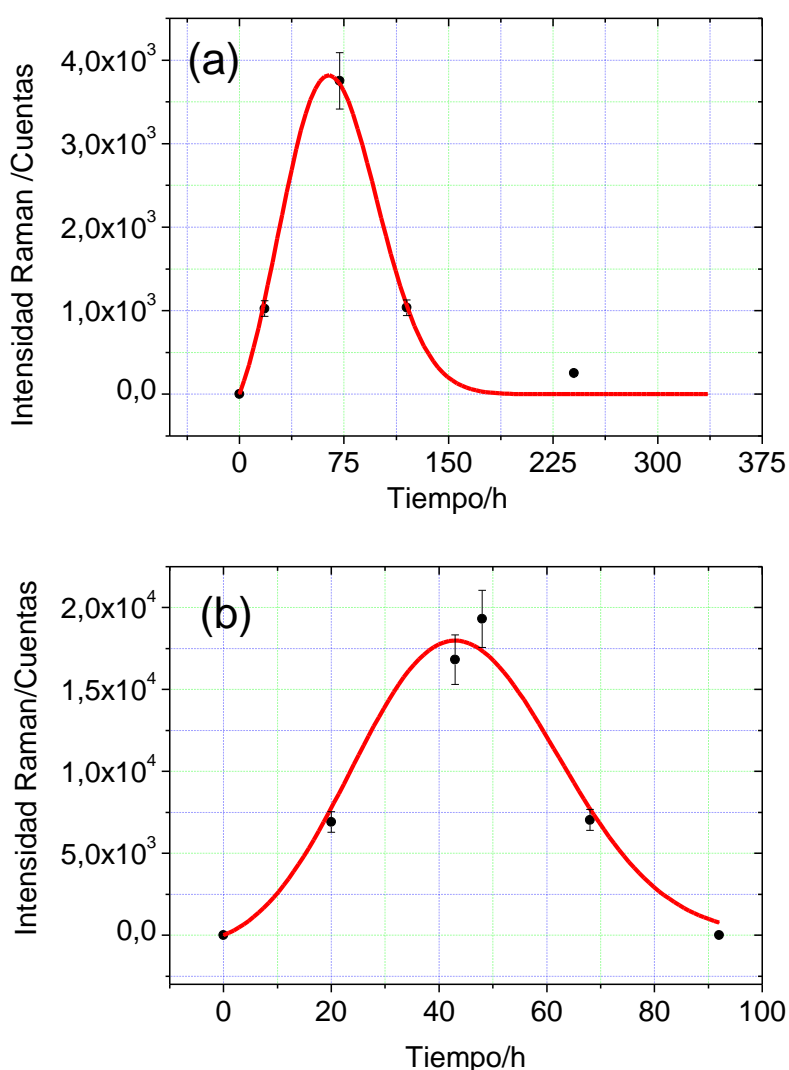
Por todo lo expuesto, se tiene que la región PTMP queda definida como la anchura a media altura, FWHM, de la función de la intensidad Raman dependiente del tiempo. Los puntos experimentales tenidos en cuenta son los comprendidos entre el tiempo umbral  $t_{th}$  y el tiempo final  $t_f$  donde la señal Raman decae a los valores iniciales.

Análogamente, en la Figura 4.8 se muestra la distribución temporal de señales Raman para dos tomates Rambo con el consiguiente ajuste al modelo teórico desarrollado.

Tal y como se puede deducir de la figura, la escala temporal ha sido ajustada de igual modo que se hizo en el caso de los tomates cherry, es decir, mediante el mismo procedimiento en lo que a las cuentas Raman respecta.

La tendencia general observada es la misma que la experimentada por los tomates tipo cherry, a excepción de los valores obtenidos para el parámetro que se ha denominado como factor de mejora del carotenoide, CEF por sus siglas en inglés (Carotenoid Enhancement Factor), definido como el cociente de la señal Raman en el máximo, con respecto a la señal al tiempo inicial ( $t = 0$ ) y exceptuando también los valores de  $t_{th}$ .

Se puede constatar como, al igual que sucedía en otros tipos de tomates, el modelo es capaz de reproducir fielmente el comportamiento de los datos experimentales, ya que gráficamente se observa una buena coincidencia entre ambos a pesar de tratarse de dos muestras en estados de maduración iniciales diferentes.



**Figura 4.8:** Intensidades de la banda  $\nu_1$  para dos tomates Rambo en distinto periodo inicial de maduración. **(a)** Tomate Rambo en la denominada fase *green*. **(b)** Tomate Rambo en la fase llamada *breaker*. El número de cuentas está referido al total de cuentas con respecto a  $t = t_{th}$ . **Puntos sólidos:** datos experimentales. **Línea roja:** ajuste realizado mediante [4.26].

En la Tabla 4.5 se muestran las principales características experimentales que ayudan a describir el PTMP. Éstas son, el factor de mejora del carotenoide, CEF ya definido, el propio valor de PTMP y el tiempo transcurrido desde que la fruta fue comprada hasta el inicio del aumento de concentración de carotenoide, es decir  $t_{th}$ .

**Tabla 4.5:** Valores experimentales de CEF,  $t_{th}$  y PTMP en distintos tipos de tomates.

<b>Tipo de Tomate</b>	<b>CEF</b>	<b><math>t_{th}</math> /h</b>	<b>PTMP /h</b>
<b>Rambo (Green)</b>	1.6	$170 \pm 6$	$39 \pm 5$
<b>Rambo (Turning- Breaker)</b>	3.8	$59 \pm 2$	$38 \pm 5$
<b>Cherry naranja ovalado</b>	1.9	$144 \pm 6$	$97 \pm 10$
<b>Cherry verde redondo</b>	2.5	$144 \pm 6$	$91 \pm 10$
<b>Cherry amarillo ovalado</b>	4.6	$144 \pm 6$	$112 \pm 10$
<b>Cherry rojo ovalado</b>	1.5	$144 \pm 6$	$90 \pm 10$

Se puede observar en la tabla que, el tiempo  $t_{th}$  es el mismo para todos los tomates cherry, lo que hace pensar que las primeras medidas han sido realizadas en el mismo estado inicial de maduración. Por el contrario, si se observa el tiempo  $t_{th}$  en los tomates Rambo, se constata que el denominado como *green* presenta un mayor valor que el etiquetado como *breaker* tal y como se podía intuir.

Por otra parte, el mayor factor de mejora de carotenoide se obtiene en el tomate denominado amarillo ovalado, siendo el siguiente en importancia el correspondiente al tomate cuyo estado inicial de maduración era *breaker*. A pesar de lo expuesto, el orden de magnitud es similar para todos ellos. Por último, de los valores de PTMP que se corresponden con el FWHM, se pueden extraer conclusiones acerca del tiempo de maduración, observándose que para el caso de los tomates cherry, el proceso es más lento que en el caso de los tomates Rambo.

El aumento de la señal Raman observado en todas las muestras justo después de la fase *turning* es consistente con las investigaciones de biosíntesis de carotenoides durante la maduración del tomate<sup>44</sup> y con los estudios llevados a cabo por otros grupos<sup>28</sup> que realizaron análisis de imagen Raman para detectar los cambios químicos asociados al licopeno durante su maduración. En los citados análisis quedaba descrito un rápido incremento (53 veces) del contenido de carotenoide con un significativo decrecimiento (10 veces) del contenido de xantofila durante el proceso.

De igual manera, en el mismo estudio<sup>28</sup> se reveló que el contenido en licopeno, en particular el correspondiente al pericarpio externo, únicamente manifestaba un ligero cambio de señal en los estados finales de la maduración en comparación con los observados en la fase *green*. Por lo tanto, se puede afirmar que los resultados obtenidos son consistentes y soportan el hecho de que el desarrollo de los carotenoides a lo largo de la maduración primero tiene lugar en el interior de los frutos para hacerse visibles posteriormente en el pericarpio externo (epicarpio). Del decaimiento de intensidades Raman pertenecientes al post-máximo y teniendo en cuenta el modelo presentado, se puede inferir que dicha bajada es debida a los cambios que tienen lugar en el coeficiente de dispersión y no como consecuencia de una disminución en el contenido de los carotenoides.

En la Tabla 4.6 se presentan los resultados obtenidos tras el ajuste empleando la expresión [4.26] descrita en el modelo.

**Tabla 4.6:** Valores óptimos para los parámetros de ajuste empleando [4.26].

<b>Tipo de Tomate</b>	<b>A (Cuentas)</b>	<b><math>\tau_{1/2}</math> /h</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>t_{\min}</math> /h</b>
<b>Rambo ("Green")</b>	4 500	22	1.3	58.1
<b>Rambo ("Turning- Breaker")</b>	186 270	28	1.6	37.5
<b>Cherry naranja ovalado</b>	306 374	22	0.6	58.5
<b>Cherry verde redondo</b>	196 329	22	0.6	56.4
<b>Cherry amarillo ovalado</b>	127 298	22	0.6	69.4
<b>Cherry rojo ovalado</b>	9 694	22	0.6	52.4

El primer aspecto digno de mención, tiene que ver con el ajuste de los puntos experimentales, que puede considerarse bastante satisfactorio en lo referente a muestras de tomates cherry empleando los mismos valores de  $\beta$  y  $\tau_{1/2}$ ; estos datos se corresponden con 0.6 y 22 h respectivamente. Asimismo, los resultados de  $t_{\min}$ , también presentan valores muy similares ya que cambian según  $52h < t_{\min} < 69h$ . Curiosamente, la mayor diferencia encontrada, tiene que ver con los resultados del parámetro A cuyo intervalo varía desde 9 600 cuentas hasta 307 000 cuentas.

En otras palabras, el análisis del modelo en lo que a los tomates cherry respecta, indica que la mayor variación entre los frutos no se relaciona, ni con el parámetro  $\beta$ , ni con el tiempo que indica la tasa de producción de carotenoide ( $\tau_{1/2}$ ) que se corresponde con un valor de 22 h para todos ellos. De todo esto, se puede extraer la conclusión de que la diferencia principal radica en el parámetro A, es decir, que la mayor disparidad pertenece a la concentración inicial de carotenoide.

Si se lleva a cabo una comparación de los tomates cherry con los de tipo Rambo, es interesante reparar en que la mayor diferencia se relaciona con los resultados observados para el parámetro  $\beta$ . Mientras que en el caso de los tomates cherry dicho valor es de 0.6 para todos ellos, en los tomates Rambo es aproximadamente 2 ó 3 veces mayor. En este punto, puede destacarse un hecho interesante que tiene que ver con la relación existente entre  $\beta$  y el valor de PTMP mostrado en la Tabla 4.5. Mientras que en el caso de los tomates Rambo, el promedio del valor del FWHM es de aproximadamente  $38.5 \pm 5$  h, en el caso de los tomates cherry el valor encontrado fue de  $97 \pm 15$  h. Dicho de otra manera, a pesar del diferente nivel de contenido de carotenoides, todos los tomates de tipo Rambo mostraron unos valores de PTMP ( $\beta$ ) de más del doble que los correspondientes a los tomates cherry.

En un estudio previo<sup>45, 46</sup> en el que se describen mediante modelos cinéticos y espectroscopia en el infrarrojo cercano tanto las enzimas degradadoras de pectinas y la pérdida de firmeza en tomates almacenados, se demostró que el nivel de enzimas presente en el tomate gobierna significativamente los cambios observados en la firmeza del fruto. Además, estos autores encontraron que la actividad enzimática asociada a la pectin metil esterasa (PMS) disminuía exponencialmente, es decir, seguía un decaimiento simple de primer orden con respecto al tiempo durante el periodo de almacenamiento de los tomates.

Debido a que la PMS juega un papel crucial en el proceso de reblandecimiento de los tejidos, es bastante probable que su actividad disminuya en el periodo de post-cosecha, produciendo como principal consecuencia el ablandamiento del fruto con el consiguiente aumento del coeficiente de dispersión, favoreciendo así el decaimiento posterior de la señal Raman, asociado al fenómeno de maduración.

Desde este punto de vista y dentro del marco del estudio espectroscópico y cinético que aquí se presenta, se puede sugerir que los menores valores de  $\beta$  en el caso de los tomates cherry, podrían estar íntimamente ligados a una menor tasa de decaimiento de la PMS si se comparan con los obtenidos para los tomates Rambo.

Este hecho, debe ser el punto de partida para un futuro trabajo que pueda correlacionar los datos químicos obtenidos mediante espectroscopia Raman no invasiva para aportar información complementaria acerca de la vida post cosecha para control de calidad.

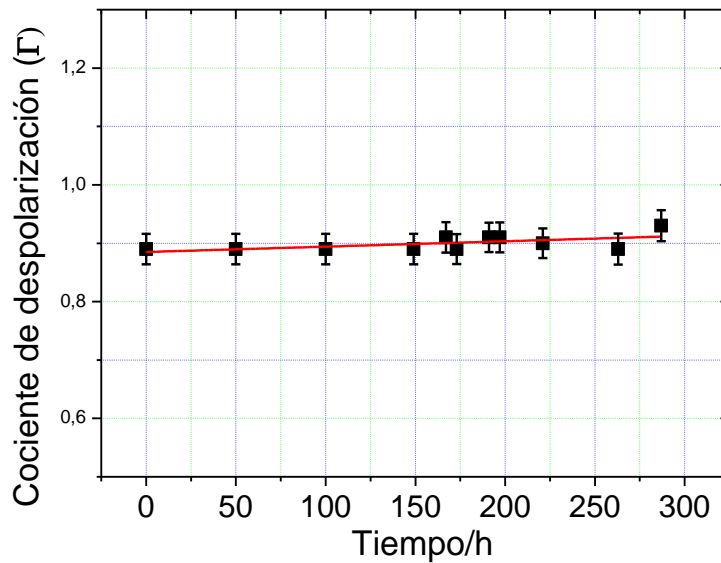
#### **4.7. Evolución de los cocientes de despolarización durante la postcosecha de los frutos**

En el capítulo anterior se han presentado algunos espectros en los que se ha calculado la evolución temporal del cociente de despolarización de la señal Raman perteneciente al modo vibracional  $\nu_1$  de los carotenoides presentes en muestras de tomates cherry rojo ovalado y Rambo en periodo de maduración inicial *turning*.

En dichos espectros se podían observar con claridad algunas de las señales más significativas ya comentadas para este tipo de muestras. Lo primero que se debe resaltar es que, para estas medidas, tal y como se ha podido vislumbrar a lo largo del capítulo anterior, se ha empleado el sistema experimental descrito en el Capítulo 2 representado en la Figura 2.10 b donde cada valor dado se corresponde con el promedio de cinco medidas por punto, siendo el error la desviación estándar.

En el capítulo anterior, únicamente se exponían los datos de los puntos o su dispersión con una línea que hacía más fácil la interpretación visual o las tablas de valores experimentales obtenidos, pero a continuación se expondrán esos mismos resultados ajustados a una línea recta, tanto para el caso de los tomates de tipo cherry, como para el análogo de los tomates Rambo.

En la Figura 4.9 se pueden observar los puntos experimentales para el cociente de despolarización con el tiempo de las muestras de tomate cherry.



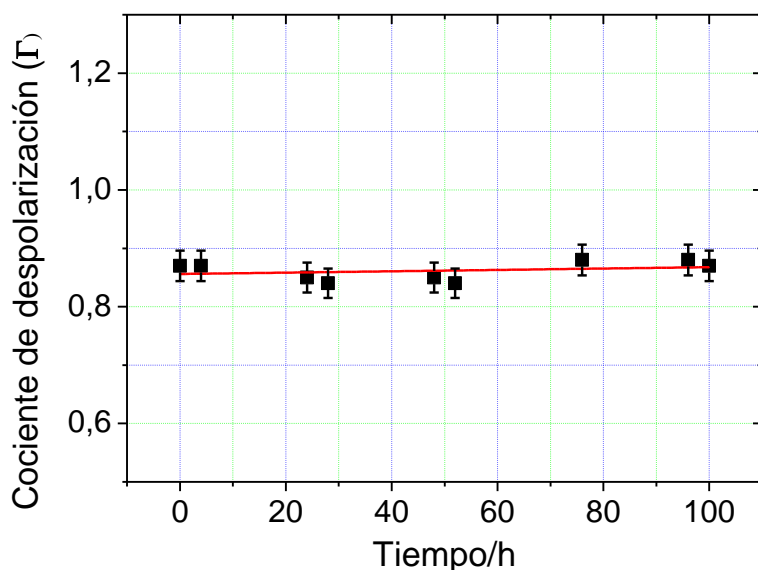
**Figura 4.9:** Evolución temporal de  $\Gamma$  para un tomate Cherry. **Puntos sólidos:** valores experimentales.

**Línea roja:** ajuste lineal.

La línea continua representa el ajuste lineal que posee una ordenada en el origen de  $0.86 \pm 0.01$  mientras que la pendiente toma un valor de  $(1.2 \pm 0.8) \times 10^{-5}$ . Este último resultado, indica que la variación de cociente de despolarización con el tiempo es prácticamente despreciable y por lo tanto la dependencia del producto  $\mu_e d$  también lo es.

En la Figura 4.10 se muestra el mismo tipo de representación que en el caso anterior, pero en esta ocasión para una muestra de tomate Rambo, donde se observa una conducta similar a la expuesta en el caso del cherry rojo ovalado antes presentada, en la que se manifiesta la independencia de  $\Gamma$  con respecto al tiempo.

Por otra parte, el ajuste lineal descrito por la línea roja sólida presenta una ordenada en el origen de  $0.88 \pm 0.01$  mientras que, en este caso, la pendiente toma valores despreciables de  $(9 \pm 1) \times 10^{-5}$ .



**Figura 4.10:** Evolución temporal de  $\Gamma$  para un tomate Rambo. **Puntos sólidos:** valores experimentales. **Línea roja:** ajuste lineal.

Teniendo en cuenta el resultado cercano a 0 de las pendientes de las funciones  $\Gamma(t)$ , se puede llevar a cabo la siguiente aproximación en referencia a los cocientes de despolarización independientes del tiempo

$$0.86 = \Gamma = \rho + 0.5\rho(1 - \rho)\mu_e d \quad [4.29]$$

Así, siempre que se conozca el producto  $\mu_e d$  se puede obtener el valor de  $\rho$  o viceversa. En la Tabla 4.4 de este mismo capítulo, se determinó el valor de  $\rho$  midiendo los cocientes de despolarización de la banda  $\nu_1$  del  $\beta$ -caroteno, de muestras de zanahoria y de mangos, obteniendo unos valores de 0.53 y 0.66 respectivamente. De esta manera, tomando el valor promedio de ambos (0.6) se puede obtener un producto de  $\mu_e d \cong 2.2$  si se tiene en cuenta [4.29] para los tomates Rambo. Análogamente, para el caso de los tomates cherry el valor obtenido de ese mismo producto es  $\mu_e d \cong 2.2$ .

Los citados valores, sugieren que empleando esta aproximación, se puede definir mejor la profundidad de penetración de la luz, como aquella a la que la intensidad de la luz incidente se reduce un 10%. En otras palabras, para un láser de longitud de onda de 532 nm como el empleado para estos experimentos, y adoptando la ley de Lambert-Beer se puede escribir la siguiente relación  $\ln(1/10) = -\mu_e d$ , tal que,  $d = 2.3/\mu_e$ ,

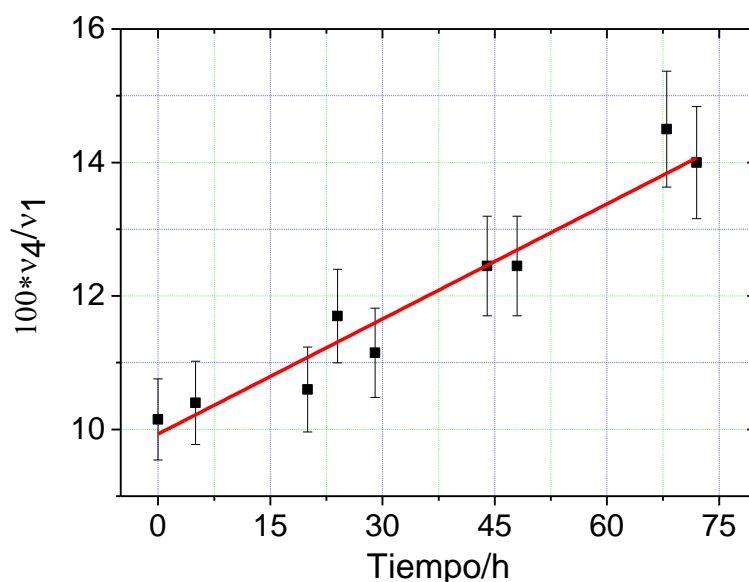
conduciendo esto, a unos valores de penetración de unos pocos milímetros para un coeficiente de dispersión típico<sup>39</sup> de 7 u 8cm<sup>-1</sup>.

Es necesario destacar que en un futuro, se llevarán a cabo medidas Raman de cocientes de despolarización a espesores fijos (predeterminados). De esta manera y mediante el empleo de la técnica Raman Resonante de transmisión, que será la más conveniente para dichas investigaciones, posiblemente se podrá dar una idea de la utilidad del cociente de despolarización en el proceso de maduración.

#### 4.8. Evolución del cociente $v_4/v_1$ con el tiempo

En el Capítulo 3, se presentaban los resultados obtenidos para el cociente  $v_4/v_1$  en un tomate Rambo mediante la Tabla 3.14, donde se podía observar la tendencia al alza de los puntos experimentales.

A continuación, en la Figura 4.11 se exponen los mismos valores, pero ajustados a una línea recta, donde el coeficiente de correlación lineal es 0.92, lo que hace pensar que existe una variación proporcional con el aumento de la señal correspondiente al modo  $v_4$  con respecto al  $v_1$ .



**Figura 4.11:** Evolución del cociente  $100 \cdot v_4/v_1$  en función del tiempo en una muestra de tomate Rambo.

**Puntos sólidos:** Puntos experimentales. **Línea roja:** Ajuste lineal.

Tal y como se ha expuesto periódicamente a lo largo de la presente memoria, la banda  $v_4$  está íntimamente ligada con las distorsiones moleculares fuera de la configuración

planar<sup>13-15</sup>. Además, el agua juega un papel crucial en la formación de dímeros favoreciendo la estabilidad de este tipo de compuestos<sup>23</sup>. Por lo tanto, no sorprende que con el paso del tiempo, mientras el proceso de maduración tiene lugar, las células se vayan degradando con la consiguiente liberación de agua, dicho enriquecimiento en agua de la matriz, no solo favorece el reblandecimiento de los tejidos, sino que también coopera con la interacción entre moléculas de carotenoides pudiendo formar estructuras más complejas que presentan distorsiones con respecto a la planaridad, aumentando significativamente el modo vibracional  $\nu_4$  con respecto al  $\nu_1$ . Dicho lo cual, con las pertinentes calibraciones, este parámetro podría dar una idea general del estado de salud de los frutos y de en qué condiciones se encuentra la estructura interna con la consiguiente evaluación de los mismos, aunque este hecho deberá soportarse con futuros experimentos.

#### 4.9. Referencias

1. Demtröder, W. (2008). Laser Spectroscopy Vol. 2. Experimental Techniques, Heidelberg, Germany: *Springer*. **Vol. 2**.
2. Premvardhan, L., Papagiannakis, E., Hiller, R.G., and van Grondelle, R. (2005). The Charge-Transfer Character of the  $S_0 \rightarrow S_2$  Transition in the Carotenoid Peridinin Is Revealed by Stark Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*. **109**: 15589-15597.
3. Frank, H.A., and Cogdell, R. J. (1993). Carotenoids in Photosynthesis. *Chapman and Hall. London*.
4. Withnall, R., Chowdhry, B. Z., Silver, J., Edwards, H. G. M., and de Oliveira L. F. C. (2003). Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim. Acta A*. **59**: 2207-2212.
5. Ehlers, F., Scholz, M., Schimpfhauser, J., Bienert, J., Oum, K., Lenzer, T. (2015). Collisional relaxation of apocarotenals: identifying the  $S^*$  state with vibrationally excited molecules in the ground electronic state  $S_0^*$ .
6. Hudson, B., and Kohler, B. (1973). Polyene spectroscopy: The lowest energy excited singlet state of diphenyloctatetraene and other linear polyenes. *J. Chem. Phys.* **59**: 4984-5002.
7. González, A.G. and González-Ureña A. (2012). Transmission resonance Raman spectroscopy: Experimental results versus theoretical model calculations. *Appl. Spectrosc.* **66**: 1163-1170.
8. Baranska, M., Schutze, W., and Schulz, H. (2006). Determination of Lycopene and  $\beta$ -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR and NIR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **78(24)**: 8456-8461.
9. Koyama, Y., Kito, M., Takii, T., Saiki, K., Tsukida, K. and Yamashita, J. (1982). Configuration of carotenoid in the reaction centers of photosynthetic bacteria. Comparison of the resonance Raman spectrum of the reaction center of *Rhodospseudomonas Sphaeroides* G-1C with those of *cis-trans* isomers of  $\beta$ -carotene. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*. **680(2)**: 109-118.
10. Merlin, J. C. (1985). Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure Appl. Chem.* **57(5)**: 785-795.

11. Darwin, M. E., Gersonde, I., Meinke, M., Sterry, W., and Lademann J. (2005). Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *J. Phys. D Appl. Phys.* **38**: 2696-2700.
12. Tschirner, N., Schenderlein, M., Brose, K., Schlodder, E., Mroginski, M. A., Hildebrandt, P., and Thomsen, C. (2008). Raman excitation profiles of  $\beta$ -carotene – novel insights into the nature of the  $\nu_1$ -band. *Phys. Stat. Sol. (b)*. **245(10)**: 2225-2228.
13. Gruszecki, W. I., Gospodarek, M., Grudziński, W., Mazur, R., Gieczewska, K. and Garstka, M. (2009). Light-induced Change of Configuration of the LHCII-Bound Xanthophyll (Tentatively Assigned to Violaxanthin): A Resonance Raman Study. *J. Phys. Chem.* **113(8)**: 2506-2512.
14. Lutz, M., Szponarski, W., Berger, G., Robert, B., and Neumann J. M. (1987). The stereoisomerism of bacterial, reaction-center-bound carotenoids revisited: An electronic absorption, resonance Raman and  $^1\text{H-NMR}$  study. *Biochem. Biophys. Acta-Bioenergetics*. **894(3)**: 423-433.
15. Ruban, A.V., Berera, R., Iliaia, C., van Stokkum, I. H. M., Kennis, J. T. M., Pascal, A. A., van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P., and van Grondelle, R. (2007). Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, **450**: 575-578.
16. Saito, S., and Tasumi, M. (1983). Normal-coordinate analysis of  $\beta$ -carotene isomers and assignments of the Raman and infrared bands. *J. Raman Spectrosc.* **14(5)**: 310-321.
17. Robert, B., Horton, P., Pascal, A. A., and Ruban A.V. (2004). Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins in vivo. *Trends Plant Sci.* **9**: 1360-1385.
18. Okamoto, H., Sekimoto, Y., and Tasumi, M. (1994). Assignment and anharmonicity analysis of overtone and combination bands observed in resonance Raman spectra of carotenoids. *Spectrochim. Acta A*. **50(8/9)**: 1467-1473.
19. Inagaki, F., Tasumi, M., and Miyazawa, T. (1974). Excitation Profile of the Resonance Raman Effect of  $\beta$ -Carotene. *J. Molec. Spectrosc.* **50**: 286-303.

20. Okamoto, H., Saito, S., Hamaguchi, H-O., Tasumi, M., and Eugster, C.H. (1984). Resonance Raman spectra and excitation profiles of tetrademethyl- $\beta$ -Carotene. *J. Raman Spectrosc.* **15(5)**: 331-335.
21. Atkins, P., and De Paula, J. (2006). Atkins' Physical Chemistry. *Oxford*. 8<sup>th</sup> Edition: 45.
22. Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H. and Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta.* **224(5)**: 1028-1037.
23. Adamkiewiicz, P., Sujak, A. and Gruszecki, W. I. (2013). Spectroscopy study on formation of aggregated structures by carotenoids: Role of water. *J. Mol. Struct.* **1046**: 44-51.
24. Raven, H. P., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. (2005). *Biology of plants*. (7th ed.). New York: WH Freeman and Company Publishers.
25. Du, H., Fuh, R. A., Li, J., Corkan, A. and Lindsey, J. S. (1998). PhotochemCAD: A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry. *Photochem. Photobiol.* **68(2)**: 141-142.
26. Tijskens, L. M. M., Zerbini, P. E., Schouten R. E., Vanoli M., Jacob S., Grassi M., Cubeddu, R., Spinelli, L. and Torricelli, A. (2007). Assessing harvest maturity in nectarines. *Postharvest Biol. Technol.*, **45(2)**: 204-213.
27. Torricelli, A., Spinelli, L., Contini, D., Vanoli, M., Rizzolo, A. and Zerbini, P. E. (2008). Time-resolved reflectance spectroscopy for non-destructive assessment of food quality. *Sens. Instrumen. Food Qual. Saf.* **2(2)**: 82-89.
28. Qin J., Chao K., and Kim M.S. (2011). Investigation of Raman chemical imaging for detection of lycopene changes in tomatoes during postharvest ripening. *J. Food Eng.* **107**: 277-288.
29. Abramczyk, H., Kolodziejski, M. and Waliszewska, G. (1999). Vibrational relaxation of  $\beta$ -carotene in acetonitrile solution and in carrot in situ. *J. Mol. Liq.* **79(3)**: 223-233.
30. Wilson, E.B., Decius, J.C. and de Cross, P. C. (1955). *Molecular Vibrations*. (McGraw-Hill), New York.

31. Jaques, S. L., Roman, J. R. and Lee, K. (2000). Imaging superficial tissues with polarized light. *Lasers Surg. Med.* **26(2)**: 119-129.
32. Wang, X., Wang, L. V., Sun, C. and Yang, C. (2003). Polarized light propagation through scattering media: time-resolved Monte Carlo simulation and experiments. *J. Biomed. Opt.* **8(4)**: 608-617.
33. Gosh, N., Pradham, A., Gupta, P.K., Gupta, S., Jaiswal, V. and Singh, R. P. (2004). Depolarization of light in a multiply scattering medium: effect of the refractive index of a scatterer. *Phys Rev. E.* **70**: 066607-1-066607-7.
34. Qin, J. and Lu, R. (2009). Monte Carlo simulation for quantification of light transport features in apples. *Comput. Electron. Agr.* **68(1)**: 44-51.
35. Hutley, M. C. and Jacobs, D. J. (1970). Some measurements of the resonance Raman effect in  $\beta$ -carotene. *Chem. Phys. Lett.* **6(4)**: 269-272.
36. Reble, C., Gersonde, I., Andree, S., Eicher, H.J. and Helfmann, J. (2010). Quantitative Raman spectroscopy in turbid media. *J. Biomed. Opt.* **15(3)**: 0.7016 1-8.
37. Reble, C., Gersonde, I., Helfmann, J., Andree, S. and Illing, G. (2009). Correction of Raman signals for tissue optical properties. *Proc. SPIE, Clin. Biom. Spec.* **7368**: 73680C-1-73680C-11.
38. USA Agriculture Marketing Service (AMS). United States standards for grades of fresh tomatoes. [http://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato\\_Standard%5B1%5D.pdf](http://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato_Standard%5B1%5D.pdf). Última consulta 18/07/2017.
39. Qin, J. and Lu, R. (2008). Measurement of the optical properties of fruits and vegetables using spatially resolved hyperspectral diffuse reflectance imaging technique. *Postharvest Biol. Technol.* **49(3)**: 355-365.
40. Qin, J., Chao, K. and Kim, M. S. (2012). Nondestructive evaluation of internal maturity of tomatoes using spatially offset Raman spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* **71**: 21-31.

41. Zhu, Q., He, C., Lu, R., Mendoza, F. A., Cen, H. (2015). Ripeness evaluation of “Sun Bright” tomato using optical absorption and scattering properties. *Postharvest Biol. Technol.* **103**:27-34. 2015.
42. De Veau, E. J. I., Gross, K. C., Huber, D. J., and Watada, A.E. (1993). Degradation and solubilization of pectin by  $\beta$ -galactosidases purified from avocado mesocarp. *Physiol. Plant.* **87**: 279-285.
43. Wilson, B. C., and Jacques, S. L. (1990). Optical reflectance and transmittance of tissues: Principles and applications. *IEE J. Quant. Electron.* **26**: 2186-2199.
44. Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., and Bramley, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* **105**: 405-4013.
45. Van Dijk, C., Boeriu, C., Peter, F., Stolle-Smits, T., and Tijskens L. M. M. (2006). The firmness of stored tomatoes (cv. *Tradiro*). 1. Kinetic and near infrared models to describe firmness and moisture loss. *J. Food Eng.* **77**: 575-584.
46. Van Dijk, C., Boeriu C., Peter, F., Stolle-Smits, T., and Tijskens, L. M. M. (2006). The firmness of stored tomatoes (cv. *Tradiro*). 2. Kinetic and near infrared models to describe firmness and moisture loss. *J. Food Eng.* **77**: 585-593.

**5. RESULTADOS**

**EXPERIMENTALES II:**

**Degradación térmica de**

**carotenoides**



## 5. RESULTADOS EXPERIMENTALES II: Degradación térmica de carotenoides

El trabajo que se expone a lo largo de los Capítulos 5 y 6, ha sido realizado en la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Coímbra (Portugal), en la Unidade de Investigaçã o e Desenvolvimento Química-Física Molecular de los Profesores Luís A. E. Batista de Carvalho y Maria Paula Marques mediante una estancia de investigación realizada en el año 2017.

En el presente capítulo, se detallarán los resultados experimentales más relevantes obtenidos en los estudios de degradación térmica a distintas temperaturas, llevados a cabo tanto en patrones de  $\beta$ -caroteno, como en extractos de licopeno seguidos por espectroscopia Raman y Espectroscopia Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR) mediante análisis a distintos tiempos de calentamiento. Adicionalmente, se presentarán los resultados alcanzados mediante cálculos computacionales aplicados a las moléculas simples de los carotenoides de interés y de los presumibles productos de degradación térmica del  $\beta$ -caroteno a través dos métodos diferentes, los ya expuestos en el Capítulo 2 *mPW1PW91* y  $\omega$ B97xD, ambos empleando la base de cálculo 6-31G\*.

### 5.1. $\beta$ -Caroteno

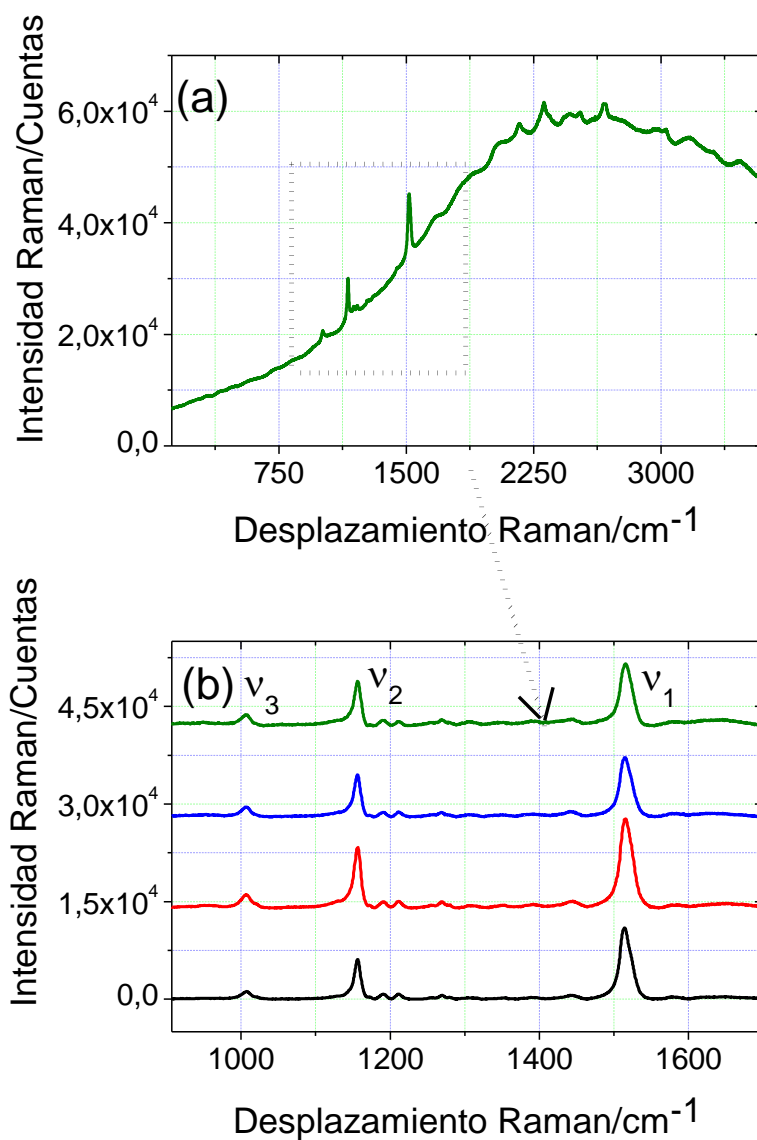
#### 5.1.1. Espectroscopia Raman Resonante a 514.5 nm

Para llevar a cabo las medidas de evolución temporal con la temperatura y tiempo de calentamiento mediante espectroscopia Raman, se empleó el sistema descrito en el apartado 2.6 del Capítulo 2 con una excitación de 514.5 nm correspondiente a la línea del  $\text{Ar}^+$  y un espectrómetro de triple monocromador Jobin-Yvon T64000 con una potencia en muestra menor o igual a 1 mW en todos los casos, promediando 10 adquisiciones de 15 segundos cada una.

En la Figura 5.1 se presenta la evolución temporal de los espectros Raman de  $\beta$ -caroteno calentado a 115°C durante varios tiempos. En dicha figura, se aprecian dos partes bien diferenciadas; en la parte a) se muestra el espectro de patrón de  $\beta$ -caroteno a  $t = 8$  h, donde se ve la curva de fluorescencia sobre la que destacan las señales Raman. Por otro lado, en la zona b) se exponen los espectros tomados a diferentes tiempos ( $t = 0$

h,  $t = 4$  h,  $t = 6$  h y  $t = 8$  h) en la zona de desplazamientos Raman de interés una vez aplicada la corrección de fluorescencia.

Como se ha descrito con anterioridad, todos los espectros han sido adquiridos en condiciones de resonancia a pesar de haber cambiado la longitud de onda de excitación.



**Figura 5.1:** (a) Espectro Raman Resonante a 514.5 nm de longitud de onda de  $\beta$ -caroteno obtenido tras 8 horas de calentamiento (b) Espectros Raman resonantes de la zona de interés punteada en (a) tras la corrección de la línea base. Los espectros han sido desplazados unos respecto de otros por claridad. A temperatura ambiente: **Negro:**  $t = 0$  h. y tras varios tiempos de calentamiento a  $115^\circ\text{C}$ : **Rojo:**  $t = 4$  h, **Azul:**  $t = 6$  h y **Verde:**  $t = 8$  h.

En la figura, destacan los modos resonantes más significativos tal y como viene exponiéndose repetidamente a lo largo de la memoria. De la figura además, se puede desprender a simple vista que existen pocas diferencias tras el tratamiento térmico en cuanto a variación de intensidad de las señales se refiere.

Sin embargo, a pesar de cambiar las condiciones experimentales, se puede afirmar que las señales son similares a las presentadas en condiciones de transmisión para el caso del  $\beta$ -caroteno cuando se empleaba un láser de 532 nm de longitud de onda y como consecuencia sus asignaciones, presentadas en la Tabla 5.1 son las mismas.

**Tabla 5.1:** Asignación de modos vibracionales en espectroscopia Raman con excitación de 514.5nm en una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno.

<b>Desplazamiento Raman e Intensidad</b> <b>/cm<sup>-1</sup></b>	<b>Asignación Vibracional</b>
1008 w	$\rho_{ip}(\text{CH}_3) \nu_3$
1157 s	$\nu_2(\text{C-C}) \nu_2$
1516 s	$\nu_1(\text{C=C}) \nu_1$

*Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\rho$ , balanceo; intensidades: s, fuerte; w, débil; contribuciones: ip, en el plano.*

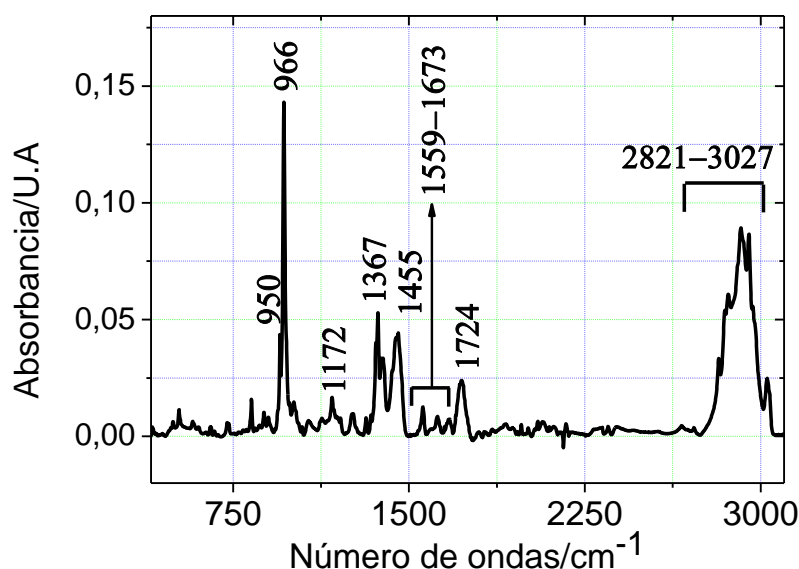
### 5.1.2. Estudio de la Degradación Térmica de $\beta$ -caroteno Mediante Espectroscopia Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR)

Debido a las escasas variaciones que presentan los espectros Raman como consecuencia de la degradación térmica, se optó por hacer un seguimiento mediante espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada (ATR-IR) ya que esta técnica permite analizar la muestra sin necesidad de realizar un tratamiento adicional que pueda modificarla. Para ello, se efectuaron medidas de las muestras a distintos tiempos de permanencia en el horno y repitiendo el proceso a distintas temperaturas, con el objetivo de localizar alguna variación característica asociada al proceso de descomposición y pudiendo evaluar así la cinética de degradación.

En la Figura 5.2 se presenta un espectro IR de un patrón de  $\beta$ -caroteno a tiempo 0, antes de someterlo a cualquier tipo de calentamiento con los correspondientes desplazamientos de las vibracionales más relevantes.

Es muy interesante hacer un comentario sobre la complementariedad existente entre la técnica Raman, y la IR, ya que el todo *trans*- $\beta$ -caroteno se puede aproximar a una molécula con centro de inversión del grupo  $C2h$  y por ello debe cumplir el principio de exclusión mutua de ambas espectroscopias donde según la bibliografía<sup>1, 2</sup> se clasifican las especies activas en Raman como  $a_g$  y las activas en IR como  $a_u$ .

Como se puede apreciar en la figura, llama la atención un pico muy prominente y agudo que se encuentra en torno a  $966\text{ cm}^{-1}$  dominando el espectro. Asimismo, aparecen otras señales muy características, todas ellas consistentes con otros estudios llevados a cabo por otros investigadores<sup>1, 3</sup>.



**Figura 5.2:** Espectro IR de patrón de  $\beta$ -caroteno con sus asignaciones correspondientes a  $t = 0\text{ h}$ .

Para realizar las asignaciones espectrales se han tenido en cuenta las presentadas por otros grupos de investigación en muestras similares<sup>1-5</sup>.

En la Tabla 5.2 se exponen las asignaciones de los modos vibracionales más significativos presentes en este tipo de muestras encontrados mediante espectroscopia infrarroja por reflectancia total atenuada (ATR-IR). Nótese, cómo algunos de ellos han sido asignados al mismo modo vibracional (tensión C-H). Esto sucede, porque al tratarse de una molécula relativamente grande extendida linealmente, los enlaces que vibran son los mismos aunque en diferentes zonas de la cadena hidrocarbonada.

Todos los espectros de infrarrojo que se van a mostrar, han sido adquiridos a las temperaturas y tiempos de horno que se muestran en los pies de figura. Adicionalmente, el sistema experimental cuenta con un flujo continuo de nitrógeno que evita la aparición de las bandas características del dióxido de carbono, tal y como se mencionó en el Capítulo 2. Finalmente, y a modo recordatorio, se puede señalar que dichos espectros han sido tratados con una línea base para aumentar la claridad de los mismos. Para todos ellos se realizaron 128 acumulaciones en las condiciones citadas en el Capítulo 2.

**Tabla 5.2:** Identificación de los modos vibracionales más significativos en espectroscopia infrarroja de una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno a  $t = 0$ .

Número de ondas e Intensidad /cm <sup>-1</sup>	Asignación
950 w	$\omega_{op}$ (C=C-H)
966 s	
1172 w	$\nu$ (C-C)
1367 m	$\delta_{sym}$ (CH <sub>3</sub> )
1455 m	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
1559 w	$\nu$ (C=C)
1621 w	
1673 w	$\nu$ (C=C-C)
1724 m	
2821 s	$\nu$ (C-H)
2860 s	
2949 s	
3027 s	

Vibraciones:  $\nu$ , tensión;  $\delta$ , tijereteo.  $\omega$ , flexión. Intensidades: s, fuerte; m, media; w, débil; contribución: op, fuera del plano; simetría: sym, simétrico.

Tal y como se aprecia en el espectro, alrededor de los  $3000\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las señales correspondientes a las tensiones de enlace de los grupos C-H<sup>4</sup>. Por otro lado, se pueden advertir los picos correspondientes a los C=C conjugados en el esqueleto molecular del  $\beta$ -caroteno, así como los C=C y pertenecientes a los anillos laterales; los números de ondas más bajos se corresponden con los dobles enlaces conjugados, siendo las señales de mayores números de ondas las relativas a los dobles enlaces presentes en los anillos laterales.

En la región de  $1367\text{ cm}^{-1}$ , destaca una banda de intensidad moderada asignada al tijereteo de los grupos metilo, y a  $1455\text{ cm}^{-1}$  se puede observar la misma vibración molecular, pero en este caso asociada a los grupos metileno<sup>5</sup>.

Todos los isómeros del  $\beta$ -caroteno, especialmente los *cis* cuando se detectan por espectroscopia IR, presentan dos señales muy características en torno a  $1680$  y  $1720\text{ cm}^{-1}$  que puede ser achacada a las tensiones C=C-C. Además, la relación de los picos encontrados a  $950$  y  $966\text{ cm}^{-1}$  asociados al 15-*cis*  $\beta$ -caroteno es mucho más cercana a 1 que en el caso del todo *trans*<sup>3</sup>, por lo que, en este caso, a pesar de contar en la mayoría de la composición en disposición todo *trans*- $\beta$ -caroteno, existe una cierta cantidad de reactivo que ha sufrido un proceso de isomerización. En comparación con las referencias citadas, en nuestro caso la contribución de las moléculas en disposición *cis* a la señal es muy débil, por lo que como se ha comentado, únicamente una pequeña parte de la muestra se encuentra en este estado<sup>3,6</sup>.

Las bandas Raman e infrarrojas encontradas en la región correspondiente a los números de ondas  $800$ - $1000\text{ cm}^{-1}$  provienen tanto de los movimientos de aleteo fuera del plano de los grupos C-H, como de las tensiones C-CH<sub>3</sub>. Las señales encontradas en infrarrojo cercanas a  $966$  (muy intensa) y  $950\text{ cm}^{-1}$  (intensa) también están asignadas a las vibraciones de aleteo fuera del plano de los C-H de las especies a<sub>u</sub>. Tal y como se ha demostrado por modelización molecular, para algunos de estos modos se espera que exista una mayor intensidad en infrarrojo que para otros<sup>1</sup>.

Por el contrario, para el mismo modo vibracional, que se encuentra en espectroscopia Raman en torno a  $965\text{ cm}^{-1}$  y a  $955\text{ cm}^{-1}$  puede asignarse a los movimientos de aleteo C-H fuera del plano de las especies a<sub>g</sub>. En estos modos, los dos átomos de hidrógeno que se encuentran entre los carbonos metilados, se mueven en la misma dirección sobre los enlaces C=C, y de acuerdo con las intensidades Raman intrínsecas, dichos modos deben

ser muy débiles<sup>1</sup>. Este hecho se encuentra en consonancia con los valores despreciables obtenidos en la Figura 5.1.

Finalmente, y a modo aclaratorio, se destaca de nuevo la señal más intensa presente en el espectro infrarrojo centrada en  $966\text{ cm}^{-1}$ , predominantemente asignada a la ya citada deformación fuera del plano de los enlaces C-H con respecto a la cadena del polieno, con menores contribuciones de los anillos de  $\beta$ -ionona. Esta vibración en fase tiene una fuerte contribución de átomos de hidrógeno (C=C-H) y grupos metilo (C-C-Me) dando lugar a un valor considerable del momento de transición perpendicular al plano molecular y originando señales de gran intensidad en el espectro IR<sup>2</sup>.

Según los estudios desarrollados por otros investigadores<sup>1</sup>, en los que se llevaron a cabo modelizaciones del esqueleto central del  $\beta$ -caroteno, y como se ha comentado en capítulos anteriores se llegó a la conclusión de que, en el caso de la espectroscopia Raman, esta banda aparecía únicamente cuando existen distorsiones de la configuración plana y por lo tanto con leves cambios en la simetría de la molécula alejándose de su geometría ideal  $C_{2h}$  por lo que, en ningún caso se incumple la regla de exclusión mutua en ambas espectroscopias.

A continuación, y de manera progresiva se presentará la superposición de espectros obtenidos para cada temperatura, indicándose el tiempo de permanencia en el horno (tiempo de calentamiento) con la consiguiente variación de las señales obtenidas.

#### *Temperatura 90°C*

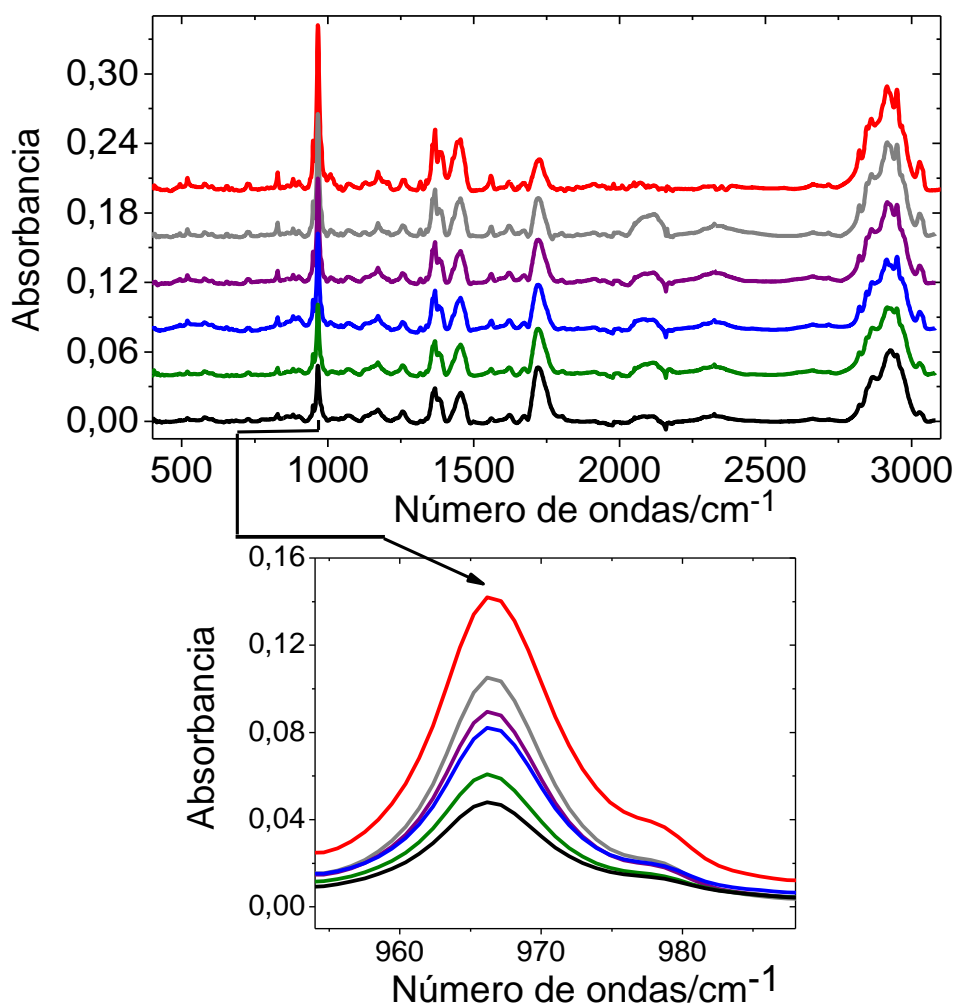
En la Figura 5.3 se presentan los espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno con tratamiento térmico a  $90^\circ\text{C}$  a diversos tiempos.

La figura se encuentra dividida en dos partes, en la parte superior se exponen los espectros completos adquiridos a cada tiempo, mientras que en la parte inferior se puede observar cómo varía la banda centrada en  $966\text{ cm}^{-1}$ .

En la zona objeto de análisis,  $955\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ , se puede percibir cómo el modo vibracional más intenso antes citado, va disminuyendo en magnitud con el paso del tiempo. Este hecho, se mantendrá para todas las temperaturas, aunque con diferente tasa y es el que servirá para estudiar los procesos cinéticos. Además, se puede verificar cómo en la zona de  $1719\text{ cm}^{-1}$ , existe un aumento progresivo en la intensidad que a tiempos finales acaba

dominando los espectros. Esta banda fue asignada al grupo carbonilo ya que su máximo se encuentra desplazado hacia menores números de ondas en comparación con la que fue asignada a tiempo cero a  $1724\text{ cm}^{-1}$ , hecho que se mantendrá para todos los experimentos.

En la Tabla 5.3 se presentan las áreas calculadas para el pico localizado a  $966\text{ cm}^{-1}$ . Como consecuencia directa de la disminución de la intensidad también se reduce su área tal y como cabía esperar ya que ésta está directamente relacionada con la absorbancia, a medida que varía el tiempo de permanencia en el horno.



**Figura 5.3:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente **rojo:**  $t = 0\text{ h}$  y tratada térmicamente a  $90^\circ\text{C}$  a distintos tiempos. **Gris:**  $t = 2\text{ h}$ ; **morado:**  $t = 3\text{ h}$ ; **azul:**  $t = 4\text{ h}$ ; **verde:**  $t = 6\text{ h}$  y **negro:**  $t = 8\text{ h}$ . Por claridad, los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros  $0.04$  unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base.

Al tratarse de una temperatura moderada, aún después de 8 horas de calentamiento, la muestra continúa teniendo cierta estructura apreciable a simple vista, a diferencia de lo que sucederá en otros espectros que se expondrán más adelante.

Tal y como se observa tanto en la parte inferior de la figura como en la Tabla 5.3 donde se presentan los valores de las áreas, este parámetro disminuye progresivamente mientras aumenta el tiempo de exposición en el horno, por lo que, la estructura de la molécula inicial va desapareciendo con el tratamiento térmico, mientras la señal asignada al grupo carbonilo ( $1719\text{ cm}^{-1}$ ) aumenta ostensiblemente hasta dominar los espectros a largos tiempos.

Como se trata de una vibración en fase, si la cadena sufre variaciones, la magnitud del movimiento va disminuyendo progresivamente, bien por sustitución de nuevos grupos funcionales (carbonilo) o bien por el mero hecho de que la cadena se rompe en alguna de sus partes acortando su longitud.

**Tabla 5.3:** Área del pico asignado como  $\omega_{\text{op}}$  (C=C-H) a temperatura ambiente  $t = 0$  h y tratado térmicamente a  $90^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos para una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno.

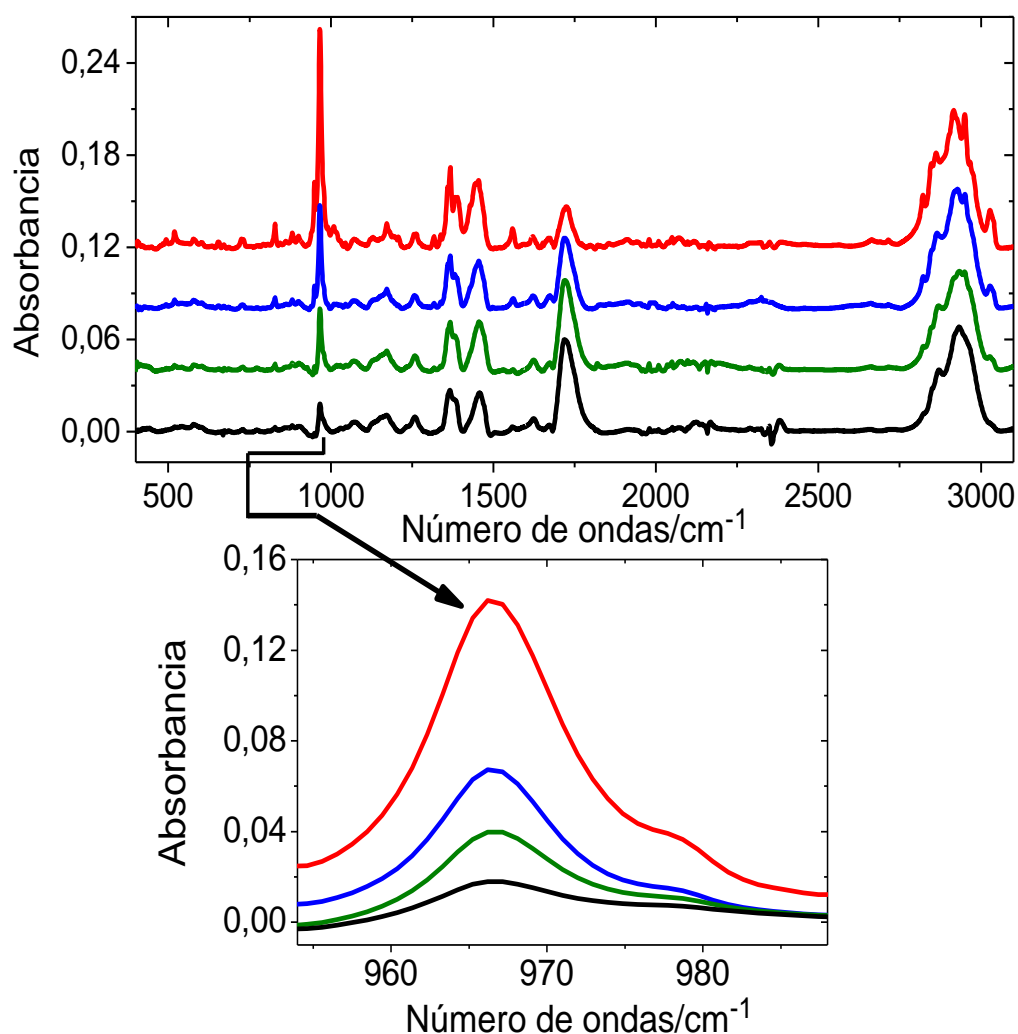
Tiempo en el horno /h	Área pico $966\text{ cm}^{-1} /(\text{cm}^{-1})$
0	$1.47 \pm 0.06$
2	$0.99 \pm 0.04$
3	$0.83 \pm 0.03$
4	$0.76 \pm 0.03$
6	$0.59 \pm 0.02$
8	$0.49 \pm 0.02$

#### *Temperatura $100^\circ\text{C}$*

En la Figura 5.4 se aprecian los espectros de infrarrojo de una muestra de patrón de  $\beta$ -caroteno con tratamiento térmico a  $100^\circ\text{C}$  a diversos tiempos.

Al igual que la anterior, y tal como sucederá en las siguientes, la figura se encuentra dividida en dos zonas, mostrándose todos los espectros a distintos tiempos en la parte superior y la zona de interés en la inferior.

Asimismo, se puede apreciar una variación significativa de las señales con el paso del tiempo como consecuencia directa del tratamiento térmico que sufre la muestra en el horno, lo que provoca la creación de nuevos productos cuyas señales en el infrarrojo son diferentes a las de la muestra sin tratar.



**Figura 5.4:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente **rojo:**  $t = 0$  h y tratada térmicamente a  $100^{\circ}\text{C}$  a distintos tiempos. **Azul:**  $t = 4$  h; **verde:**  $t = 6$  h y **negro:**  $t = 8$  h. Por claridad los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0,04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base.

A medida que aumenta el tiempo de tratamiento en el horno, los cambios van siendo más significativos, de modo que comparando el espectro adquirido a tiempo 0 con el obtenido a tiempo 8 horas se observan las mayores diferencias. Las más notables radican en la señal centrada en  $966\text{ cm}^{-1}$  (ampliada en la parte inferior) que va disminuyendo con el tiempo, así como la localizada en torno a  $1700\text{ cm}^{-1}$  que aumenta progresivamente con el tiempo.

La disminución antes citada del pico centrado a  $966\text{ cm}^{-1}$  hace que su área vaya reduciéndose a la par que la intensidad a medida que el calentamiento tiene lugar, aunque esta disminución es más abrupta si se compara con la observada a  $90^\circ\text{C}$  ya que existe una dependencia del proceso con la temperatura.

Al igual que se expuso para  $90^\circ\text{C}$ , en la Tabla 5.4 se presentan las áreas calculadas para el pico localizado a  $966\text{ cm}^{-1}$  donde se puede apreciar su variación a una temperatura de  $100^\circ\text{C}$ .

El área a tiempo 0, toma un valor de  $1.47\text{ cm}^{-1}$  y es igual para todas las muestras, ya que el carotenoide se encuentra en el mismo estado inicial en todos los experimentos.

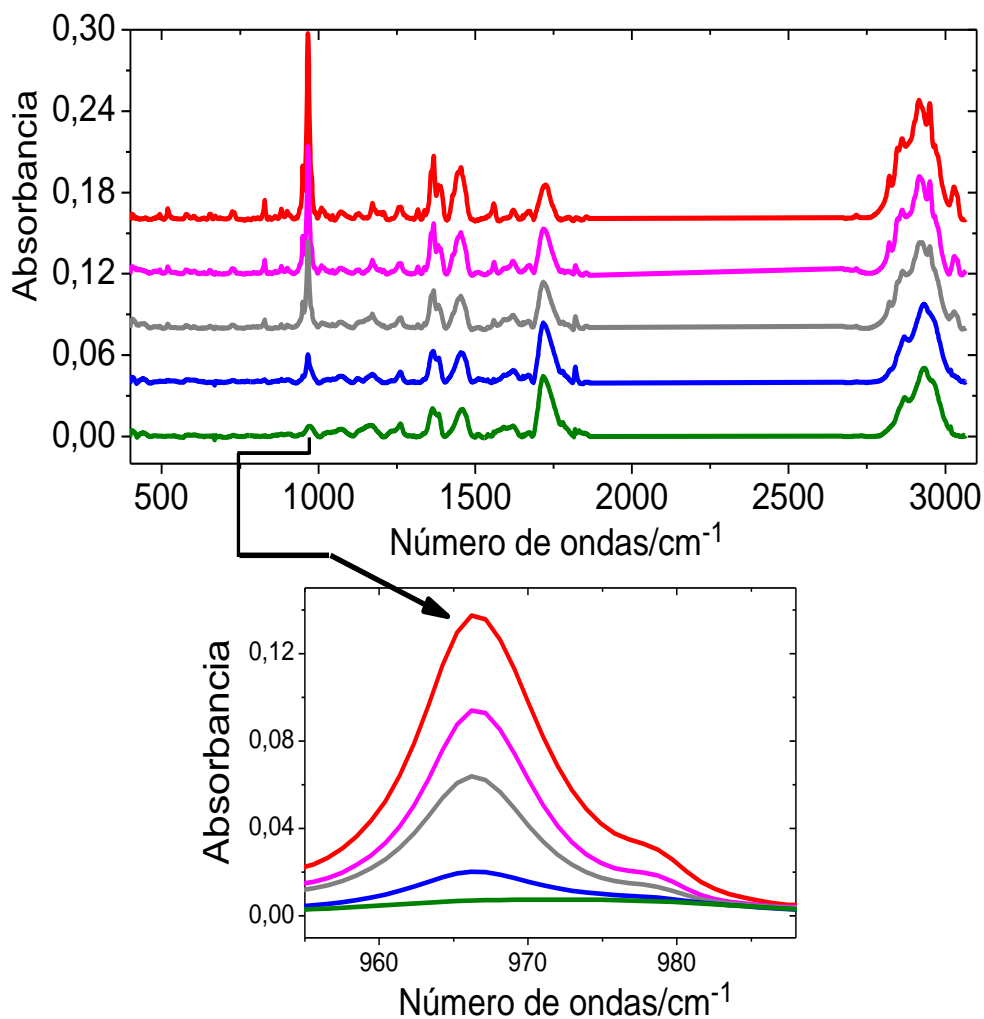
**Tabla 5.4:** Área del pico que ha sido asignado como  $\omega_{\text{op}}$  (C=C-H) a temperatura ambiente tratado térmicamente a  $100^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos para una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno.

Tiempo en el horno /h	Área pico $966\text{ cm}^{-1}$ /(cm <sup>-1</sup> )
0	$1.47 \pm 0.06$
4	$0.65 \pm 0.06$
6	$0.46 \pm 0.04$
8	$0.37 \pm 0.02$

Si se comparan las áreas obtenidas a tiempo similares con las de la temperatura anterior, se puede advertir cómo, en este caso son menores, este hecho, confirma que el proceso se está desarrollando con una velocidad diferente y que por lo tanto depende de la temperatura para llevarse a cabo con una tasa u otra.

*Temperatura 115°C*

En la Figura 5.5 se presentan los espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno con tratamiento térmico a 115°C a diversos tiempos. Esta temperatura tiene un valor intermedio entre la máxima y la mínima a las que se ha desarrollado el estudio, por lo que puede considerarse representativa de la descomposición térmica.



**Figura 5.5:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente rojo:  $t=0$  y varios tiempos tratada térmicamente a 115°C a distintos tiempos. **Rosa:**  $t = 1$  h; **gris:**  $t = 2$  h; **azul:**  $t = 4$  h y **verde:**  $t = 6$  h. Por claridad, los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0.04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base.

El comportamiento apreciado es análogo a los descritos hasta el momento, pudiendo observarse claramente la disminución de la señal a  $966\text{ cm}^{-1}$ . Merece la pena mencionar cómo, en este caso, donde la temperatura es más alta que las anteriores, una vez transcurridas 6 horas de tratamiento, la señal objeto de estudio ya ha disminuido

considerablemente, por ello, no tiene sentido continuar realizando análisis más allá de este tiempo.

En la zona del carbonilo, también se puede observar un aumento progresivo de señal. La muestra que ha permanecido en el horno durante más tiempo, es decir, la que se corresponde con 6 horas, es la que presenta una mayor intensidad en los números de ondas cercanos a  $1700\text{ cm}^{-1}$  llegando a dominar el espectro.

En la Tabla 5.5 se presentan las áreas calculadas para el pico centrado en  $966\text{ cm}^{-1}$  y su variación a una temperatura de  $115^\circ\text{C}$ . Como se puede advertir, la disminución de áreas es más abrupta en comparación con los casos anteriores debido al diferente tratamiento térmico que se le ha aplicado a la muestra.

**Tabla 5.5:** Área del pico que ha sido asignado como  $\omega_{\text{op}}$  (C=C-H) a temperatura ambiente  $t = 0\text{ h}$  y tratado térmicamente a  $115^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos para una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno.

Tiempo en el horno /h	Área pico $966\text{ cm}^{-1}$ /(cm <sup>-1</sup> )
0	$1.47 \pm 0.06$
1	$1.19 \pm 0.09$
2	$0.85 \pm 0.08$
4	$0.39 \pm 0.04$
6	$0.22 \pm 0.02$

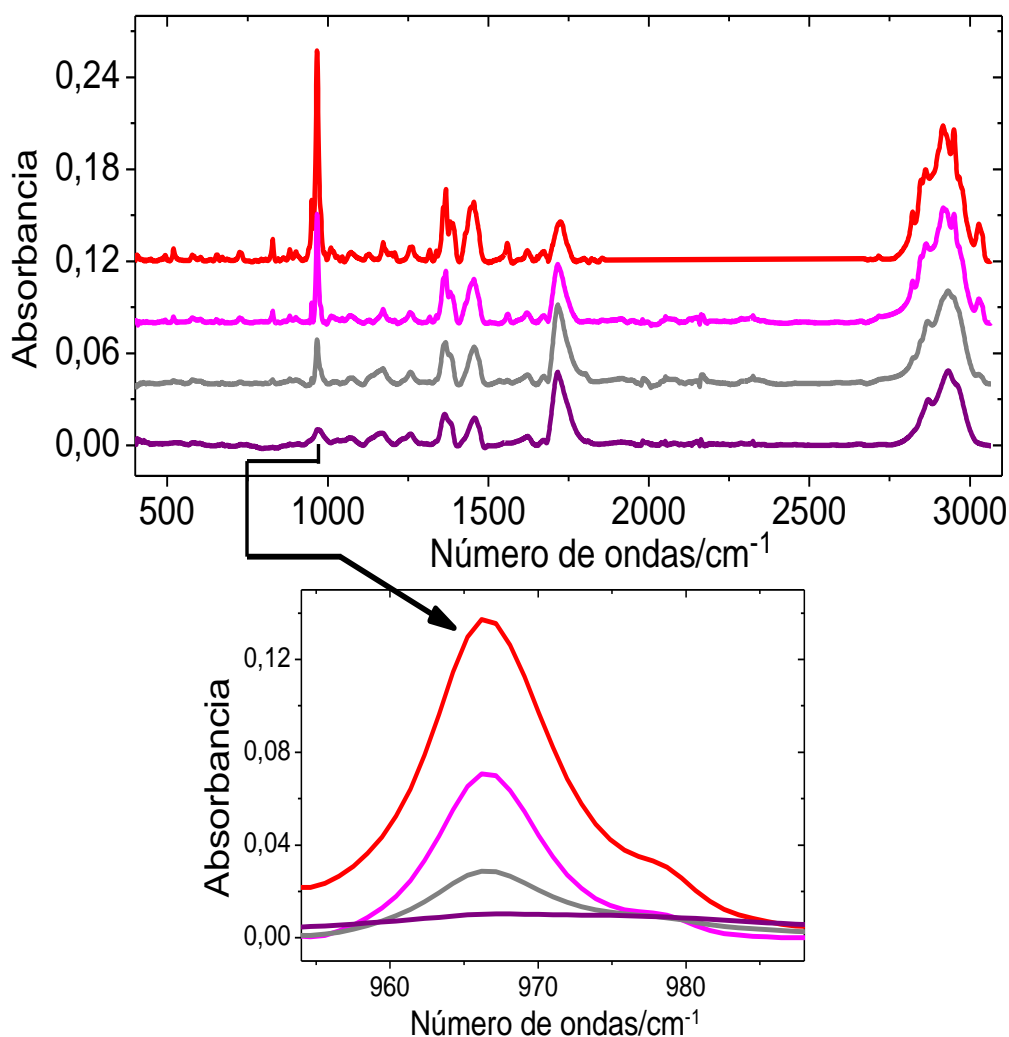
De la misma manera que en el caso anterior, y por el efecto ya comentado, el área a 6 horas de calentamiento en la zona de  $966\text{ cm}^{-1}$  es menor que las obtenidas a  $90^\circ\text{C}$  y  $115^\circ\text{C}$ . Por lo que, como cabía esperar, se confirma que el proceso transcurre con diferente tasa según la temperatura de tratamiento de muestra.

#### *Temperatura $130^\circ\text{C}$*

Finalmente, se estudió el comportamiento térmico a una temperatura de  $130^\circ\text{C}$  cuyos espectros se muestran a continuación a diferentes tiempos de calentamiento en la Figura 5.6.

En este caso, la disminución significativa se produce a un tiempo de 3 horas, es decir, debido a que nos encontramos ante la temperatura máxima del estudio, la reacción se

produce con una mayor velocidad, y como consecuencia a las 3 horas el pico objeto de estudio tiene una contribución prácticamente despreciable en el espectro. Al igual que sucedía en casos anteriores, a partir de este tiempo, no tiene sentido continuar con el proceso de medida.



**Figura 5.6:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente rojo:  $t = 0$  h y tratada térmicamente a  $130^{\circ}\text{C}$  a distintos tiempos. **Rosa:**  $t = 1$  h; **gris:**  $t = 2$  h y **morado:**  $t = 3$  h. Por claridad, los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0,04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base.

Por otro lado, y como viene siendo habitual, en la zona del carbonilo la señal aumenta de un modo muy abrupto, y ya a las 3 horas, la intensidad producida por dicho grupo funcional en el espectro, es considerablemente mayor que la encontrada al tiempo inicial, cuando la muestra no ha sido introducida en el horno.

En la Tabla 5.6 se enseñan las áreas calculadas para el pico centrado en  $966\text{ cm}^{-1}$  y su variación a una temperatura de  $130^\circ\text{C}$ .

**Tabla 5. 6:** Área del pico que ha sido asignado como  $\omega_{\text{op}}$  (C=C-H) a temperatura ambiente  $t = 0$  y tratado térmicamente a  $130^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos para una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno.

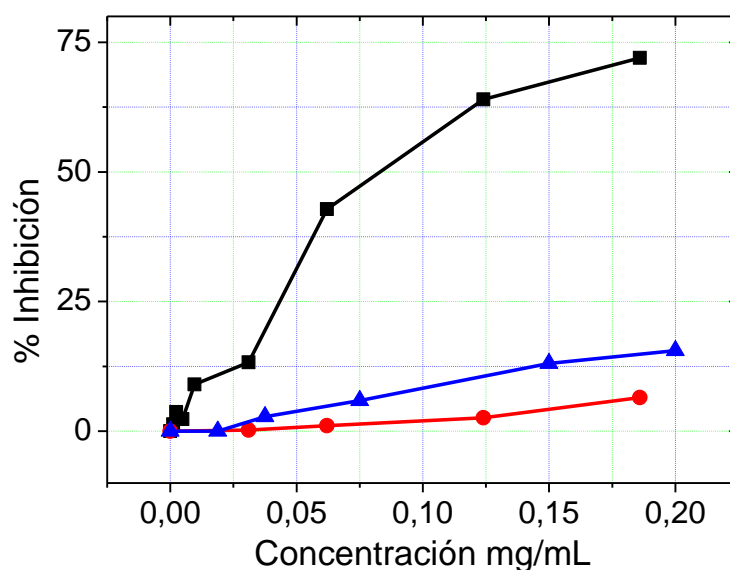
Tiempo en el horno /h	Área pico $966\text{ cm}^{-1}$ /(cm <sup>-1</sup> )
0	$1.47 \pm 0.06$
1	$0.77 \pm 0.07$
2	$0.41 \pm 0.04$
3	$0.18 \pm 0.02$

Observando los valores es fácil darse cuenta de lo rápido que se produce la pérdida de intensidad en la banda centrada en  $966\text{ cm}^{-1}$  con la consiguiente descomposición del reactivo, al menos cualitativamente.

### 5.1.3. Actividad Antioxidante $\beta$ -caroteno y su evolución temporal

Tal y como se comentó en la sección 2.10 del Capítulo 2 se ha evaluado la capacidad antioxidante del  $\beta$ -caroteno antes y durante su descomposición mediante el método establecido por otro grupo de investigación<sup>7</sup>. En este tipo de experimentos, lo que se observa es una disminución en la absorbancia medida por espectroscopia UV-Vis a  $517\text{ nm}$  asociada al 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) ya que el antioxidante lo inhibe con el paso del tiempo. Por lo que, el parámetro a evaluar es la cantidad de radical neutralizado por el polieno a una determinada concentración. Posteriormente se analiza el porcentaje de inhibición obteniéndose el valor de  $\text{IC}_{50}$  por sus siglas en inglés (Inhibitory Concentration) que es la concentración a la cual el antioxidante ha logrado inhibir al 50% la concentración inicial de DPPH en un tiempo de 30 minutos.

En la Figura 5.7 se presentan los resultados alcanzados para los patrones de  $\beta$ -caroteno antes y después de ser calentados a  $115^\circ\text{C}$ , que como ya se ha descrito simboliza la temperatura intermedia entre la máxima y la mínima analizadas en este estudio, lo que permite que se emplee como representativa del proceso. En el caso del patrón que no ha sufrido calentamiento se ha obtenido una concentración  $\text{IC}_{50} = 0.083\text{ mg/L}$ .



**Figura 5.7:** Disminución de poder antioxidante con el tiempo. **Negro:** t = 0 h; **Azul:** t = 4 h; **Rojo:** t = 8 h.

Si la concentración obtenida se transforma a unidades de % masa (g)/volumen (mL) se obtendría un valor de 0.0083 %, que es consistente con los resultados obtenidos por otros investigadores mediante un método similar para muestras de  $\beta$ -caroteno cristalino aislado de aceite de palma, donde alcanzaron valores de 0.01 % en este tipo de polienos<sup>8</sup>.

Como se puede ver claramente en la gráfica, a concentraciones similares, las muestras que han sufrido tratamiento térmico no son capaces de inhibir al DPPH como lo hacía el patrón sin calentar. En los casos del producto descompuesto, ha sido imposible evaluar el parámetro  $IC_{50}$  necesitando concentraciones mucho más elevadas para poder alcanzar la inhibición del 50% de radical. Este hecho podría ser por tanto, consecuencia directa de la descomposición.

A modo de conclusión, cabe destacar la relación existente entre la capacidad antioxidante y el proceso de descomposición, ya que si se comparan los patrones al tiempo inicial con aquellos que han sufrido calentamiento durante 4 y 8 h ésta disminuye considerablemente.

Estos resultados están en consonancia con los alcanzados por otros autores<sup>9</sup> donde se dedujo que, a diferencia de los productos de degradación del licopeno, los del  $\beta$ -caroteno presentan un efecto prooxidante en vez de antioxidante.

## 5.2. Licopeno

En lo referente a extractos de licopeno obtenidos a partir de muestras tomates, se han realizado estudios similares a los desarrollados con el  $\beta$ -caroteno a través de espectroscopia Raman e infrarroja. Dichos extractos fueron obtenidos tal y como se explica en la Sección 2.1.3 del Capítulo 2. El tratamiento térmico llevado a cabo fue a 115°C, que como ya se ha afirmado puede tomarse como una temperatura representativa.

### 5.2.1. Espectroscopia Raman Resonante de Licopeno a 514.5 nm

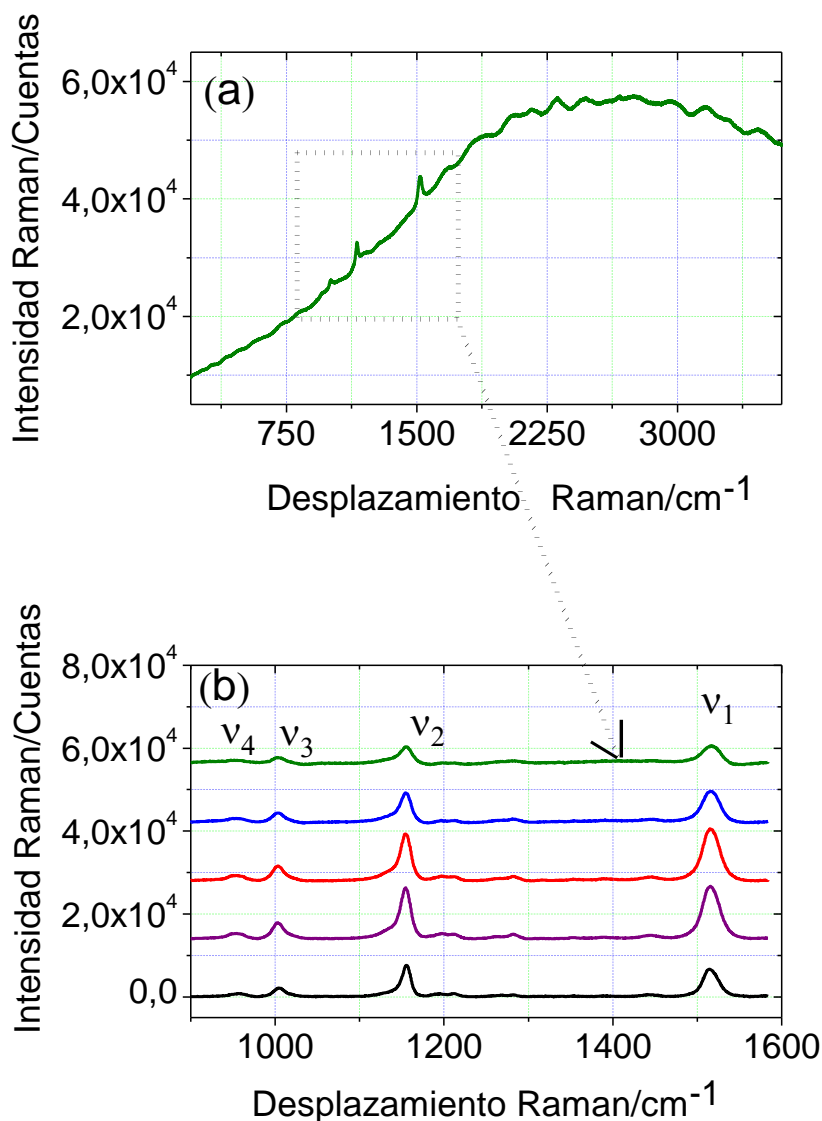
En primer lugar, y de igual manera que en el caso del  $\beta$ -caroteno, las muestras fueron caracterizadas mediante espectroscopia Raman. En la Figura 5.8 se presentan los resultados espectroscópicos logrados para este tipo de muestras.

En la parte superior (a) se puede advertir un espectro adquirido tras 8 horas de calentamiento a 115°C al que aún no se le ha aplicado la corrección de fluorescencia. Por otro lado, en la parte (b) de la figura se muestran los espectros tras el tratamiento térmico a la temperatura indicada a distintos tiempos.

En los extractos, al igual que sucedía en las muestras de tomate expuestas en el Capítulo 3, aparecen las 4 señales características mostradas hasta el momento en la mayoría de espectros, lo que hace pensar que en estas muestras existe una cantidad significativa de carotenoides.

Igual que sucedía con el caso del  $\beta$ -caroteno, no hay diferencias reseñables en los espectros adquiridos de licopeno en función del tiempo de calentamiento salvo la progresiva desaparición del modo vibracional  $\nu_4$ , vibración que no se observaba en los patrones del otro polieno estudiado por Raman, aunque para una mayor claridad más adelante se expondrán los resultados alcanzados mediante espectroscopia IR.

Los espectros se han desplazado en número de cuentas, es decir, se le ha sumado una pequeña cantidad a cada uno en el eje de ordenadas para una mayor claridad en la exposición. Por otro lado, a la zona de interés se le ha aplicado la corrección de fluorescencia que se viene empleando hasta este momento además de una ampliación en la zona de número de ondas de interés procediendo de igual manera que con el  $\beta$ -caroteno.



**Figura 5.8:** (a) Espectro Raman Resonante a 514.5 nm de longitud de onda de excitación de un extracto de licopeno obtenido tras 8 horas de calentamiento a 115°C. (b) Espectros Raman resonantes de la zona de interés marcada en la zona punteada de (a) tras la corrección de la línea base. Se han desplazado unos respecto de otros por claridad. A temperatura ambiente: **Negro:** t = 0 h. y tras varios tiempos de calentamiento: **Morado:** t = 2 h. **Rojo:** t = 4 h, **Azul:** t = 6 h y **Verde:** t = 8 h. Cada espectro es el promedio de 10 adquisiciones de 15 segundos cada una.

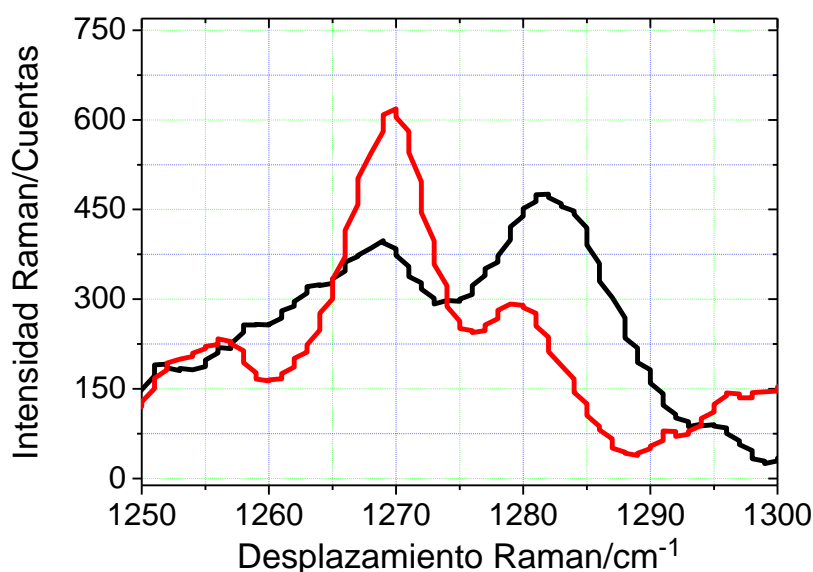
En la Tabla 5.7, como viene siendo habitual, se presentan las asignaciones más características de los modos vibracionales presentes en este tipo de muestras. Algunos de ellos son los mismos que se presentaron a lo largo del Capítulo 3 aunque, se exponen algunas vibraciones adicionales que serán comentadas en profundidad más adelante. Éstas últimas, únicamente se pueden observar tras ampliar el espectro pero presentan una gran importancia, ya que se analizarán detenidamente con el fin de aclarar la composición mayoritaria del extracto.

**Tabla 5.7:** Asignaciones más significativas del extracto de licopeno en espectroscopia Raman con una excitación de 514.5 nm.

<b>Desplazamiento Raman e Intensidad / cm<sup>-1</sup></b>	<b>Asignación Vibracional</b>
959 w	$\omega_{op}(\text{C}=\text{C}-\text{H}) \nu_4$
1005 m	$\nu_3(\text{C}-\text{CH}_3) \nu_3$
1157 s	$\nu_2(\text{C}-\text{C}) \nu_2$
1198 w	$\nu(\text{C}-\text{C})$
1270 w	$\rho(\text{C}-\text{H})$
1280 w	$\tau(\text{metilenos terminales})^{10}$
1516 s	$\nu_1(\text{C}=\text{C}) \nu_1$

*Vibraciones:  $\nu$  tensión;  $\omega$ : flexión,  $\rho$ : balanceo,  $\tau$ , torsión; intensidades: s, fuerte; w, débil; contribuciones: op, fuera del plano.*

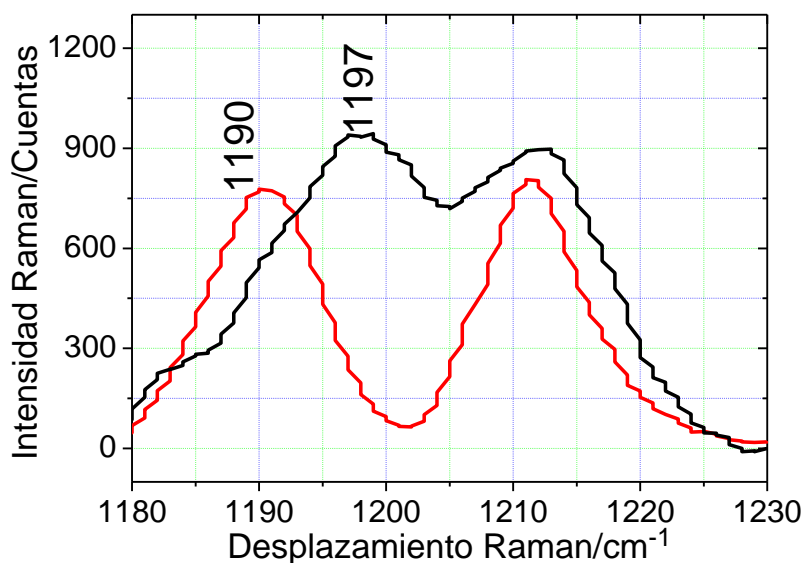
En lo referente a la caracterización, y como ya se ha mencionado es necesario hacer énfasis en la zona ampliada que se presenta en la Figura 5.9 perteneciente a la región espectral 1250-1300 cm<sup>-1</sup> no observable a simple vista. En dicha figura, a la que, para una mayor claridad se le ha aplicado un suavizado, se pueden ver dos espectros superpuestos, uno de  $\beta$ -caroteno y otro de licopeno a t = 0 h con el objetivo de que sean comparables.



**Figura 5.9:** Zona espectral ampliada en espectros de **Rojo:** β-caroteno. **Negro:** extracto de licopeno donde se observa una inversión del cociente entre los dos picos.

Esta región del espectro es determinante ya que ayuda a diferenciar el licopeno del β-caroteno, mediante espectroscopia Raman para polienos relativamente puros. Mientras que en el caso del licopeno la señal reflejada a  $1270\text{ cm}^{-1}$  es menos intensa que la encontrada a  $1280\text{ cm}^{-1}$ , en el β-caroteno sucede al revés. Este hecho no es nuevo, ya que fue observado por otros grupos<sup>11</sup>. Los citados investigadores, observaron que el cociente de la intensidad del pico que se encuentra a mayores números de ondas y la que se encuentra a menores desplazamientos está por encima de 1 en el caso del licopeno, mientras que en el caso del β-caroteno es menor que 1. Este efecto, también se manifiesta en la Figura 5.9. Por lo tanto, teniendo en cuenta la mencionada región del espectro, y estudiando las bandas clave se puede afirmar que, en los extractos obtenidos, el licopeno se encuentra en una proporción significativamente superior a la de otros carotenoides.

Además, en la Figura 5.10 se representa otro modo vibracional encontrado a  $1197\text{ cm}^{-1}$  en el caso del licopeno y a  $1190\text{ cm}^{-1}$  para el β-caroteno correspondiente a las tensiones C-C.

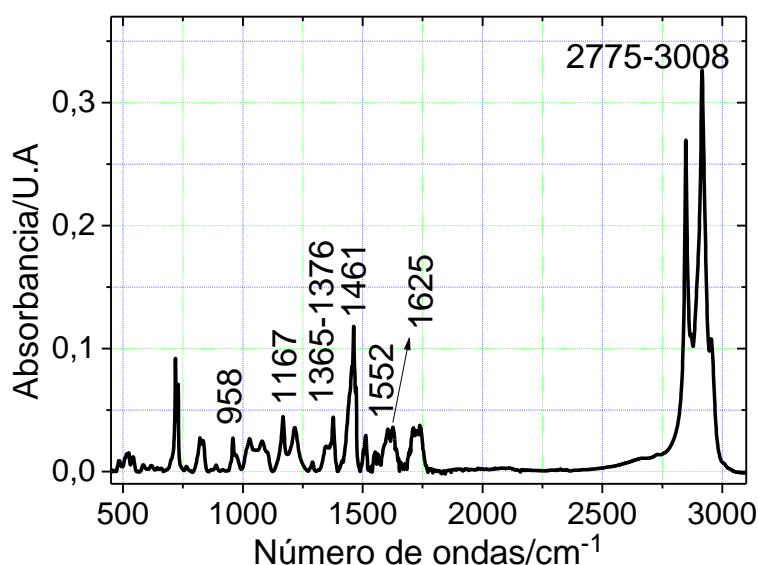


**Figura 5.10:** Zona espectral ampliada en espectros de **Rojo:**  $\beta$ -caroteno. **Negro:** Extracto de licopeno donde se observa desplazamiento de uno de los picos de  $7\text{cm}^{-1}$ .

Este pequeño desplazamiento también fue observado por los autores citados<sup>11</sup>, que ayudándose de este efecto asignaron los espectros a un carotenoide o al otro, aunque en su estudio el corrimiento fue de unos  $5\text{ cm}^{-1}$  y en este caso es de  $7\text{ cm}^{-1}$ . Esto puede deberse a que en nuestras muestras es probable que el licopeno no haya sido desprendido totalmente de la matriz biológica en la que se encontraba y exista una cierta contribución de la misma. Además, los mismos investigadores concluyeron que según aumentaban la proporción de  $\beta$ -caroteno en mezclas de ambos polienos, la señal centrada a  $1190\text{ cm}^{-1}$  se iba resolviendo más, tal y como sucede en la Figura 5.10<sup>11</sup>.

#### 5.2.2. Estudio de la Degradación Térmica Licopeno Mediante Espectroscopia Infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR)

Para continuar con la caracterización también se adquirieron espectros de infrarrojo. En la Figura 5.11 se puede apreciar uno de ellos obtenido para la muestra en su estado inicial, es decir, sin haber sufrido ningún calentamiento ( $t = 0\text{ h}$ ).



**Figura 5.11:** Espectro Infrarrojo (ATR) de un extracto de licopeno obtenido a  $t = 0$  h.

Como se puede desprender de la figura, justo por encima de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , solapada a la señal cercana a  $958\text{ cm}^{-1}$ , se encuentra una banda ancha con forma de doblete que ya fue observada por otros investigadores<sup>5</sup> y asignada al agua en muestras de puré de tomate, haciendo imposible la resolución de la señal característica del licopeno centrada en  $958\text{ cm}^{-1}$ . Cuando estos mismos investigadores midieron muestras de patrón de licopeno, dicha doblete desaparecía.

En este caso, al tratarse de extractos, es cierto que existe una pequeña contribución del agua, aunque el aislamiento de la matriz biológica es suficiente como para poder resolver la señal característica a  $958\text{ cm}^{-1}$ . Por lo que se puede aseverar que en nuestro caso, nos encontramos ante una muestra que posee características intermedias entre las del puré de tomate (donde no se observaba) y las del patrón (donde se veía con claridad).

Asimismo, la banda que se halla a  $958\text{ cm}^{-1}$  se corresponde con el modo vibracional análogo encontrado para el  $\beta$ -caroteno a  $966\text{ cm}^{-1}$ . Esta señal, también fue observada por otros investigadores<sup>5, 13</sup> a los mismos números de ondas que aparecen en la Figura 5.11 en muestras de patrones, siendo más intensa que la aquí presentada.

**Tabla 5.8:** Asignación de modos vibracionales más importantes en espectroscopia infrarroja encontrados en un extracto de licopeno a  $t = 0$  h.

Número de ondas e Intensidad / $\text{cm}^{-1}$	Asignación
958 m	$\omega_{\text{op}}$ (C=C-H)
1167 m	$\nu$ (C-C)
1376 m	$\delta_{\text{sym}}$ (CH <sub>3</sub> ) <sup>5</sup>
1461 m	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) <sup>5</sup>
1552 w	$\nu$ (C=C)
1625 m	$\delta$ (H-O-H) <sup>5, 12</sup>
2848 s	
2915 s	$\nu$ (C-H)
2953 s	

*Vibraciones:*  $\nu$  tensión,  $\omega$ : flexión,  $\delta$ , tijereteo; *intensidades:* s, fuerte; m, media; w, débil.  
*Contribuciones:* op, fuera del plano; *simetría:* sym, simétrico.

El resto de bandas son muy similares a las recogidas para los patrones de  $\beta$ -caroteno en cuanto a número de ondas y asignaciones debido a la similitud estructural existente entre ambas moléculas.

#### *Temperatura 115°C*

A pesar de que la intensidad del pico objeto de estudio ( $958 \text{ cm}^{-1}$ ) no era tan elevada en las muestras de extractos de licopeno, es suficiente para evaluar su área con el paso del tiempo, aunque no para analizar exhaustivamente un comportamiento cinético global.

Como ya se ha comentado, se estimó 115°C como una temperatura representativa y se analizó su variación de igual manera que se hizo con los patrones de  $\beta$ -caroteno obteniéndose las áreas mostradas en la Tabla 5.9.

**Tabla 5.9:** Área del pico que ha sido asignado como  $\omega_{op}$  (C=C-H) a temperatura ambiente  $t = 0$  y tratado térmicamente a  $115^{\circ}\text{C}$  a diferentes tiempos para una muestra de extracto de licopeno.

Tiempo /h	Área pico $958\text{ cm}^{-1}$
0	0.0472
2	0.0163
4	0.0101
5	0.0028
6	0.0019

Los valores se encuentran muy por debajo de los expuestos para el caso del  $\beta$ -caroteno. Por lo tanto, no se van a llevar a cabo estudios cinéticos a cada temperatura y únicamente se mostrará este ejemplo a modo ilustrativo.

En el siguiente capítulo se comentarán todos los resultados cinéticos obtenidos hasta el momento junto con los cálculos de las constantes de velocidad.

### 5.3. Modelización Molecular

En este apartado, se exponen de manera resumida los resultados más destacados obtenidos tras la realización de cálculos computacionales en los polienos objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. Para ello, se han empleado dos métodos de cálculo *ab Initio*, con el mismo conjunto de bases (6-31G\*); el primero de ellos (*mPW1PW91*) tiene en cuenta a la molécula aislada valorando sus interacciones tanto covalentes como no covalentes<sup>14, 15</sup>, el segundo método ( $\omega$ B97xD) posee características similares en lo que a interacciones covalentes respecta, con ligeras variaciones en cuanto a las no covalentes<sup>16</sup>.

Para ambas metodologías se procedió de la siguiente manera: En primer lugar se llevó a cabo un cálculo de la geometría más estable. Para tal fin, se compararon las energías obtenidas de las diversas geometrías calculadas, llegando a la conclusión de cuál era la menos energética. Una vez que quedó definida, se realizaron el resto de estimaciones: Espectros infrarrojo y Raman así como energías de orbitales HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) así como la

representación gráfica de su distribución a lo largo de la molécula para la configuración geométrica más estable.

Por brevedad, los resultados que se presentan a continuación hacen referencia únicamente a uno de los dos métodos empleados, el *mPW1PW91*. Aunque los datos obtenidos mediante la metodología  $\omega$ B97xD se pueden consultar en el Apéndice II de esta misma memoria.

Las frecuencias vibracionales calculadas por ambas metodologías han sido reescaladas mediante una corrección en número de ondas. Estas modificaciones se encuentran ampliamente descritas en la bibliografía y son diferentes según la metodología empleada. Así, en el primer caso (*mPW1PW91*) los factores de escala se especifican en la referencia<sup>17</sup>, mientras que para el segundo método ( $\omega$ B97xD) se describen en la página web del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, por sus siglas en inglés NIST<sup>18</sup>.

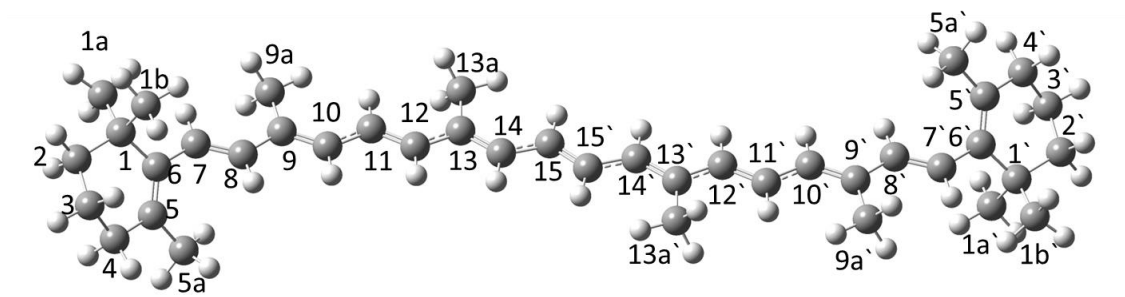
### 5.3.1. $\beta$ -Caroteno Método *mPW1PW91*

Para los cálculos realizados en la molécula de  $\beta$ -caroteno se obtuvieron dos geometrías cuyas energías fueron en el primer caso  $-1557.54028 E_h$  y  $-1557.54305 E_h$  en el segundo. Como se puede apreciar los valores de las energías siempre son menores que 0. Por definición, cuanto más baja es la energía tanto más estable es la molécula. Adicionalmente, por convenio, toma valores negativos porque para romper los enlaces es necesario aplicar una energía adicional al sistema. Dicho esto, una energía cero se correspondería con una situación ideal en la que no existen enlaces entre los átomos de la molécula. Las energías están referidas a la suma de las energías de los núcleos y de los electrones por separado. Estos hechos, serán iguales para todos los cálculos realizados a lo largo de la presente memoria.

La diferencia energética entre ambas configuraciones fue de  $2.77 \cdot 10^{-3} E_h$  que se corresponde con 7.27 kJ/mol. Por ello, se puede afirmar que son de dos configuraciones diferentes, siendo la más estable la calculada en último lugar, por lo que a partir de este momento se trabajará con dicha configuración.

5.3.1.1. Estructura

En la Figura 5.12 se presenta la estructura más estable del  $\beta$ -caroteno anteriormente obtenida mediante el método de cálculo en el que se centra esta sección. La figura ha sido numerada por claridad ya que en el Apéndice II se presentan los parámetros geométricos más importantes en cuanto a distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros.



**Figura 5.12:** Estructura molecular más estable del  $\beta$ -caroteno calculada con el método antes citado.

Como se puede vislumbrar en la estructura, algunos enlaces de la parte central de la molécula presentan una zona punteada que representa la deslocalización electrónica; este efecto le confiere a los citados enlaces propiedades intermedias entre simples y dobles, y está en consonancia con las distancias interatómicas presentadas en el Apéndice II.

5.3.1.2. Orbitales HOMO y LUMO

Para dar una visión más completa, se llevaron a cabo cálculos cuya finalidad era indicar la distribución los orbitales HOMO y LUMO en la molécula obteniendo así una idea de la posible reactividad de la misma. Además, se obtuvieron valores de las energías de dichos orbitales, pudiendo calcular de este modo algunos parámetros adicionales.

Las ecuaciones empleadas para estos cálculos se detallan a continuación y han sido extraídas de las investigaciones desarrolladas por otros autores<sup>19-21</sup>.

$$\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}} \quad [5.1]$$

Donde  $E_{\text{LUMO}}$  es la energía del orbital LUMO,  $E_{\text{HOMO}}$  la energía del orbital HOMO y  $\Delta E$  representa el valor de la diferencia de energías entre ambos orbitales.

$$\mu = \frac{E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}}{2} \quad [5.2]$$

Donde  $\mu$  hace referencia al potencial químico (a partir de ahora potencial),  $E_{\text{HOMO}}$  a la energía del orbital HOMO y  $E_{\text{LUMO}}$  a la energía del orbital LUMO.

$$\eta = \frac{E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}}{2} \quad [5.3]$$

Donde  $\eta$  representa la dureza química (a partir de ahora dureza) y  $E_{\text{HOMO}}$  la energía del orbital HOMO siendo  $E_{\text{LUMO}}$  la energía del orbital LUMO.

$$\sigma = \frac{1}{\eta} \quad [5.4]$$

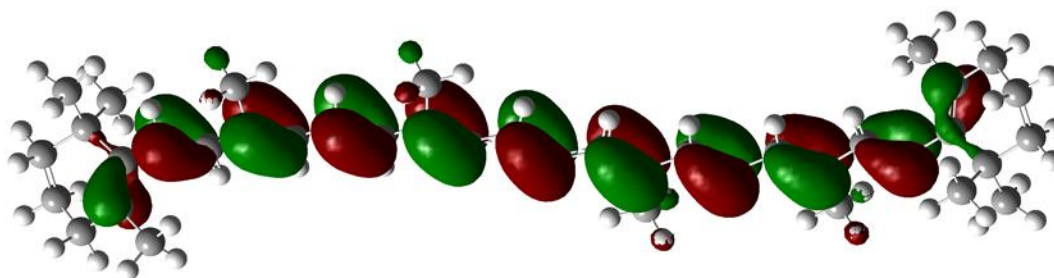
$\sigma$  representa la fragilidad química (a partir de ahora fragilidad) y  $\eta$  la dureza. Por lo tanto este parámetro se relaciona con el inverso de  $\eta$  ya que se trata de términos contrapuestos y por lo tanto matemáticamente queda representado de ese modo.

$$\omega^0 = \frac{\mu^2 \sigma}{2} \quad [5.5]$$

Donde  $\omega^0$  simboliza la electrofilia global,  $\mu$  es el potencial antes mostrado y  $\sigma$  la fragilidad. Con estos términos se podrán sacar conclusiones más adelante acerca de la reactividad de las moléculas completando así los estudios cinéticos.

Orbital HOMO del  $\beta$ -caroteno:

En la Figura 5.13 se puede observar la distribución del orbital HOMO a lo largo de la estructura molecular del  $\beta$ -caroteno.



**Figura 5. 13:** Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de  $\beta$ -caroteno.

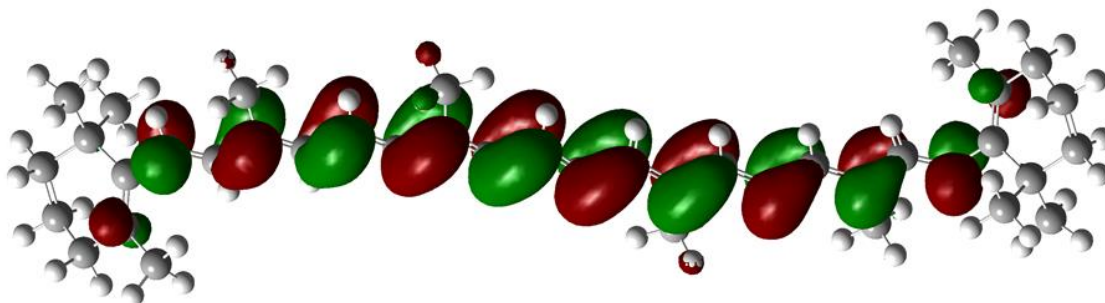
Este tipo de orbital presenta su mayor contribución a la parte central de la molécula en detrimento de los anillos laterales.

Los orbitales representados presentan una naturaleza enlazante. Nótese, cómo cada nodo hace cambiar de signo a la función de onda a lo largo del sistema conjugado con el consiguiente cambio de coloración (rojo-verde) en la figura.

Por otro lado, se puede resaltar cómo la distribución se produce a lo largo de aquellas zonas que presentan un mayor carácter de doble enlace tal y como se confirma con las distancias internucleares (más cortas) del Apéndice II.

Orbital LUMO del  $\beta$ -caroteno:

En la Figura 5.14 se presenta la distribución del orbital LUMO a lo largo de la molécula de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 5.14:** Distribución de los orbital LUMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de  $\beta$ -caroteno.

Al igual que sucedía para el caso del orbital HOMO, el orbital LUMO también se encuentra principalmente distribuido en la parte central de la molécula y posee naturaleza enlazante.

En este caso, al contrario de lo expuesto en el caso anterior, si se compara con en el orbital HOMO, la distribución se produce a lo largo de aquellos enlaces que se acercan más en lo que a distancias internucleares se refiere a enlaces simples.

Como se ha comentado, y mediante la energía de los orbitales se han podido calcular los parámetros que se presentan en la Tabla 5.10 teniendo en cuenta las referencias<sup>19-21</sup>. Con la finalidad de contrastarlos con los obtenidos para el licopeno. Estos resultados serán comentados más adelante.

**Tabla 5.10:** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la configuración más estable del  $\beta$ -caroteno. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

Parámetro	$\beta$ -Caroteno
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	4.62
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	2.12
$\Delta E / \text{eV}$	2.50
$\eta / \text{eV}$	1.25
$\sigma / \text{eV}^{-1}$	0.8
$\mu / \text{eV}$	-3.37
$\omega^\circ / \text{eV}$	4.54

A pesar de que estos resultados serán desarrollados posteriormente, conviene señalar sus valores negativos ya que, se considera el origen de energías (valor cero), a aquella configuración asociada a un electrón libre que cuando forma parte de una molécula se estabiliza disminuyendo en energía. Este hecho será observado en todos los casos en los que se presenten este tipo de resultados relacionados con los orbitales frontera.

Según ciertos estudios<sup>22</sup>, con algunos de los datos disponibles en la tabla, se puede calcular la capacidad antioxidante mediante el parámetro  $W$  según [5.6].

$$W = e^{(-12 + \frac{120}{IP})} \quad [5.6]$$

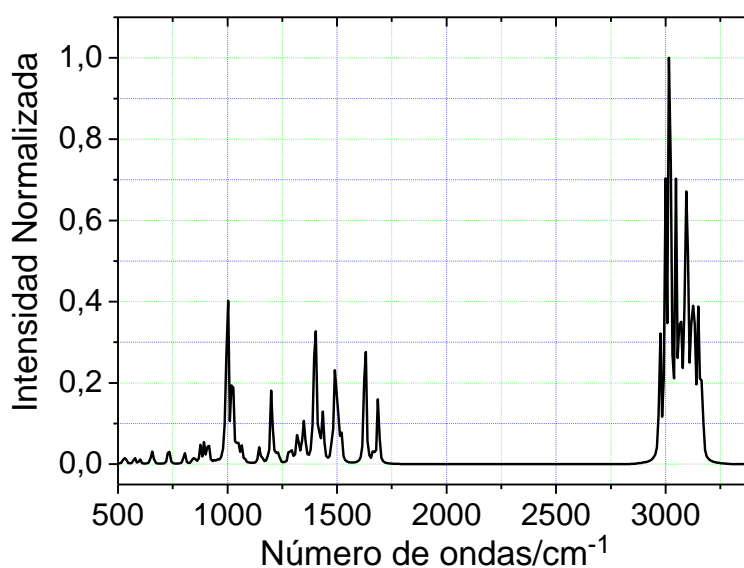
Donde  $IP$  es el potencial de ionización en eV, que en el marco del teorema de Koopmans se puede aproximar a la diferencia de energías entre orbital HOMO y el continuo de energía que en este caso toma el valor de 0, por lo que dicho potencial se corresponderá con la energía del HOMO cambiada de signo<sup>23-25</sup>. Así, mediante [5.6] se obtienen unos valores de  $W = 1.14 \cdot 10^6$ .

### 5.3.1.3. Espectro IR del $\beta$ -caroteno

Siguiendo la metodología de cálculo en la que se centra el apartado 5.3.1 se pudo estimar el espectro infrarrojo esperable de una molécula de  $\beta$ -caroteno para compararlo con los resultados experimentales obtenidos mediante ATR-IR.

Estos espectros se presentan normalizados, de tal manera que la señal más intensa toma el valor de uno. Esta manera de proceder, ha sido aplicada en todos los cálculos espectrales con el propósito de que sean comparables entre sí.

En la Figura 5.15 se describe el espectro de infrarrojo calculado para una molécula de  $\beta$ -caroteno obtenido por la metodología *mPW1PW91*. Recordando lo expuesto, a todos los espectros obtenidos mediante la presente metodología de cálculo, tanto de Raman como de infrarrojo, además de la normalización, se les ha aplicado la corrección antes indicada en cuanto a número de ondas ampliamente descrita en la referencia<sup>17</sup>.



**Figura 5.15:** Espectro IR obtenido mediante cálculos computacionales del  $\beta$ -caroteno.

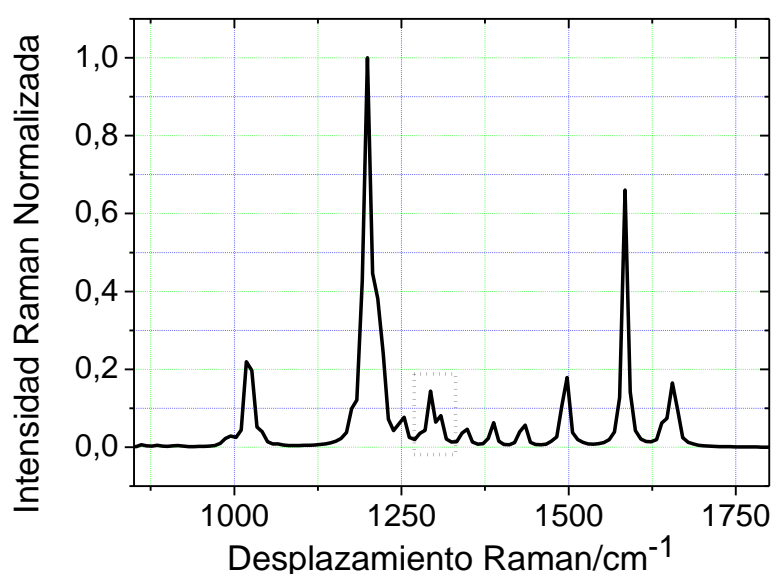
De la Figura 5.15 obtenida mediante cálculos computacionales se puede desprender que existe una alta similitud si se compara con el espectro experimental expuesto en la Figura 5.2 de este mismo capítulo.

Al no existir frecuencias negativas en los espectros vibracionales obtenidos, se puede concluir que el cálculo de optimización de la geometría ha sido correcto y la molécula se encuentra en un estado de mínima energía<sup>15</sup>.

#### 5.3.1.4. Espectro Raman del $\beta$ -caroteno

De la misma manera que en el caso anterior, se obtuvo el espectro Raman modelizado para este tipo de pigmentos. Las señales más características se pueden ver en la Figura 5.16. El espectro presentado, también se encuentra normalizado en cuanto a sus intensidades y se le ha aplicado la misma corrección en el eje de abscisas que en el caso anterior, ya que se trata de la misma metodología computacional.

Es interesante darse cuenta de que la afirmación realizada para la Figura 5.9 se mantiene para el caso del espectro modelizado ya que el cociente entre la intensidad del pico a mayores desplazamientos cercano a  $1250\text{ cm}^{-1}$  y el de menores números de ondas (zona punteada) es menor que 1.



**Figura 5.16:** Espectro Raman obtenido mediante cálculos computacionales del  $\beta$ -caroteno. **Zona punteada:** modos vibracionales diferenciadores descritos en la Sección 5.2.1.

En este tipo de espectros Raman se aprecian una gran cantidad de señales que apenas eran visibles en los obtenidos experimentalmente, esto se debe a que las medidas realizadas se hicieron en situación de resonancia, y en esas condiciones los modos

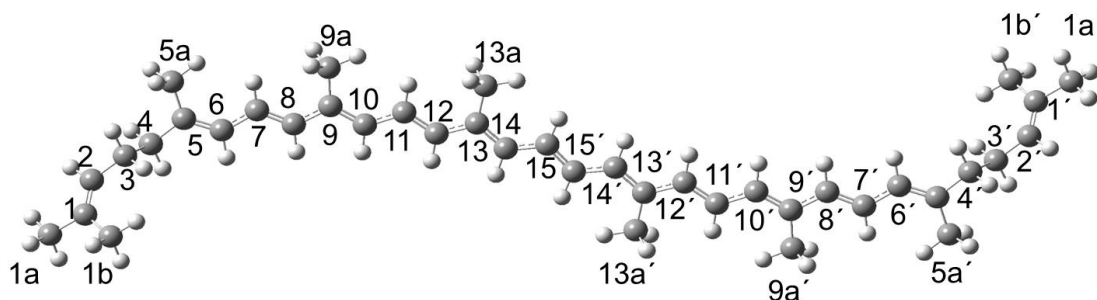
obtenidos son sólo unos pocos, concretamente los acoplados con el tránsito electrónico como repetidamente se ha mencionado.

### 5.3.2. *Licopeno Método mPW1PW91*

Al igual que sucedía con el  $\beta$ -caroteno, en primer lugar se trató de optimizar la geometría molecular de este tipo de polienos con la finalidad de describir la estructura más estable. En los cálculos realizados se obtuvieron dos geometrías, una de ellas con una energía de  $-1557.49123 E_h$  mientras que la otra presentaba una energía correspondiente a  $-1557.49097 E_h$ . La diferencia entre ambas fue de  $2.6 \cdot 10^{-4} E_h$  que se corresponde con  $0.68 \text{ kJ/mol}$  por lo que, en este caso, dado este valor tan reducido, ambas pueden considerarse prácticamente iguales, de todos modos, para los cálculos sucesivos se continuó con la primera de ellas ya que presenta un valor ligeramente inferior.

#### 5.3.2.1. *Estructura*

La geometría optimizada para la molécula de licopeno mediante la metodología de cálculo mPW1PW91 se presenta en la Figura 5.17 con la consiguiente numeración para la interpretación de los parámetros geométricos que pueden consultarse en el Apéndice II.



**Figura 5.17:** Estructura molecular más estable del licopeno calculada con el método antes citado.

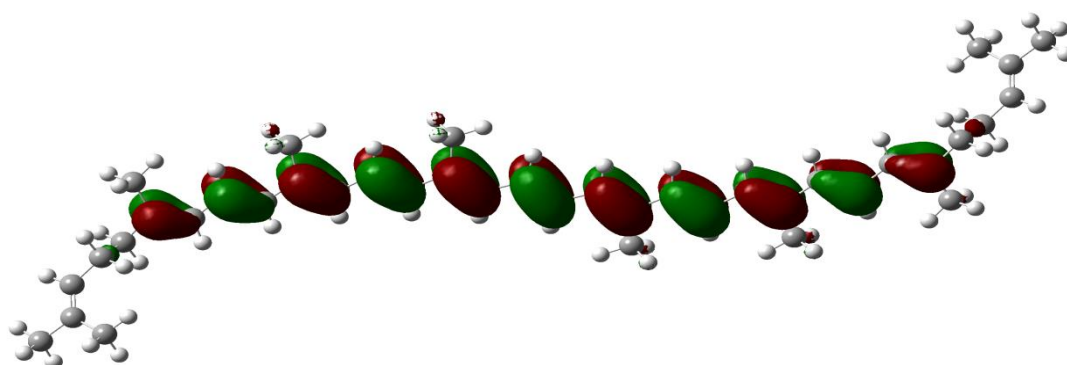
Al igual que en la molécula de  $\beta$ -caroteno, en la parte central de la estructura se advierten ciertos enlaces punteados que indican el efecto de la conjugación, lo que les confiere propiedades intermedias entre el enlace sencillo y el doble.

### 5.3.2.2. Orbitales HOMO y LUMO

Procediendo de forma análoga al caso anterior, se calcularon las energías de los orbitales HOMO y LUMO así como su distribución más estable y los parámetros derivados de dichas energías mediante [5.1], [5.2], [5.3], [5.4], [5.5].

Orbital HOMO del licopeno:

En la Figura 5.18 se presenta la disposición del orbital HOMO de una molécula de licopeno. En su distribución se puede observar que la mayor contribución se da en la parte central de la molécula, sin ninguna aportación orbital en los extremos.



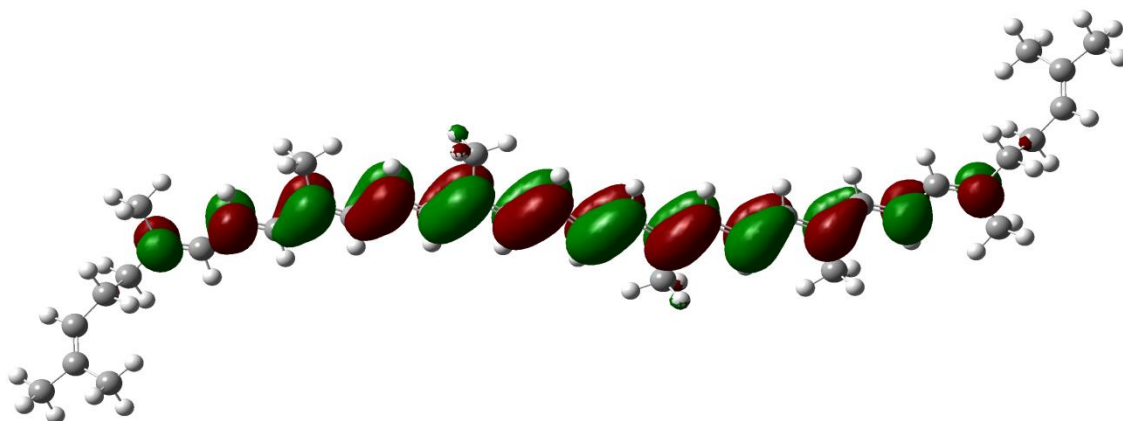
**Figura 5.18:** Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de licopeno.

En este caso, las esferas también representan orbitales enlazantes. Los colores simbolizan el signo de la función de onda.

Además, la distribución predomina sobre aquellos enlaces cuyo carácter se aproxima más al de doble enlace, hecho que puede ser contrastado con las distancias internucleares del Apéndice II.

Orbital LUMO del licopeno:

Por otro lado, en la Figura 5.19 se muestra la distribución del orbital LUMO a lo largo de la molécula de polieno cuya principal característica es su disposición a lo largo de la parte central de la molécula.



**Figura 5.19:** Distribución del orbital LUMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de licopeno.

En este caso, la distribución del LUMO, tiene lugar sobre aquellos enlaces cuya distancia internuclear se asemeja más a un enlace simple tal y como se puede confirmar en el Apéndice II estando en consonancia con los hechos expuestos para la molécula de  $\beta$ -caroteno. Una vez determinadas las energías de los orbitales frontera, se han podido calcular los parámetros que se presentan en la Tabla 5.11 mediante las referencias<sup>19-21</sup>.

**Tabla 5.11:** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la configuración más estable del licopeno. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  fragilidad,  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

Parámetro	Licopeno
$-E_{\text{HOMO}}/\text{eV}$	4.53
$-E_{\text{LUMO}}/\text{eV}$	2.15
$\Delta E/\text{eV}$	2.38
$\eta/\text{eV}$	1.19
$\sigma/\text{eV}^{-1}$	0.84
$\mu/\text{eV}$	-3.34
$\omega^\circ/\text{eV}$	4.69

A modo comparativo, es interesante tener en consideración la diferencia entre ambos orbitales frontera ya que es menor en el caso del licopeno si se comparan con la obtenida para el  $\beta$ -caroteno.

Aplicando [5.6] se ha estimado el poder antioxidante del licopeno, alcanzándose unos datos coincidentes en cuanto a orden de magnitud con el  $\beta$ -caroteno, pero superiores en valor  $W = 1.96 \cdot 10^6$ .

#### *Comparación de parámetros de $\beta$ -caroteno y licopeno*

En primer lugar, existe una gran diferencia energética entre los orbitales HOMO y LUMO de ambos carotenoides, del orden de los 2.5 eV, por lo que se puede deducir que todas las reacciones pertenecientes a la descomposición térmica, siempre por debajo de 150°C se producirán con los electrones del orbital HOMO.

Además, si se observan con detenimiento las Tablas 5.10 y 5.11 y teniendo en cuenta las estimaciones de las energías del orbital HOMO, se ha calculado el poder antioxidante de ambos polienos aplicando la expresión [5.6]. El licopeno ( $1.96 \cdot 10^6$ ) presenta una mayor capacidad antioxidante al contrastarla con la encontrada en el  $\beta$ -caroteno ( $1.17 \cdot 10^6$ ), aunque dentro del mismo orden de magnitud. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos experimentalmente por otros autores<sup>26</sup> donde se dedujo la mayor capacidad antioxidante del mencionado pigmento.

La dureza es un parámetro que indica la resistencia de un compuesto a cambiar su número de electrones<sup>21</sup> y por lo tanto puede ser un buen indicador para evaluar la reactividad. En el caso del  $\beta$ -caroteno este valor fue de 1.25 eV, mientras que para el licopeno fue de 1.19 eV, por lo que en principio, cabe esperar una mayor reactividad en el caso de éste último.

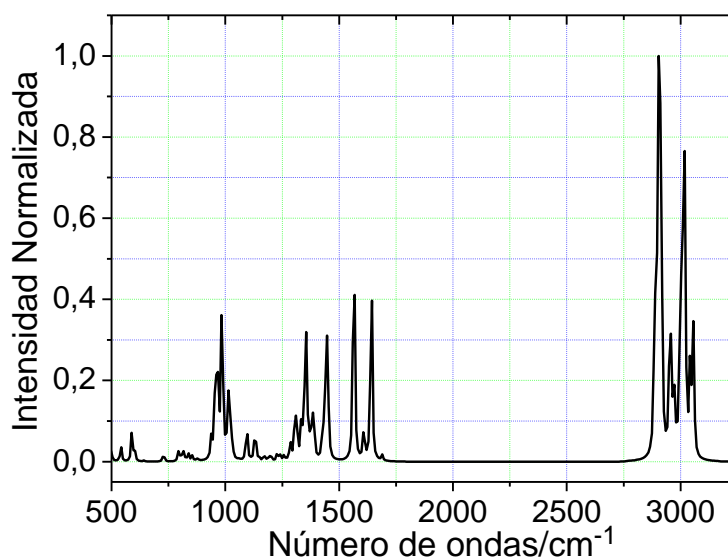
El índice de electrofilia global es una medida del poder electrofílico que da una idea de cómo varía la energía cuando un sistema es saturado con electrones<sup>27</sup> siendo ligeramente superior para el licopeno.

Finalmente, la fragilidad es una propiedad que puede ser interpretada como lo extensa, o no, que es la reactividad<sup>28, 29</sup>. Por ello, con estos valores, también se puede llegar a la conclusión de que el  $\beta$ -caroteno ( $0.80 \text{ eV}^{-1}$ ) es menos reactivo que el licopeno ( $0.84 \text{ eV}^{-1}$ ).

Estos resultados, se encuentran en consonancia con los propuestos por algunos investigadores<sup>30</sup>, en los que se indica la gran inestabilidad del licopeno frente al  $\beta$ -caroteno, siempre y cuando se encuentre aislado de la matriz biológica.

### 5.3.2.3. Espectro IR del licopeno

En la Figura 5.20 se presenta el espectro infrarrojo calculado para una molécula de licopeno. Se puede constatar una buena coincidencia con los resultados experimentales mostrados en la Figura 5.11 donde se presentaba el espectro de los extractos.

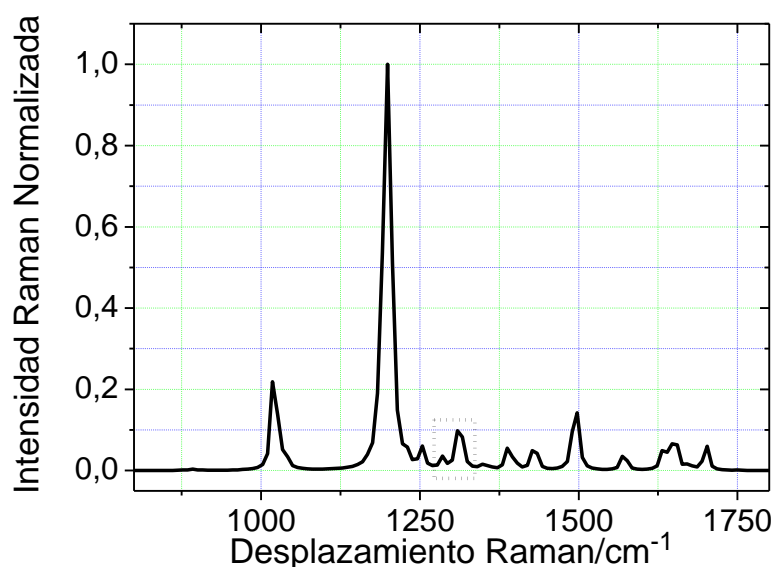


**Figura 5.20:** Espectro IR obtenido mediante cálculos computacionales del licopeno.

Las correcciones realizadas en el número de ondas son las mismas que las aplicadas anteriormente para el caso del  $\beta$ -caroteno, es decir, las de la referencia 17. Como se ha descrito en epígrafes anteriores, la banda más intensa ha sido normalizada a 1.

### 5.3.2.4. Espectro Raman del Licopeno

En la Figura 5.21 se muestra el espectro Raman predicho por los cálculos teóricos para el licopeno mediante el método de cálculo *mPW1PW91*. Se puede notar un aumento significativo en cuanto al número de señales en comparación con los espectros experimentales ya que, en este caso, no se ha impuesto la condición de resonancia que sí se daba en las medidas realizadas en las muestras.



**Figura 5.21:** Espectro Raman obtenido mediante cálculos computacionales del licopeno. **Zona punteada:** modos vibracionales diferenciadores descritos en la Sección 5.2.1.

Por otro lado, se mantiene la afirmación antes comentada (en la caracterización del extracto) donde el cociente de los picos cercanos a  $1250\text{ cm}^{-1}$  (existe un pequeño desplazamiento respecto al experimental) tienen un valor mayor que 1 si se divide la intensidad de la señal que se encuentra a mayor número de ondas entre la que aparece a menores desplazamientos.

En el siguiente capítulo se presentarán otras moléculas modelizadas mediante el mismo método, con la finalidad de dar soporte a algunos de los procesos que tienen lugar en la descomposición térmica de los carotenoides.

#### 5.4. Referencias

1. Saito, S., and Tasumi, M. (1983). Normal-Coordinate Analysis of  $\beta$ -Carotene Isomers and Assignments of the Raman and Infrared Bands. *J. Raman Spectrosc.* **14(5)**: 310-321.
2. Schlücker, S., Szeghalmi, A., Schmitt, M., Popp, J., and Kiefer, W. (2003). Density functional and vibrational spectroscopic analysis of  $\beta$ -carotene. *J. Raman Spectrosc.* 34: 413-419.
3. Koyama, Y., Takatsuka, I., Nakata, M., and Tasumi, M. (1988). Raman and Infrared Spectra of the *All-trans*, *7-cis*, *9-cis*, *13-cis* and *15-cis* Isomers of  $\beta$ -Carotene: Key Bands Distinguishing Stretched or Terminal-Bent Configurations from Central-Bent Configurations". *J. Raman Spectrosc.* **19**: 7-49.
4. Finkelshtein, E. I., Krasnokutskaya, I. S., and Vakulova, L. A. (1999). Spectroscopy of carotenoids and its application to the investigation of autoxidation. *J. Mol. Struct.* **480-481**: 569-571.
5. Baranska, M., Schütze, W., and Schulz, H. (2006). Determination of Lycopene and  $\beta$ -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR and NIR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **78(24)**: 8456-8461.
6. Marshall, J. (1998). Fourier Transform Infrared Spectra of Freshly Isolated  $\beta$ -Carotene. *Asian J. Chem.* **10(1)**: 29-34.
7. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* **40**: 945-948.
8. Gupta, S. S., and Gosh, M. (2013). In Vitro Antioxidative Evaluation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Carotene, Isolated from Crude Palm Oil. *J. Anal Methods Chem.* **2013**: 1-11.
9. Steenson, D. F., and Min, D. B. (2000). Effects of  $\beta$ -Carotene and Lycopene Thermal Degradation Products on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77 (11)**: 1153-1160.
10. Tschirner, N., Schenderlein, M., Brose, K., Schlodder, E., Mroginski, M. A., Thomsen, C., and Hildebrandt, P. (2009). Resonance Raman spectra of  $\beta$ -carotene in

solution and in photosystems revisited: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**: 11471-11478.

11. Radu, A. I., Ryabchykov, O., Bocklitz, T. W., Huebner, U., Weber, K., Cialla-May, D., and Popp, J. (2016). Toward food analytics: fast estimation of lycopene and  $\beta$ -carotene content in tomatoes base on Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Analyst.* **141**: 4447-4455.

12. Marechal, Y. (2011). The molecular structure of liquid water delivered by absorption spectroscopy in the whole IR region completed with thermodynamics data. *J. Mol. Struct.* **1004**: 146-155.

13. Halim, Y., Schwatz, S. J., Francis, D., Baldauf, N., and Rodríguez-Saona, L. E. (2006). Direct Determination of Lycopene Content in Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) by Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J. AOAC Int.* **89(5)**: 1257-1262.

14. Lynch, B. J., Fast, P. L., Harris, M., and Truhlar D. G. (2015). Adiabatic connection for kinetics. *J. Phys. Chem. A.* **104(21)**: 4811-4815.

15. Ham, S. W., and Choe, J.-I. (2015). m-PW1PW91-Calculated Structures, IR Spectra, and Frontier Orbitals of Benzoylmethoxythiacalix[4]arene Complexed with Alkali Metal Ions. *Bull. Korean Chem. Soc.* **36(1)**: 24-31.

16. Chai, J.-D., and Head-Gordon, M. (2008). Long-range corrected hybrid density functionals with damped-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**: 6615-6620.

17. Merrick, J.P., Moran, D., and Radom, L. (2007). An evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors. *J. Phys. Chem.* **111(45)**: 11683-11700.

18. <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp> Fecha de acceso 16-07-2017.

19. Talmaciu, M. M., Bodoki, E., and Oprean, R. (2016). Global chemical reactivity parameters for several chiral beta-blockers from the density functional theory viewpoint. *Clujul Med.* **89(4)**: 513-518.

20. Pearson, R.G. (1986). Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8440-8441.

21. Saleh, Z. A., and Taha D. K. (2014). Calculation of Ionization energies, electron affinities, hardnesses and electro negativites, using many bases set of many methods. *J. Sci. Eng. Res.* **5**: 727-729.
22. Doco, R. C., Houngue, M. T. A. K., Kpotin, G. A., Kuevi, U. A., and Mensa, I. G. S. A. J.-B. (2017). Comparative Study of the Antioxidant Properties of Trolox, Ascorbic Acid, and Butyl Hydroxytolene (BHT) by the Methods of Quantum Chemistry. *J. Chem. Phar. Res.* **9(5)**: 231-236.
23. Chen, S., Scheiner, S., Kar, T., and Adhikari, U. (2012). Theoretical Study on Relationship Between Structure of Mercapto-Triazole Derivatives and Inhibition Performance. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**: 7128-7139.
24. Sancho-García J. C., and Pérez-Jiménez. (2010). A theoretical study of p-stacking tetracene derivatives as promising organic molecular semiconductors. *Chem. Phys. Lett.* **499**: 146-151.
25. Sadasivam, K. and Kumaresan, R. (2011). Theoretical Investigation on the antioxidant Behavior of Chrysoeriol and Hispidulin Flavonoid Compounds- A DFT Study. *Comp. Theor. Chem.* **963**: 227-235.
26. Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. (1989). Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 532-538.
27. Parr, R. G., Szentpály, L. v., Liu, S. Electrophilicity Index. (1999). *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 1922-1924.
28. Oftadeh, M., Naseh, S., and Hamadani, M. (2011). Electronic Properties and dipole polarizability of thiophene and tiophenol derivatives via density functional theory. *Comp. Theor. Chem.* **966(1-3)**: 20-25.
29. De Proft F., and Geerlings P. (1997). Calculation of ionization energies, electron affinities, electronegativities and hardness using density functional methods. *J. Chem. Phys.* **106(8)**: 3270-3279.
30. D'Evoli, L., Lombardi-Boccia, G., and Lucarini, M. (2013). Influence of Heat Treatments on Carotenoid Content of Cherry Tomatoes. *Foods.* **2**: 352-363.

# **6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES II**



## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES II

A lo largo de este capítulo se llevará a cabo el estudio cinético de los resultados espectroscópicos obtenidos en el Capítulo 5, comparándose con datos bibliográficos a objeto de proporcionar algunas ideas representativas del proceso de descomposición a través de las constantes cinéticas a cada temperatura y de la energía de activación asociada a la degradación. Por otro lado, y con el fin de comprender mejor dicho proceso, se desarrollarán algunas modelizaciones moleculares de los productos de degradación esperables, que permitan comparar las predicciones espectroscópicas con las señales observadas experimentalmente.

### 6.1. Análisis cinético de los datos experimentales

El análisis de los datos cinéticos, se ha desarrollado suponiendo una cinética de primer orden de donde se han extraído los coeficientes de velocidad a distintas temperaturas y la energía de activación<sup>1</sup>. Conviene señalar que, dicha aproximación ya fue realizada por otros autores en muestras similares para estudiar los procesos cinéticos de degradación en diferentes matrices<sup>2-7</sup>.

Para este tipo de sistemas se supone la reacción de degradación que se indica a continuación.



A, hace referencia al producto de partida, en este caso el  $\beta$ -caroteno o el licopeno, X se relaciona con los productos de degradación sin identificar y k es una constante que indica la velocidad de reacción.

Con estos datos se puede medir la desaparición de los reactivos o la aparición de los productos según la siguiente expresión.

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[X]}{dt} = k[A] \quad [6.2]$$

Donde [A] representa la concentración del reactivo, [X] simboliza la concentración de los productos y t el tiempo. Para tener una idea clara de cómo varía la concentración con respecto del tiempo se integra la expresión [6.2] tras separar variables según:

$$-\int_{[A_0]}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = k \int_0^t dt \quad [6.3]$$

Siendo  $[A_0]$  la concentración inicial. Como resultado se obtiene la siguiente ecuación

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt} \quad [6.4]$$

Que puede expresarse de la siguiente manera

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt \quad [6.5]$$

En este punto, [6.5] puede interpretarse como la ecuación de una línea recta cuya ordenada en el origen es el logaritmo neperiano de la concentración inicial y cuya pendiente es la constante cinética cambiada de signo. Por ello, se puede afirmar que la constante no depende de la concentración, únicamente de la pendiente del ajuste lineal.

Asimismo, existe una relación directa entre las constantes cinéticas y la energía de activación ( $E_a$ ) según la ley de Arrhenius donde se expresa

$$k(T) = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \rightarrow \ln[k(T)] = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad [6.6]$$

A es un factor preexponencial, R es una constante universal que toma el valor de  $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , y  $E_a$  representa la energía de activación del proceso. Una vez se han tomado logaritmos a ambos lados de la expresión, la ecuación [6.6] describe una recta, donde  $\ln(A)$  se corresponde con la ordenada en el origen y  $-E_a/R$  con la pendiente.

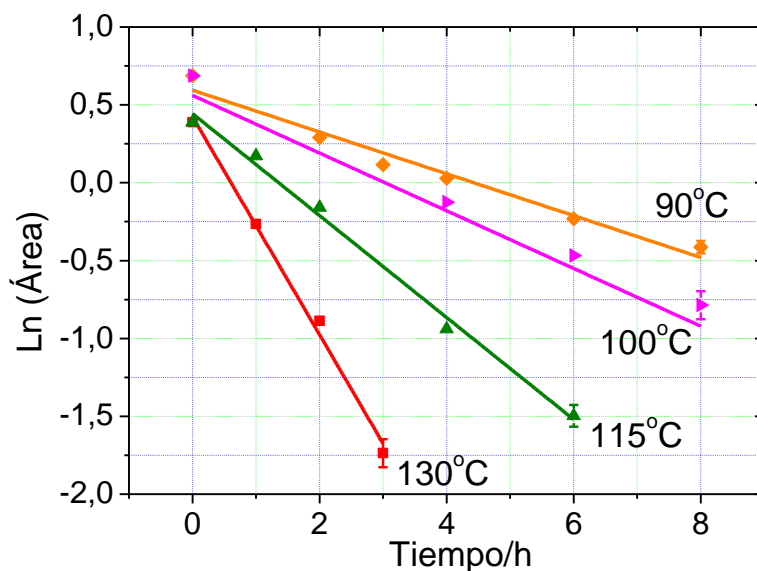
### 6.1.1. $\beta$ -caroteno

#### 6.1.1.1. *Constantes cinéticas*

En este caso, al no depender la constante cinética de la concentración, basta con representar un parámetro directamente relacionado con la misma, es decir, el área del pico cuya desaparición se mostraba en el capítulo anterior.

Así, En la Figura 6.1 se pueden ver los valores del logaritmo neperiano del área perteneciente al pico intenso encontrado a  $966 \text{ cm}^{-1}$  (que fue asignado a la vibración C-H acoplada a la torsión C=C en el capítulo anterior) representada frente al tiempo a cada temperatura. Además, la línea sólida de tendencia hace referencia al ajuste lineal realizado mediante [6.5]. Como se desprende de la figura, la aproximación a una cinética de primer orden que se ha desarrollado es capaz de ajustarse fielmente a los datos experimentales y por consiguiente es coherente con lo explicado hasta el momento.

Una vez realizados los ajustes lineales, las pendientes de los mismos se corresponderán con las constantes cinéticas cambiadas de signo. Estas pendientes van adquiriendo mayores valores según aumenta la temperatura, ya que al hacerlo, la desaparición del reactivo inicial, en este caso  $\beta$ -caroteno, es más ostensible.



**Figura 6.1:** Representación semi-logarítmica de las áreas del pico de IR obtenido a  $966\text{ cm}^{-1}$  frente al tiempo de permanencia en el horno a cada temperatura. Errores experimentales:  $< 10\%$ . Representados en el último punto de cada temperatura. Para una mayor claridad: Los puntos experimentales de  $90^\circ\text{C}$  y  $100^\circ\text{C}$  han sido desplazados 0.3 y 0.2 unidades respectivamente en el eje de ordenadas con respecto a  $115^\circ\text{C}$  y  $130^\circ\text{C}$ .

Como ya se ha descrito, los resultados experimentales observados se corresponden con una cinética de primer orden, hecho que será explicado más adelante en la discusión de posibles mecanismos cinéticos. Este comportamiento es consistente tanto con la producción de uno o varios productos de degradación mediante reacciones paralelas, siendo cada una de ellas de primer orden, así como con reacciones consecutivas con uno o varios intermedios involucrados siempre que la etapa limitante se corresponda con la inicial de la degradación de polieno.

Con los datos de las constantes de velocidad y mediante [6.7] se pueden obtener los periodos de semirreacción en procesos de primer orden como los que aquí se tratan. Este parámetro representa el tiempo que transcurre hasta que la concentración inicial del reactivo se ha reducido a la mitad y está relacionado con la constante de velocidad del proceso de reacción mediante la siguiente expresión

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad [6.7]$$

Estas constantes ya fueron determinadas por otros autores, mediante protocolos diferentes. El más parecido a nuestras condiciones experimentales estudiaba la descomposición del  $\beta$ -caroteno puro a varias temperaturas (50-150°C) seguida por cromatografía. Las muestras habían sido disueltas previamente en hexano y tras su evaporación sufrían el tratamiento térmico<sup>2</sup>.

En la Tabla 6.1 se muestran los valores alcanzados mediante el ajuste para cada constante cinética en función de las temperaturas de trabajo en  $\text{min}^{-1}$ , así como los tiempos de semirreacción comparadas con los estudios antes descritos como similares a los aquí presentados<sup>2</sup>.

**Tabla 6.1:** Valores obtenidos de  $k$  y  $\tau_{1/2}$  a cada temperatura.

Temperatura / °C	$k \cdot 10^3 / \text{min}^{-1}$	$\tau_{1/2} / \text{min}$	Referencia
50	1	693	Referencia 2
90	$2.2 \pm 0.2$	$315.1 \pm 0.2$	Presente trabajo
100	$3.2 \pm 0.2$	$218.7 \pm 0.2$	Presente trabajo
100	7	99	Referencia 2
115	$5.5 \pm 0.2$	$126 \pm 0.2$	Presente trabajo
125	18	38.5	Referencia 2
130	$11.6 \pm 0.7$	$59.8 \pm 0.7$	Presente trabajo
150	26	26.7	Referencia 2

Tal y como se desprende de los valores presentados en la tabla, según aumenta la temperatura también lo hace la constante, llegando a existir una diferencia correspondiente a un factor de 5.3 entre la menor y la mayor temperatura en nuestro caso. Como dicho parámetro aumenta con la velocidad, se puede confirmar que la reacción es más rápida cuanto mayor es la temperatura. En otras palabras, si se aumenta 40°C la temperatura (que es la diferencia existente entre los límites inferior y superior estudiados) la reacción de descomposición transcurre 5 veces más rápido. En el caso de los estudios con los que se están comparando los resultados experimentales si se aumenta la temperatura 50°C la reacción se produce 7 veces más rápido. Estos valores parecen sólidos ya que el aumento de temperatura es 10°C mayor que el presentado por nuestro grupo.

Además, como se puede apreciar en la tabla, los resultados obtenidos por la Referencia 2 son comparables en cuanto a orden de magnitud con los alcanzados en nuestro caso. Sin embargo, en dicho estudio no se adjuntan los errores asociados a cada constante, sin

mostrarse tampoco barras de error en los puntos experimentales obtenidos mediante cromatografía. En cuanto a los tratamientos experimentales, queda claro que los citados autores realizan una manipulación de la muestra mediante disolución y evaporación de disolventes orgánicos, mientras que en nuestro caso se estudia la muestra directamente gracias a las características inherentes al ATR-IR. De todos modos, se puede concluir que los valores son muy cercanos a los alcanzados con el método espectroscópico que aquí se propone.

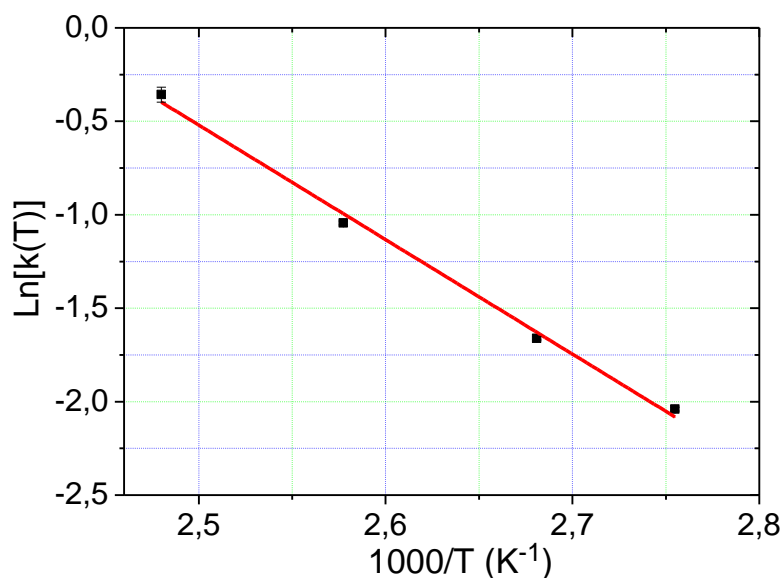
Otros investigadores<sup>5</sup>, observaron la degradación térmica del  $\beta$ -caroteno en aceite de cártamo. Tras los calentamientos de las muestras en la matriz de aceite a diversas temperaturas (75-95°C) y su posterior extracción con hexano, se analizaba la disolución mediante cromatografía líquida (HPLC). La constante obtenida para una temperatura de 85°C fue de  $(2 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , un valor bastante elevado para estar protegido por la matriz de un aceite que hace pensar que la reacción transcurre más despacio. Este resultado anormalmente alto, se justifica ya que en las condiciones de reacción se especifica la interacción con un flujo de aire de 2.5 psi. Por este motivo, los resultados son tan cercanos a los alcanzados mediante nuestra metodología a 90°C que se corresponden con una constante de  $(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

Otros autores<sup>3</sup> efectuaron ensayos en muestras de aceite de oliva en ausencia de oxígeno obteniendo las constantes cinéticas a diversas temperaturas (60-120°C). A modo comparativo, cuando realizaron el ensayo a una temperatura de 100°C obtuvieron un promedio de constantes para distintas muestras de  $(0.17 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . En el caso que ha sido presentado en esta Tesis Doctoral, se obtuvieron valores de  $3.2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  para esa misma temperatura. Como era de esperar, los valores más altos son los reportados en este trabajo si se comparan con los expuestos en la referencia 3. Estas diferencias tan significativas, tienen que ver con el tipo de experimentos realizados, ya que en el caso de los autores mencionados<sup>3</sup> la descomposición se llevó a cabo en la matriz de un aceite y en ausencia de oxígeno, lo que hace que el proceso de degradación sea más lento.

#### *6.1.1.2. Cálculo de energía de activación*

La Figura 6.2 describe una representación tipo Arrhenius de la dependencia de la constante cinética en función de la inversa de la temperatura. Como se puede apreciar, los datos experimentales se ajustan satisfactoriamente empleando [6.6].

En este caso, en el eje de abscisas no se ha representado  $1/T$ , en su lugar aparece  $1000/T$  por lo que la pendiente de la recta que se obtenga se corresponderá con el valor de  $-E_a/1000R$ . Así, gracias a los datos obtenidos, es posible calcular la energía de activación para el proceso de descomposición del  $\beta$ -caroteno en las condiciones presentadas a lo largo de esta memoria.



**Figura 6.2:** Representación semi-logarítmica de  $k$  frente a  $1000/T$ . Las barras de error de los puntos a mayores valores en abscisas están tapadas por el propio punto.

La energía de activación obtenida con el ajuste mostrado en la Figura 6.2 fue de  $(51 \pm 3)$  kJ/mol. Al confrontar estos valores con el estudio antes mencionado<sup>2</sup> donde fue de 39 kJ/mol, en nuestro caso se observa un valor ligeramente superior. Esto puede deberse a que dichos autores, antes de llevar a cabo el calentamiento disolvieron la muestra en hexano y posteriormente evaporaron el disolvente antes de hacer reaccionar al carotenoide. Esta circunstancia puede variar el tamaño de partícula, lo que puede influir en la energía de activación. En nuestro caso la muestra se colocó sobre un vidrio y no fue disuelta en antes de su calentamiento, pudiendo desembocar esto en valores más elevados. Por otro lado, tampoco presentaron errores asociados al valor de la energía de activación.

Algunos investigadores<sup>8</sup> estudiaron la descomposición de  $\beta$ -caroteno en muestras de zanahorias deshidratadas y escaldadas, almacenadas a distintas temperaturas ( $27$ - $57^\circ C$ ) obteniendo unos valores de energía de activación para el proceso de degradación de  $(66.2 \pm 3.4)$  kJ/mol, resultado comparable al que aquí se presenta en cuanto a orden de magnitud

y muy cercano si se tienen en cuenta los errores asociados al valor de la energía de activación.

En otro estudio realizado<sup>5</sup> se determinaron las energías de activación medias en una matriz de aceite obteniendo valores de 109 kJ/mol, en este caso, el paso limitante de superar la energía de activación es mayor que el que se reporta en esta memoria, pudiendo asociarse este hecho a la ya comentada presencia de una matriz oleaginosa. La manera de proceder fue igual a la que se presenta en esta Tesis Doctoral en cuanto a tratamiento de datos.

Algo parecido sucede en otro caso<sup>9</sup> donde se investigó la oxidación del  $\beta$ -caroteno en oleínas de palma y en grasa de copra a altas temperaturas (120-180°C) mediante un modelo multirrespuesta, obteniendo valores de energía de activación de 51 kJ/mol y 171 kJ/mol respectivamente. En las oleínas de palma existe una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, que son más propensos a la oxidación en comparación con el caso de la grasa de copra, convirtiendo a la reacción en un proceso competitivo. A pesar de ser muy diferentes estos valores entre sí, uno de ellos se aproxima significativamente a los valores aquí manifestados.

Finalmente otros estudios<sup>4</sup>, tuvieron en cuenta la degradación en diversas matrices (aceite de soja, aceite de cacahuete y una mezcla de monoglicéridos provenientes del ácido cáprico y del ácido caprílico) a varias temperaturas (150-180°C). Mediante este procedimiento, se obtuvieron unos datos de 76.9, 92.8 y 72.3 kJ/mol respectivamente para muestras en las que se había eliminado la mayor parte de oxígeno del medio y valores de 59.0, 94.6 y 97.4 kJ/mol respectivamente para aquellas en las que el oxígeno permanecía disuelto en la matriz. Estos resultados fueron razonados suponiendo que la existencia de oxígeno en el medio tiene distintos comportamientos en función de la temperatura, es decir, mientras que la reacción de oxidación es la dominante a temperaturas menores de 150°C, cuando ésta se eleva por encima de esa magnitud las reacciones comienzan a ser más complejas y con un mecanismo diferente produciéndose una polimerización en cadena. Por otro lado, cuando no existe oxígeno en el medio, se pueden producir radicales en el carotenoide que reaccionan entre sí. En cambio, cuando el oxígeno está presente, los radicales libres de este mismo elemento pueden combinarse fácilmente con los radicales del carotenoide teniendo lugar la oxidación. Por lo tanto existen dos procesos diferentes, cada uno de ellos con una energía de activación. El caso más comparable al nuestro sería aquel en el que existe presencia de oxígeno. Las energías de activación para este tipo de

procesos son cercanas en orden de magnitud a las deducidas por nuestros estudios, aunque ligeramente superiores en valor. La estabilidad de los carotenoides depende en gran medida del tipo de aceite en el que se encuentra la muestra<sup>10, 11</sup>, siendo más estables en aquellos que presentan mayor cantidad de ácidos grasos insaturados.

En todos los casos, incluidos los del presente estudio, la energía de activación de la degradación térmica se encuentra por encima de los valores obtenidos para el proceso de isomerización *cis-trans* de este tipo de compuestos que fue estudiada en puré de zanahorias por algunos autores obteniéndose unos resultados de 11 kJ/mol<sup>12</sup>. Además es bien sabido que las posibles isomerizaciones no tienen influencia a la hora de determinar los parámetros cinéticos de la degradación<sup>5</sup>.

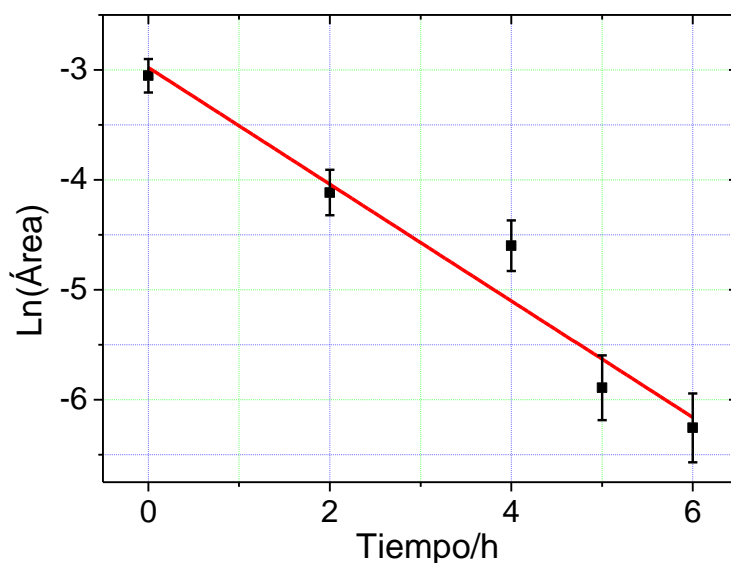
### 6.1.2. Licopeno

#### 6.1.2.1. *Cálculo de constantes cinéticas*

Como se ha comentado en otras secciones de la memoria, y de igual manera que se mostró en la Figura 5.11 del capítulo anterior, a pesar de que las muestras de licopeno tratadas se corresponden con extractos obtenidos de matrices orgánicas, el aislamiento es suficiente para poder observar la señal característica a  $958\text{ cm}^{-1}$  asociada a las vibraciones C-H fuera del plano acopladas con los enlaces C=C, que otros investigadores<sup>13</sup> no pudieron resolver en matrices biológicas.

De todas maneras, el valor de esta señal presenta una intensidad relativamente baja que hace difícil y poco exacto el empleo de la misma para el estudio de la cinética de degradación del licopeno. No obstante, a modo de ejemplo se llevó a cabo un estudio a una temperatura de  $115^{\circ}\text{C}$ , que se tomó como temperatura modelo al ser una temperatura intermedia con respecto al límite inferior y superior de las estudiadas en el  $\beta$ -caroteno.

La degradación térmica de licopeno ya fue estudiada mediante la aplicación de modelos cinéticos de primer orden<sup>5, 14</sup>. En la Figura 6.3 se presentan los datos experimentales alcanzados para un extracto de licopeno calentado a  $115^{\circ}\text{C}$  aplicando el orden cinético mencionado.



**Figura 6.3:** Representación semi-logarítmica de las áreas del pico de IR obtenido a  $958\text{ cm}^{-1}$  frente al tiempo de permanencia en el horno a  $115^\circ\text{C}$ . Errores experimentales  $<10\%$ .

De la pendiente del ajuste realizado se puede obtener la constante cinética para una temperatura de  $115^\circ\text{C}$  que toma valores de  $(9 \pm 1) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ . Como se ha mencionado con anterioridad, la descomposición térmica del licopeno ha sido ampliamente estudiada por otros autores con resultados diferentes. Algunos<sup>14</sup>, analizaron la estabilidad del polieno simulando una matriz biológica mediante disolventes orgánicos. Además, llevaron a cabo el calentamiento a distintas temperaturas en un baño de aceite ( $100\text{-}145^\circ\text{C}$ ). Para la temperatura de  $115^\circ\text{C}$ , obtuvieron una constante cinética de  $(4 \cdot 10^{-3})\text{ min}^{-1}$ , siendo esta reacción ligeramente más lenta que la obtenida en nuestro caso. Este hecho puede explicarse en base a la gran estabilidad del todo *trans* licopeno en matrices biológicas<sup>15-18</sup> por lo que, aunque se haya alcanzado la energía de activación necesaria para que la descomposición se produzca, ésta sucederá con una velocidad menor que en nuestro caso, ya que en los experimentos presentados en la Figura 6.3 el pigmento se encuentra separado parcialmente de dicha matriz.

Por otro lado, la constante cinética de descomposición térmica de licopeno también fue evaluada en aceite de cártamo a distintas temperaturas<sup>5</sup> ( $75\text{-}95^\circ\text{C}$ ) obteniendo valores a una temperatura de  $95^\circ\text{C}$  de  $(8.63 \pm 0.05) \cdot 10^{-3}\text{ min}^{-1}$ . Estos resultados son comparables con los presentados en esta parte de la Tesis Doctoral. Además, los citados autores, encontraron una pauta general comparando sus resultados con los obtenidos para  $\beta$ -caroteno, donde observaron que a la misma temperatura, las constantes cinéticas del licopeno eran

prácticamente el doble con respecto a otros carotenoides. En nuestro caso, si se compara dicho parámetro obtenido a 115°C en ambos polienos, se observa que la constante del licopeno es 1.6 veces mayor que la del  $\beta$ -caroteno, siendo este hecho bastante consistente con lo señalado hasta el momento. Por otro lado, los citados autores<sup>5</sup> afirman, que el proceso de descomposición del licopeno tiene que estar íntimamente ligado con la capacidad antioxidante del mismo<sup>5</sup>. Algunos grupos<sup>19</sup> ya recalcaron que el licopeno es capaz de desactivar al oxígeno singlete dos veces más si se compara con el  $\beta$ -caroteno, por lo que es lógico que sus constantes de velocidad sean superiores a las que se han presentado en la sección anterior.

## 6.2. Modelización Molecular

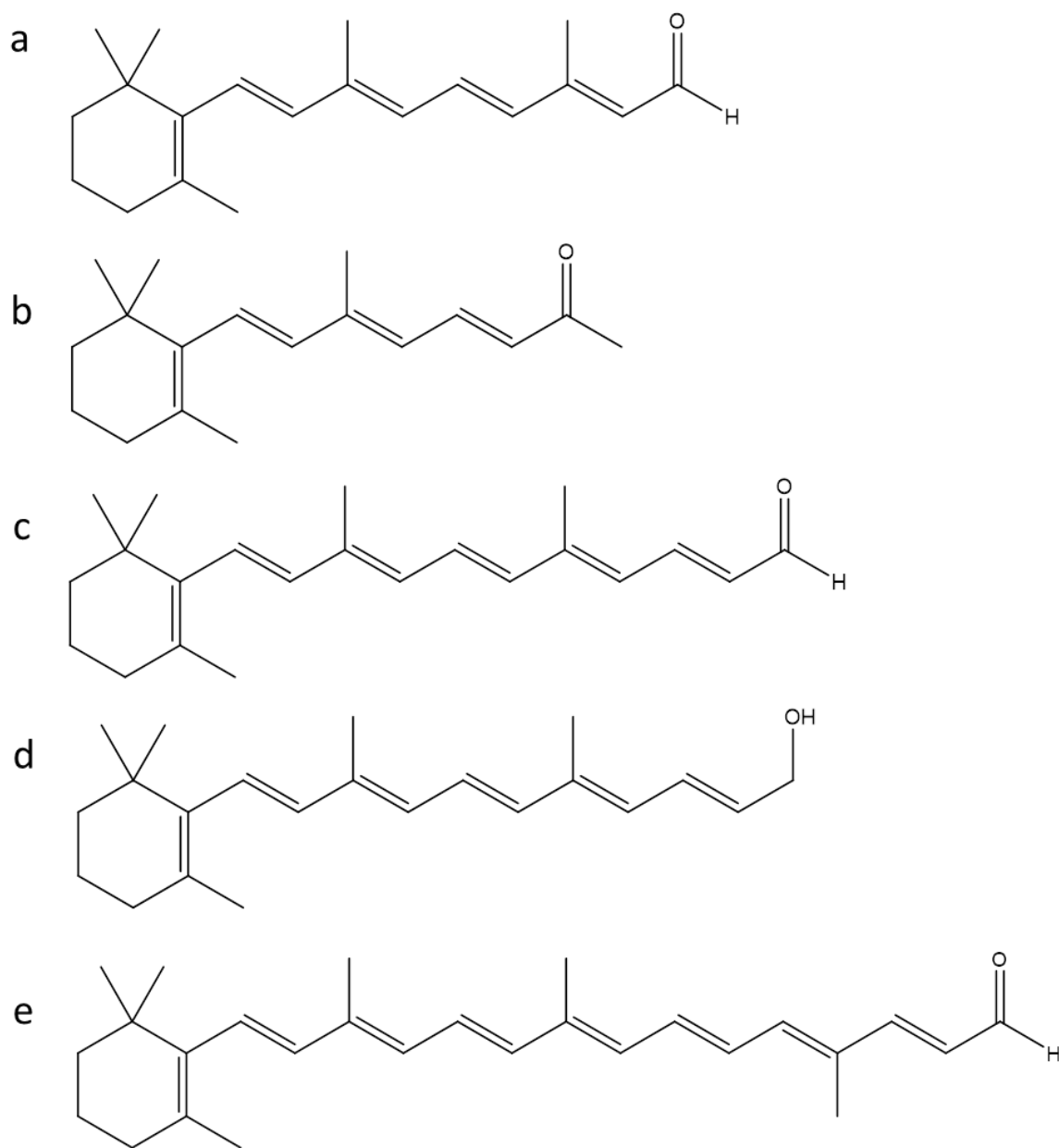
Los apocarotenales, las apocarotenonas y varios apocarotenoles son los principales productos de degradación térmica por autooxidación de carotenoides entre los que se incluye el  $\beta$ -caroteno<sup>20, 21</sup>. Algunos de los productos pertenecientes a las series mencionadas son: el retinal ( $C_{20}H_{28}O$ )<sup>22-24</sup>, la  $\beta$ -apo-13-carotenona ( $C_{18}H_{26}O$ )<sup>22, 25</sup>, el  $\beta$ -apo-14'-carotenal ( $C_{22}H_{30}O$ )<sup>22-24</sup>, el  $\beta$ -apo-10'-carotenal ( $C_{27}H_{36}O$ )<sup>23, 24</sup> y el  $\beta$ -apo-14-carotenol ( $C_{19}H_{30}O$ )<sup>25</sup>.

Debido a lo explicado anteriormente, a lo largo de estos análisis se van a considerar las posibles rupturas entre los carbonos 15-15', con la consiguiente formación de dos moléculas de retinal tras oxidación, la ruptura entre los carbonos 14'-13' que desencadenaría la formación del  $\beta$ -apo-14'-carotenal o su isómero estructural  $\beta$ -apo-14'-carotenol formándose también la  $\beta$ -apo-13-carotenona y finalmente, la ruptura del enlace 10'-9' que formaría el  $\beta$ -apo-10'-carotenal. Para más detalles de la numeración seguida véase Figura 5.12 del Capítulo 5.

Con la finalidad de predecir los espectros de infrarrojo en las citadas moléculas y estudiar su estabilidad, se han realizado modelizaciones moleculares a través de los dos métodos que ya fueron empleados para analizar el  $\beta$ -caroteno y el licopeno, es decir *mPW1PW91* y  $\omega$ B97xD.

Posteriormente, se ha procedido a comparar los espectros calculados de los posibles productos de degradación, con los medidos experimentalmente durante y tras la descomposición térmica de los carotenoides iniciales, argumentando cuál de ellos se ha formado en mayor proporción en función de los resultados.

En la Figura 6.4 se presentan las estructuras moleculares de los productos a analizar. Es interesante reparar en la similitud estructural existente entre ellos y en la permanencia de los dobles enlaces conjugados para todas ellas ya que proceden del mismo precursor.



**Figura 6.4:** Moléculas estudiadas por modelización molecular. **a:** Retinal, **b:**  $\beta$ -apo-13-carotenona, **c:**  $\beta$ -apo-14'-carotenal, **d:**  $\beta$ -apo-14'-carotenol, **e:**  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

*Método/base de cálculo mPWIPW91/6-31G\**

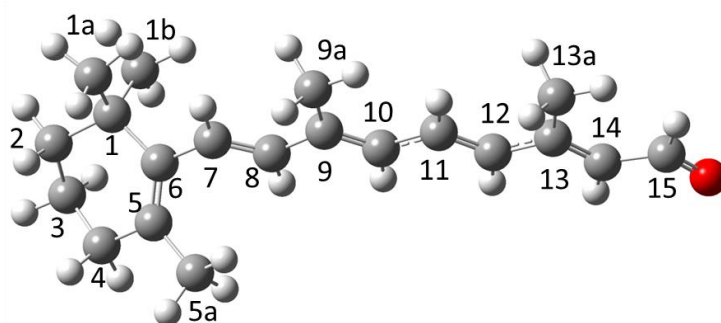
Las modelizaciones moleculares se realizaron mediante dos métodos diferentes, aunque con resultados muy similares. La información estructural de ambos métodos, y los parámetros y distribuciones del HOMO y el LUMO así como los espectros de infrarrojo calculados por el método  $\omega$ B97xD se pueden consultar en el Apéndice III de esta misma memoria. Para todos los casos, se procedió de igual manera que con las moléculas de  $\beta$ -caroteno y de licopeno presentadas en el Capítulo 5; en primer lugar se llevó a cabo una optimización de la geometría para posteriormente simular las vibraciones moleculares más características de cada molécula.

### 6.2.1. Retinal

La configuración espacial más estable en este tipo de moléculas presentaba una energía asociada de  $E = -853.96109 E_h$ .

#### 6.2.1.1. Estructura

En la Figura 6.5 se puede distinguir la geometría más estable calculada de la molécula de retinal cuya energía se acaba de presentar. Donde la esfera de color rojo representa al átomo de oxígeno, hecho que se mantendrá constante para todas las moléculas de este tipo que se expondrán a continuación.



**Figura 6.5:** Estructura molecular más estable del retinal.

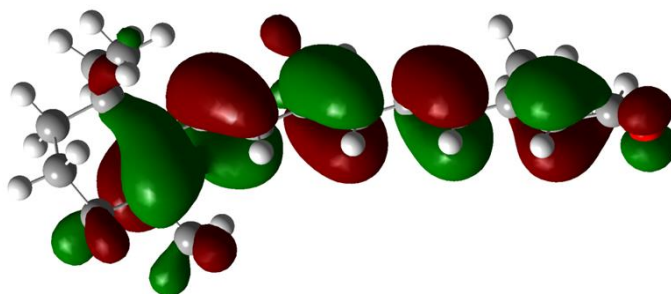
El efecto de la conjugación, representado por las zonas punteadas, es muy característico en este tipo de moléculas.

### 6.2.1.2. Orbitales HOMO y LUMO

De igual manera que se procedió con el licopeno y el  $\beta$ -caroteno y con la finalidad de estudiar la estabilidad de los productos formados, en este apartado se representan las distribuciones de los orbitales pertenecientes a las moléculas objeto de estudio. Los parámetros, que dan una idea de la estabilidad, fueron obtenidos con los datos de las energías de los orbitales frontera. Los valores de la dureza, la diferencia de energías HOMO-LUMO y la electrofilia se expondrán al final junto con los demás datos con el fin de poder compararlos.

#### Orbital HOMO del retinal

La distribución del orbital HOMO perteneciente al Retinal se puede observar en la Figura 6.6.



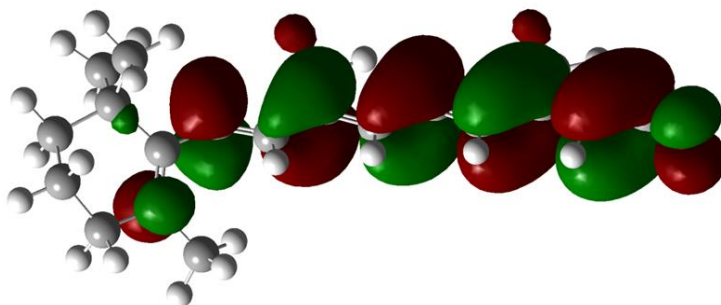
**Figura 6.6:** Orbital HOMO del retinal.

Obsérvese cómo ha cambiado el reparto de este tipo de orbitales con respecto al encontrado en el  $\beta$ -caroteno presentado en la Figura 5.13 del capítulo anterior; ahora, cubre a una mayor cantidad de átomos del anillo de  $\beta$ -ionona, aunque la deslocalización de cargas sigue estando muy presente debido a la conjugación de dobles enlaces que continua existiendo en esta estructura. Además, sobre el carbono carbonílico que soporta al aldehído la contribución es menor en comparación con la mayoría de los átomos de carbono de la estructura.

#### Orbital LUMO del retinal

En la Figura 6.7 se presenta la distribución espacial del orbital LUMO a lo largo de la estructura del retinal.

Como se puede apreciar, y tal como sucedía en casos anteriores, el signo de la función de onda cambia con respecto al HOMO. Asimismo, la simetría de los orbitales sigue siendo de tipo  $\pi$ .



**Figura 6.7:** Orbital LUMO del retinal.

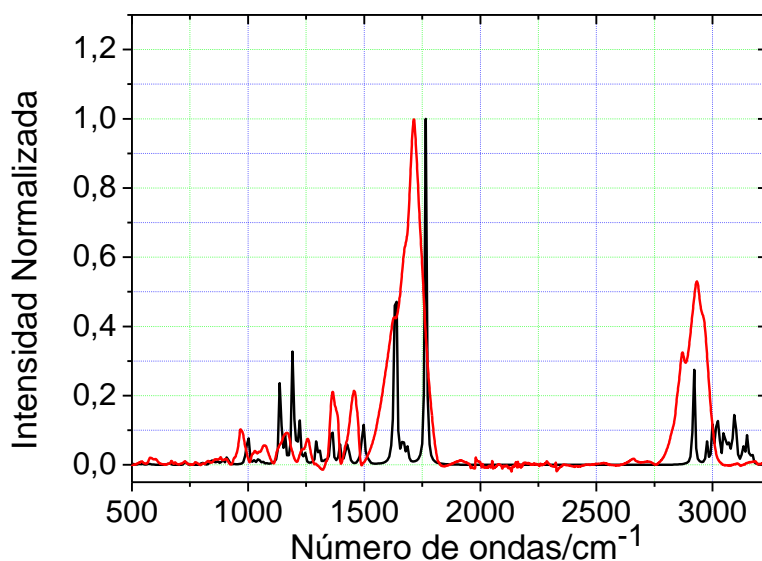
Al igual que sucedía tanto con el  $\beta$ -caroteno como con el licopeno, la naturaleza de los orbitales frontera para este tipo de moléculas es enlazante, ya que cada esfera de la parte central de la molécula se sitúa sobre dos átomos, lo que hace pensar, que en realidad son dos orbitales atómicos que han solapado lateralmente para formar los dobles enlaces con la ya mencionada naturaleza  $\pi$ .

#### 6.2.1.3. Espectro IR del retinal

En la Figura 6.8 se presenta el espectro de infrarrojo de una molécula de retinal calculado por modelización molecular superpuesto con un espectro obtenido experimentalmente.

Tanto para el espectro modelizado del retinal, como para el resto de los calculados que se van a presentar en este capítulo, se aplicó la corrección del eje de abscisas ya empleada para el licopeno y el  $\beta$ -caroteno<sup>26</sup>.

El espectro experimental mostrado se corresponde con el producto que alcanzó mayor índice de degradación. Como ya se ha explicado a lo largo de la memoria y en base a los valores de áreas obtenidas, se puede estimar que la muestra que presenta mayor grado de descomposición, se corresponderá con aquella que muestre menor área en la zona de  $966\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 6.8:** Espectros IR **Negro:** calculado para el retinal. **Rojo:** Experimental.

Tal y como se aprecia en la Tabla 5.6 del capítulo anterior, es la asociada a aquella que se trató térmicamente durante 3 horas en el horno a 130 °C, para la que se obtuvo un área correspondiente a  $0.1760 \text{ cm}^{-1}$ .

Como se manifiesta en la figura, existe una alta correlación en un gran número de señales. En primer lugar, vale la pena destacar que, aunque la conjugación siga estando presente, la señal de  $966 \text{ cm}^{-1}$  se ha debilitado drásticamente. Esto se debe por un lado a que la longitud de la conjugación ha disminuido, y por otro a que el hidrógeno del grupo aldehído vibra en sentido contrario con respecto a los enlaces C-H presentes en los carbonos que soportan los dobles enlaces. Por otro lado, aunque más débiles, existen similitudes en las señales cercanas a  $1200 \text{ cm}^{-1}$  ya que coinciden con las modelizadas en gran medida. Además, en la parte central, se pueden advertir dos picos muy intensos en el caso del modelo, que dominan el espectro. Sin embargo, en el obtenido experimentalmente, únicamente se ve una señal ancha que cubre a las dos proporcionadas por los cálculos. Estas señales son las correspondientes a las tensiones C=C (menores números de ondas) y a las tensiones de un grupo carbonilo (C=O). Respecto a la posición del grupo carbonilo, conviene hacer una aclaración. En el espectro experimental esta señal C=O aparece a  $1715 \text{ cm}^{-1}$ , en la bibliografía se predice que este grupo funcional debe aparecer entre  $1765\text{-}1645 \text{ cm}^{-1}$ , disminuyendo este desplazamiento con la conjugación<sup>27</sup>.

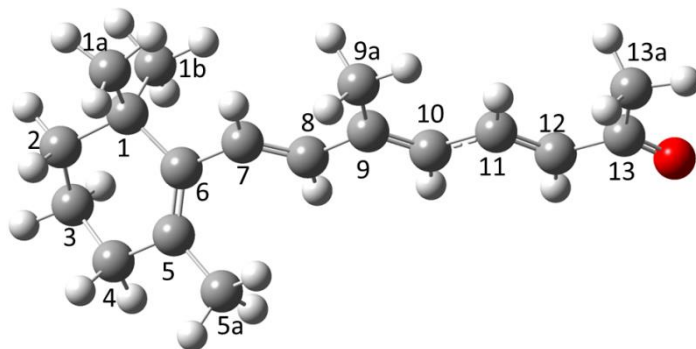
Finalmente, en la parte cercana a  $3000\text{ cm}^{-1}$  en el caso del modelo, se pueden observar dos grupos de señales. La señal aguda que aparece a menores números de ondas, asignada a la vibración C-H del carbono carbonílico del aldehído y un multiplete que está asociado a las vibraciones de los enlaces C-H tanto de los grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) como de los hidrógenos enlazados a carbonos  $\text{sp}^2$  ( $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ). En el caso del espectro experimental no se aprecian estos dos grupos de señales, aunque sí se pueden percibir dos partes diferenciadas. En este contexto, la zona redondeada se corresponde con las vibraciones C-H, mientras que la señal que sobresale a menores números de ondas se relaciona con la asociada al grupo aldehído.

### 6.2.2. *$\beta$ -apo-13-carotenona*

Para este tipo de moléculas, la energía calculada fue  $E = -776.58173 E_h$  que se corresponde con la configuración más estable obtenida mediante la metodología de cálculo empleada.

#### 6.2.2.1. Estructura

La apariencia estructural de la geometría más estable para esta molécula se presenta en la Figura 6.9. Como se aprecia, el grupo funcional ha cambiado con respecto a la molécula mostrada anteriormente, y en este caso se trata de una cetona.



**Figura 6.9:** Estructura molecular más estable de la  $\beta$ -apo-13-carotenona.

Se puede confirmar que pesar de haberse reducido el tamaño de la molécula con respecto a la de partida, el efecto de la conjugación permanece entre los átomos centrales.

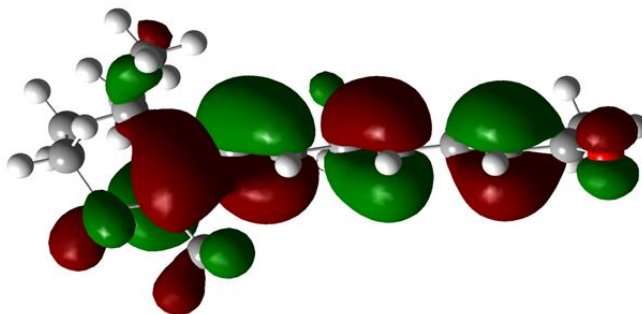
#### 6.2.2.2. Orbitales HOMO y LUMO

Análogamente a los casos anteriores, se estudió la distribución de los orbitales HOMO y LUMO obteniendo, gracias a los datos de sus energías, los parámetros ya calculados para

otras moléculas que se compararán con los demás productos de degradación simulados en epígrafes posteriores.

#### Orbital HOMO de la $\beta$ -apo-13-carotenona

En la Figura 6.10 se presenta la distribución del orbital HOMO calculada para este tipo de moléculas. El reparto a lo largo de los dobles enlaces conjugados es muy similar a las ya presentadas.

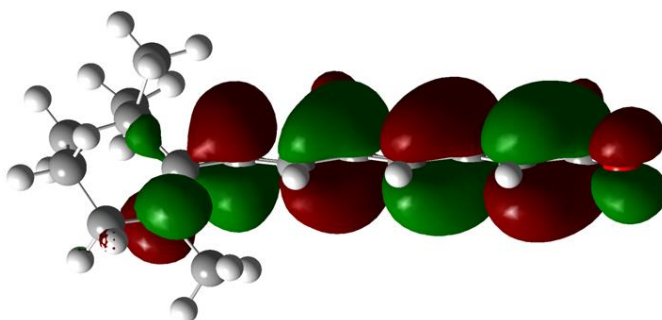


**Figura 6.10:** Orbital HOMO de la  $\beta$ -apo-13-carotenona.

De igual manera que sucedía con el grupo aldehído del retinal, el carbono carbonílico presenta una baja contribución de este tipo de orbitales y el anillo de  $\beta$ -ionona la ha incrementado con respecto a la molécula de partida ( $\beta$ -caroteno).

#### Orbital LUMO de la $\beta$ -apo-13-carotenona

En la Figura 6.11 se puede apreciar la distribución del orbital LUMO para este tipo de productos. Al igual que sucedía en el caso anterior, también se trata de orbitales enlazantes.

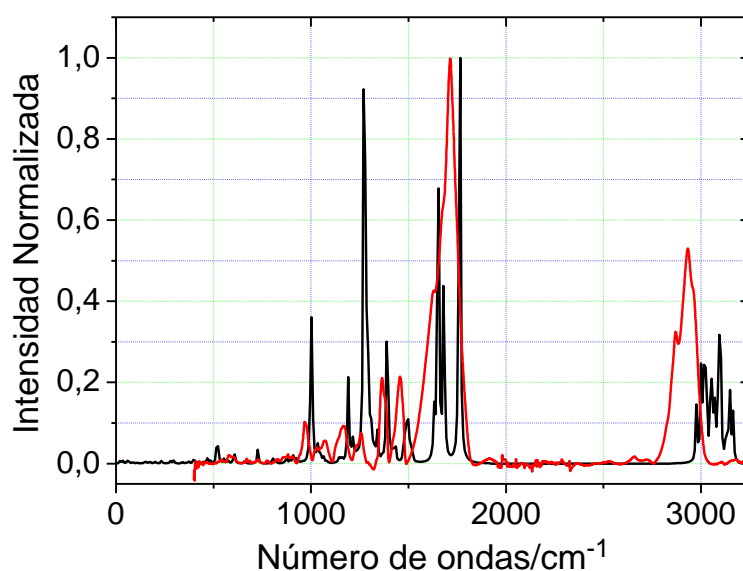


**Figura 6.11:** Orbital LUMO de la  $\beta$ -apo-13-carotenona.

Este reparto es similar al encontrado en otras moléculas que ya han sido descritas, ya que los cambios en los signos de la función de onda se producen de igual manera.

6.2.2.3. Espectro IR de la  $\beta$ -apo-13-carotenona

En la Figura 6.12 se presenta el espectro de infrarrojo predicho para la molécula que se está estudiando, superpuesto con el obtenido experimentalmente que se corresponde con la muestra que permaneció en el horno a 130°C durante 3 horas.



**Figura 6.12:** Espectros IR Negro: calculado para la  $\beta$ -apo-13-carotenona. Rojo: Experimental.

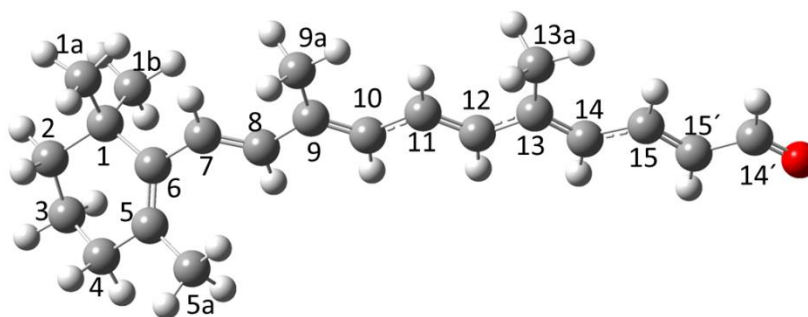
Tal y como se aprecia en la figura, la coincidencia no es tan buena si se coteja con la obtenida para el retinal. En primer lugar el pico cercano a 1000  $\text{cm}^{-1}$  que es el que se ha empleado para monitorizar la desaparición del  $\beta$ -caroteno, presenta una intensidad moderada en comparación con el de la muestra. Esto se debe a que no existe ningún hidrógeno (al contrario de lo que sucedía con el aldehído) que se mueva en la dirección opuesta a los enlaces C-H de los carbonos  $\text{sp}^2$ . En su lugar hay un grupo  $\text{CH}_3$  cuyos hidrógenos se mueven de la misma manera que los soportados por los carbonos que forman dobles enlaces. Por otro lado, en el espectro obtenido por modelización se puede observar una señal muy intensa cercana a 1270  $\text{cm}^{-1}$ , asignada a las vibraciones C-CO-C. Esta vibración no es tan intensa en aldehídos ya que el carbono carbonílico únicamente se enlaza con un carbono. Finalmente, en la región de 3000  $\text{cm}^{-1}$  no aparecen dos grupos de señales como sucedía para los aldehídos ya que únicamente se pueden observar las señales correspondientes a los metilos.

### 6.2.3. *$\beta$ -apo-14'-carotenal*

Volviendo a la familia de los apocarotenales, se llevaron a cabo modelizaciones para esta molécula, que únicamente se diferencia del retinal en que presenta dos carbonos adicionales, siendo el de la posición 14' el que soporta al oxígeno. La energía obtenida para el citado compuesto fue de  $E = -931.35031 \text{ Eh}$ .

#### 6.2.3.1. Estructura

La geometría más favorable energéticamente hablando para el  $\beta$ -apo-14'-carotenal se presenta en la Figura 6.13.



**Figura 6.13:** Estructura molecular más estable del  $\beta$ -apo-14'-carotenal.

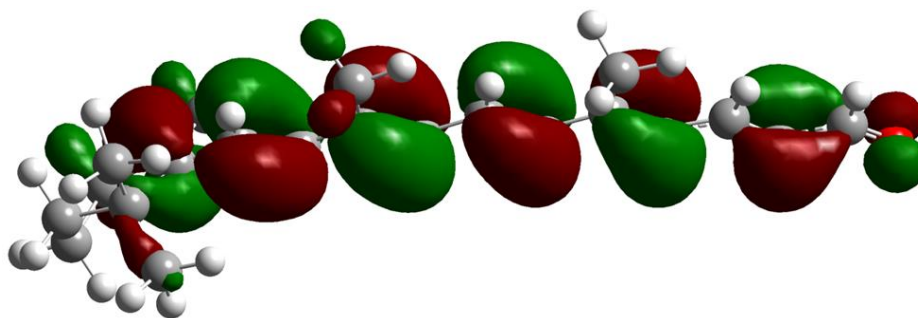
La parte central de la molécula es muy similar a otras estructuras ya presentadas, persistiendo el efecto de la conjugación, en este caso a lo largo de una gran parte de la estructura, tal y como indican los enlaces punteados.

#### 6.2.3.2. Orbitales HOMO y LUMO

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de los productos generados mediante sus propiedades ligadas a los orbitales frontera, se llevaron a cabo cálculos teóricos que permitieran evaluar sus energías.

##### Orbital HOMO del $\beta$ -apo-14'-carotenal

En la Figura 6.14 se presenta la distribución del orbital HOMO para este tipo de moléculas. Como se puede apreciar el signo de la función de onda cambia periódicamente tal y como sucedía en otras moléculas antes presentadas.

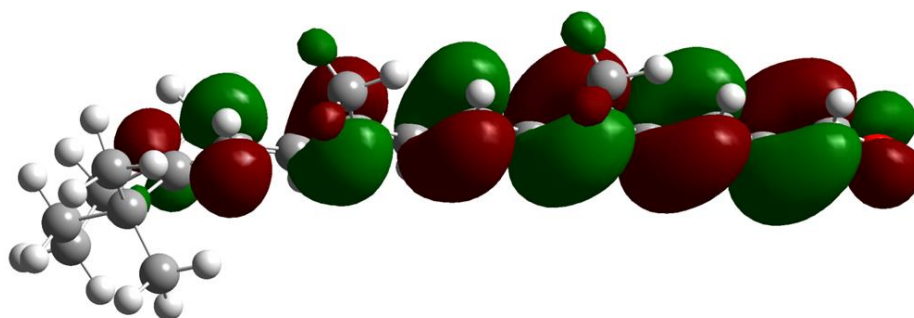


**Figura 6.14:** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal.

De igual manera que en casos anteriores, el carbono carbonílico se encuentra con una baja contribución orbitalaria prácticamente despreciable en comparación con los carbonos centrales de la estructura molecular.

Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal

En la Figura 6.15 se puede vislumbrar cómo queda distribuido el orbital LUMO para esta molécula tras los cálculos realizados.

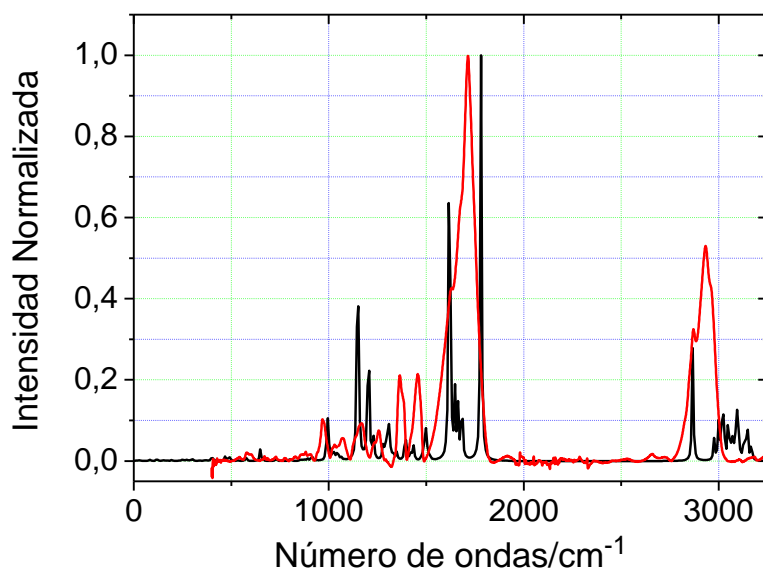


**Figura 6.15:** Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal.

El reparto es el esperable para una molécula que presenta dobles enlaces conjugados a lo largo de toda su estructura y muy similar a las ya descritas para este tipo de moléculas, aunque, en este caso, la contribución orbitalaria en el anillo lateral es prácticamente despreciable.

### 6.2.3.3. Espectro IR del $\beta$ -apo-14'-carotenal

Si se tiene en cuenta la comparación entre ambos espectros, lo primero que llama la atención es que la coincidencia es bastante alta; al igual que sucedía con el retinal, se continúa apreciando la señal del aldehído en la zona de  $3000\text{ cm}^{-1}$  y las señales de intensidad moderada cercanas a  $1200\text{ cm}^{-1}$  que se corresponden con la vibración del carbono carbonílico y su contiguo.



**Figura 6.16:** Espectros IR. **Negro:** Calculado para el  $\beta$ -apo-14'-carotenal. **Rojo:** Experimental.

Por el contrario, en torno a  $1100\text{ cm}^{-1}$  la intensidad de la señal modelizada difiere significativamente de la obtenida experimentalmente. A pesar de este efecto, la semejanza entre ambos espectros es bastante aceptable como ya se ha visto con otros compuestos también pertenecientes a los apocarotenales.

#### 6.2.4. *$\beta$ -apo-14'-carotenol*

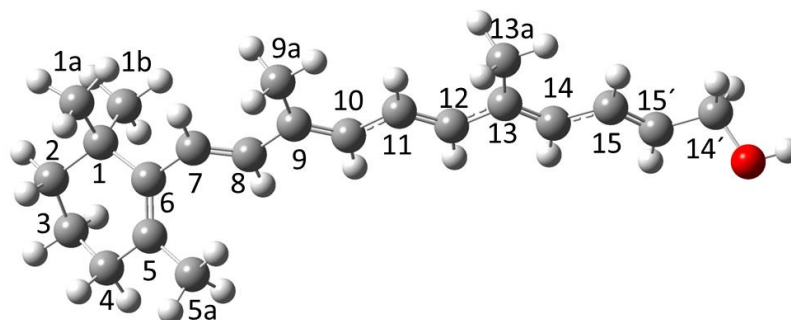
A modo de comparación, se llevó a cabo una modelización molecular de un alcohol similar al retinol, aunque con dos carbonos más. Esta molécula es muy parecida por tanto a la presentada anteriormente, aunque en vez de contener un carbonilo posee el grupo funcional alcohol por lo que se trata de isómeros estructurales.

Como se ha indicado anteriormente, el primer paso para llevar a cabo este tipo de cálculos, pasa por una optimización de la geometría. Para ello se desarrolla un proceso iterativo hasta que se obtiene un mínimo energético. En este caso, el valor de energía alcanzado para esta molécula en su configuración geométrica más estable fue de  $E=-932.54388\text{ Eh}$ .

Como se puede intuir, este valor es muy similar al de la molécula anterior ya que contienen el mismo número de átomos.

6.2.4.1. Estructura

La estructura más estable, asociada a la energía antes comentada se muestra en la Figura 6.17.



**Figura 6.17:** Estructura más estable para el  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

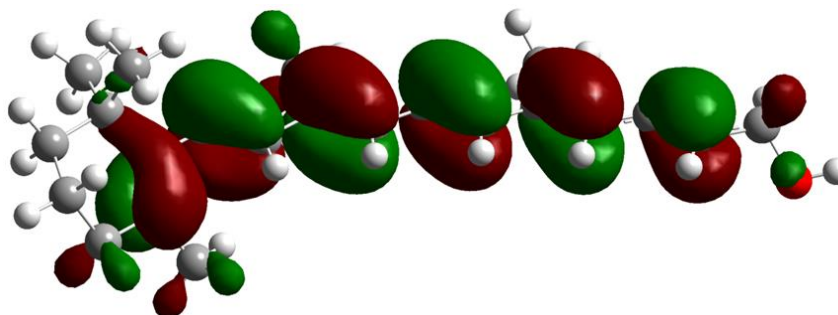
En este caso al tratarse de un alcohol, el carbono que lo soporta se une a dos hidrógenos, además el oxígeno se une a otro hidrógeno, dando lugar a otras contribuciones en el espectro vibracional (véase más adelante).

6.2.4.2. Orbitales HOMO y LUMO

Los cálculos realizados para los orbitales HOMO y LUMO se presentan a continuación.

Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol

El reparto de los orbitales HOMO de la molécula bajo investigación se puede ver en la Figura 6.18.

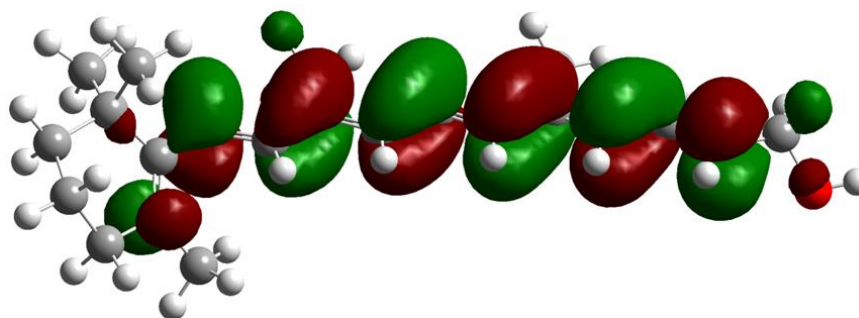


**Figura 6.18:** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

Al cambiar el grupo funcional existe una cierta contribución orbital sobre el carbono que soporta al oxígeno.

Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol

La distribución del orbital LUMO perteneciente a la molécula de  $\beta$ -apo-14'-carotenol se presenta a continuación en la Figura 6.19.

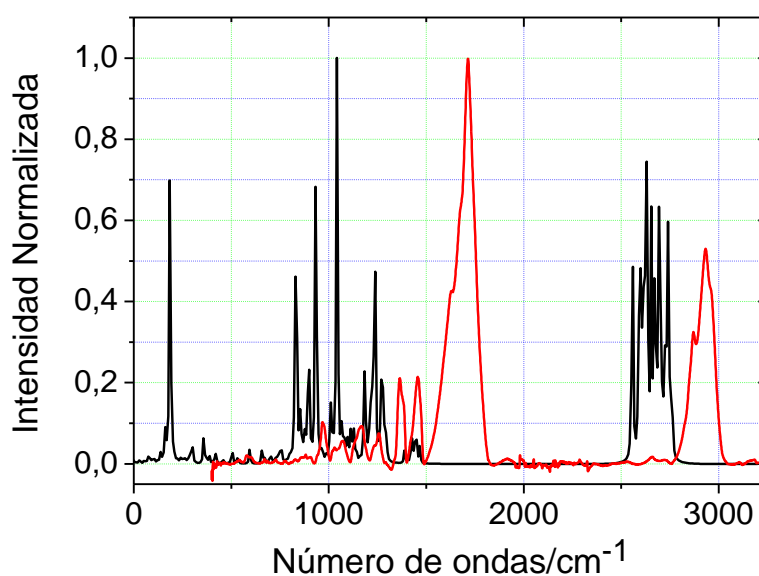


**Figura 6.19:** Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

Si se comparan los signos de la función de onda a lo largo de la estructura se observa cómo éstos cambian de un orbital a otro, por lo que se puede inferir que estos cálculos se han realizado adecuadamente.

#### 6.2.4.3. Espectro IR del $\beta$ -apo-14'-carotenol

En la Figura 6.20 se presenta una comparación entre el espectro de infrarrojo perteneciente a este alcohol calculado mediante computación comparado con el experimental.



**Figura 6.20:** Espectros IR. **Negro:** Calculado para el  $\beta$ -apo-14'-carotenol. **Rojo:** Experimental.

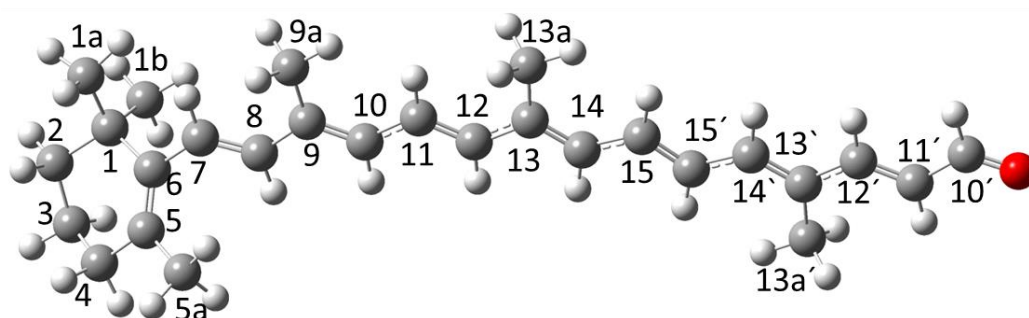
Tal y como se puede desprender de esta superposición de espectros, la coincidencia de ambos es muy pobre debido a la contribución de modos vibracionales diferentes, al tratarse de otro grupo funcional (alcohol) en comparación con los ya presentados, cuya vibración de flexión aparece en torno a  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Por otro lado, en la zona correspondiente al carbonilo no se aprecia ninguna señal de alta intensidad, y consecuentemente no se tendrá en cuenta como posible producto de degradación.

#### 6.2.5. *$\beta$ -apo-10'-carotenal*

La energía perteneciente a la configuración más estable calculada para esta molécula fue de  $E = -1125.43360\text{ Eh}$ .

##### 6.2.5.1. Estructura

La estructura más estable de este tipo de moléculas, correspondiente a la energía antes mostrada se expone en la Figura 6.21.



**Figura 6.21:** Estructura más estable para el  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

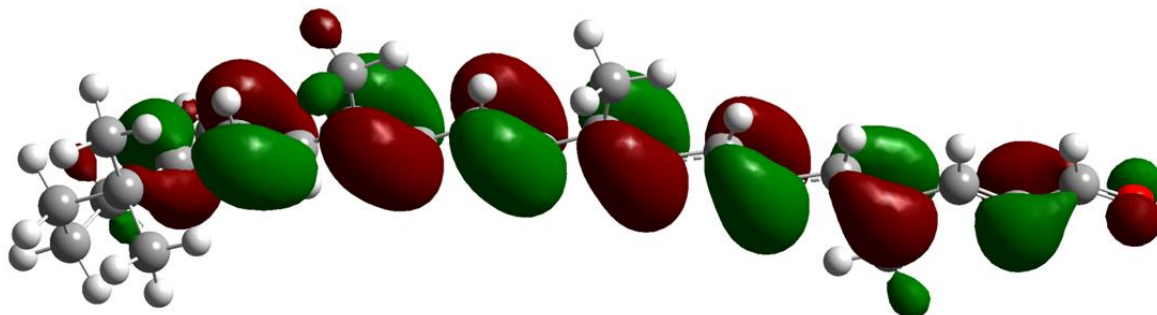
Al aumentar la longitud de la cadena también lo hace la extensión de la conjugación a lo largo de la estructura, hecho que puede contrastarse con las líneas punteadas situadas sobre los enlaces simples de la representación mostrada y mediante las distancias de enlace presentadas en el Apéndice III.

##### 6.2.5.2. Orbitales HOMO y LUMO

De igual manera que para el resto de moléculas y en orden de obtener resultados comparativos, para esta molécula también se realizaron los cálculos pertenecientes a los orbitales frontera.

Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal

En la Figura 6.22 se muestra el orbital HOMO para una molécula cuya configuración espacial ha sido presentada en la Figura 6.21 y que contiene un grupo aldehído. Merece la pena destacar la baja densidad alrededor del carbono carbonílico, y cómo la distribución de orbitales se asemeja a la esperada para un polieno.

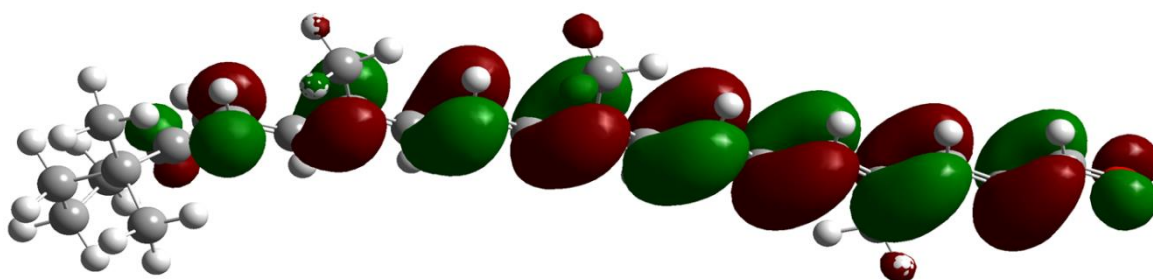


**Figura 6.22:** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

La distribución principal se produce sobre aquellas zonas cuya contribución de doble enlace es mayor, hecho que se puede confirmar con las distancias de enlace mostradas en el Apéndice III con una escasa contribución en el anillo lateral.

Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal

En la Figura 6.23 se puede observar el orbital LUMO de una molécula de  $\beta$ -apo-10'-carotenal.



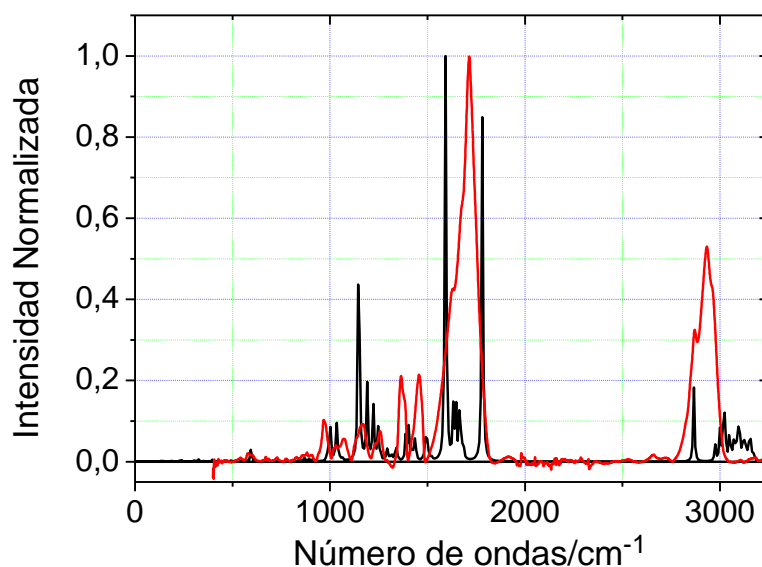
**Figura 6.23:** Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal

El reparto es muy similar al presentado por otras moléculas y es consecuente con los cálculos realizados. Además, posee signo contrario de la función de onda si se compara con el orbital HOMO. Asimismo, la mayor parte de la distribución se ubica sobre las zonas donde existe una mayor contribución al enlace simple, tal y como se comprueba con las distancias internucleares presentadas en el Apéndice III.

6.2.5.3. Espectro IR del  $\beta$ -apo-10'-carotenal

Como se viene haciendo hasta el momento, en la Figura 6.24 se puede observar el espectro IR de la muestra más degradada (la que permaneció a 130°C durante 3 horas), comparado con el calculado por métodos computacionales.

Lo primero que llama la atención, es la señal que domina el espectro, en este caso no se corresponde con la asignada al carbonilo, sino con la vibración en fase de los dobles enlaces que se distribuyen a lo largo de la cadena. Al tratarse de la molécula con la cadena lineal insaturada más larga de todos los productos evaluados, es lógico pensar que la señal asignada a su vibración tenga una mayor intensidad. Además, cerca de los  $1200\text{ cm}^{-1}$  existe una vibración de intensidad moderada que se corresponde con la tensión entre el carbono carbonílico y su contiguo, la citada vibración, presenta una intensidad débil en el caso de la muestra medida experimentalmente.



**Figura 6.24:** Espectros IR **Negro:** Calculado para el  $\beta$ -apo-10'-carotenal. **Rojo:** Experimental.

En la zona de  $3000\text{ cm}^{-1}$  la vibración asociada a la tensión del hidrógeno del aldehído está significativamente separada del grupo de señales asignadas a los C-H y  $\text{CH}_3$  por lo que, en caso de que esta molécula formase parte de la muestra, la señal espectral de los resultados experimentales se encontraría más resuelta.

Como se puede apreciar, la señal cercana a  $1200\text{ cm}^{-1}$  es considerablemente más intensa en comparación con los resultados experimentales obtenidos, lo que hace pensar que, en caso de encontrarse esta molécula, lo haría en bajas proporciones.

### 6.3. Comparación de estabilidades

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los cálculos realizados por modelización molecular se puede dar una idea de la estabilidad asociada a los posibles productos de degradación.

Para ello, en la Tabla 6.2 se presentan los resultados de los parámetros más significativos que han sido calculados mediante las energías pertenecientes a los orbitales HOMO y LUMO de cada molécula analizada. Estos parámetros han sido calculados de igual manera que en las moléculas de  $\beta$ -caroteno y licopeno del capítulo anterior.

**Tabla 6.2:** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la conformación más estable del licopeno. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^0$  (electrofilia global).

Productos de degradación	$\beta$ - apo-10- carotenal	$\beta$ - apo-13'- carotenona	$\beta$ - apo-14'- carotenal	$\beta$ - apo-14'- carotenol	Retinal
$-E_{\text{HOMO}}/\text{eV}$	5.16	5.78	5.44	5.03	5.59
$-E_{\text{LUMO}}/\text{eV}$	2.50	1.98	2.37	1.60	2.22
$\Delta E/\text{eV}$	2.66	3.80	3.07	3.42	3.38
$\eta/\text{eV}$	1.33	1.90	1.54	1.71	1.69
$\sigma/\text{eV}^{-1}$	0.75	0.53	0.65	0.58	0.59
$\mu/\text{eV}$	-3.83	-3.88	-3.91	-3.32	-3.91
$\omega^0/\text{eV}$	5.50	3.96	4.96	3.22	4.52

Teniendo en cuenta que la dureza se define como la resistencia al cambio del número de electrones en una molécula, puede ser un buen indicador de la estabilidad<sup>28</sup>. Por lo tanto, observando los resultados de la Tabla 6.2, se puede afirmar que las tres moléculas más estables son la  $\beta$ -apo-13-carotenona, el  $\beta$ -apo-14'-carotenol, y dentro de la serie de los

apocarotenales, el retinal. De igual manera la fragilidad química puede indicar el grado de reactividad con idéntico resultado en cuanto a la estabilidad comentada.

En el marco de la teoría de Kopmans la afinidad electrónica de un sistema se puede aproximar a la diferencia de energía entre orbital LUMO y el continuo de la disociación que en este caso se corresponde con el valor de  $0^{29-31}$ . Por lo tanto, la afinidad electrónica vendrá dada por la energía del orbital LUMO cambiada de signo. En este caso, los mayores valores del parámetro son los presentados por la cetona y el retinal, moléculas a las que, encontrándose en su estado fundamental y gaseoso, habrá que aplicarles una alta energía para que capturen un electrón, por lo que también puede ser una buena aproximación para hacerse una idea de su estabilidad.

Como se comentó en el capítulo anterior, el índice de electrofilia global da una idea de cómo varía la energía cuando un sistema es saturado con electrones y por lo tanto es una medida del poder electrofílico<sup>32</sup>, observándose los valores más altos para el  $\beta$ -apo-10'-carotenal y los más bajos en el caso del  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

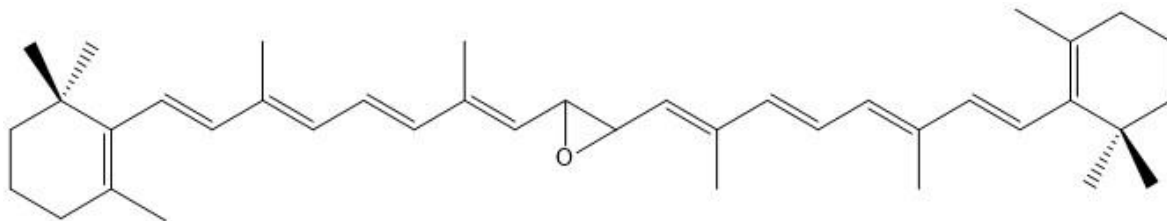
#### **6.4. Comentarios sobre el mecanismo de degradación térmica**

Aunque se sale del objetivo principal de la presente Tesis Doctoral, merece la pena comentar algunas características mecanísticas del proceso de degradación térmica del  $\beta$ -caroteno.

Como ya se ha mencionado en la parte inicial de la sección 6.2, son muchos los autores que se han centrado en la caracterización de los diversos tipos de productos de degradación térmica del  $\beta$ -caroteno donde destacan los apocarotenales, entre éstos se pueden encontrar el retinal, el  $\beta$ -apo-14'-carotenal y el  $\beta$ -apo-10'-carotenal<sup>22-24</sup>, apareciendo también como principales en algunos artículos de revisión<sup>33</sup>.

Así, algunos autores fueron capaces de separar los productos de degradación mediante cromatografía<sup>25, 34</sup>. Adicionalmente estos últimos consiguieron aislar a través de HPLC el todo *trans*-15,15'-epoxi- $\beta$ -caroteno, cuya señal se muestra en el recuadro interior de la Figura 1 de la referencia 34, con un tiempo de retención de aproximadamente 50 minutos.

Este producto es muy interesante para el caso que nos ocupa y su estructura se puede ver en la Figura 6.25.



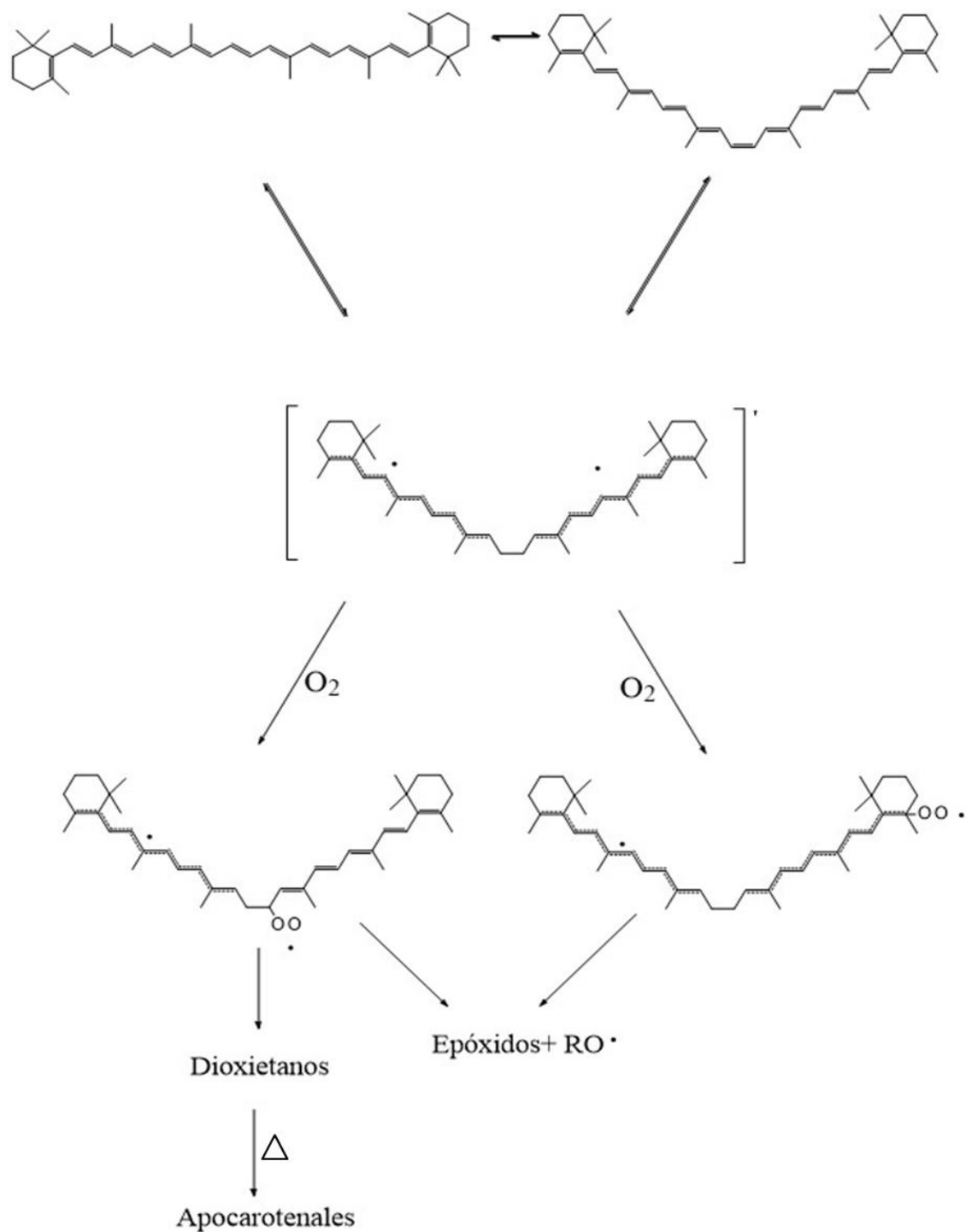
**Figura 6.25:** Estructura del todo-trans-15,15'-epoxi- $\beta$ -caroteno.

Teniendo en cuenta la estructura molecular del citado epóxido, queda claro que la posición 15-15' podría ser susceptible de enlazarse con el oxígeno.

En este punto, merece la pena comentar que una de las maneras más comunes de reactividad de carotenoides con el oxígeno en estado fundamental por vía térmica, es a través de una primera etapa de isomerización *cis-trans* seguida de la formación de un birradical que posteriormente da lugar a los epóxidos y apocarotenales<sup>35</sup>. Esto, se encuentra en consonancia con los mecanismos sugeridos por otros estudios<sup>36</sup> cuyas etapas fundamentales se presentan a continuación en la Figura 6.26.

A la vista de los resultados alcanzados mediante modelización y experimentalmente, y sabiendo que el alcohol ha sido descartado dada la baja coincidencia de señales en comparación con la muestra degradada. Se puede tener en cuenta que la existencia de la cetona es poco probable, o al menos, se da en cantidades insignificantes debido a la ausencia de la banda encontrada en el espectro experimental a  $2870\text{ cm}^{-1}$ . Así, parece confirmarse la formación de algunos apocarotenales a lo largo del proceso de degradación térmica.

De esta manera se puede afirmar, que todos los resultados presentados dan soporte al mecanismo propuesto por otros los autores cuyos estudios vislumbraron el mecanismo de la Figura 6.26<sup>36</sup>.



**Figura 6.26:** Mecanismo sugerido por otros investigadores<sup>36</sup>.

Al menos en lo referente a la formación de los apocarotenales y en especial a la formación del retinal. Del mismo modo, también parece clara la formación de otros compuestos sin identificar, que deberán ser analizados en futuras investigaciones, fuera del marco del presente trabajo, más orientado a evaluar tanto teórica como experimentalmente la estabilidad relativa de los dos carotenoides estudiados a lo largo de la memoria.

## 6.5. Referencias

1. Colle, I. J. P., Lemmens, L., Knockaert, G., Van Loey, A., and Hendrickx, M. (2016) Carotene Degradation and Isomerization during Thermal Processing: A Review on the Kinetic Aspects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56(11)**: 1844-1855.
2. Chen, B. H., and Huang J. H. (1998). Degradation and isomerization of chlorophyll a and  $\beta$ -carotene as affected by various heating and illumination treatments. *Food Chem.* **62(3)**: 299-307.
3. Aparicio-Ruiz, R., Mínguez-Mosquera, M. I., and Gandul-Rojas, B. (2011). Thermal degradation kinetics of lutein,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in virgin olive oils. *J. Food Comp. Anal.* **24**: 811-820.
4. Qiu, D., Shao, S-X., Zhao, B., Wu Y-C., Shi, L-F., Zhou J-C., and Chen Z-R. (2012). Stability of  $\beta$ -carotene in thermal oils. *J. Food Biochem.* **36**: 198-206.
5. Henry, L. K., Catignani, G. L., and Schwartz S. J. (1998). Oxidative Degradation Kinetics of Lycopene, Lutein, and 9-*cis* and All-*trans*  $\beta$ -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75(7)**: 823-829.
6. Haralampu, S. G., and Karel, M. (1983). Kinetic Models for Moisture Dependence of Ascorbic Acid and  $\beta$ -Carotene Degradation in Dehydrated Sweet Potato. *J. Food Sci.* **48**:1872–1873 (1983).
7. Pesek, C. A., and Warthesen, J. J. (1988) Characterization of the Photodegradation of  $\beta$ -Carotene in Aqueous Model Systems, *J. Food Sci.* **53**:1517–1520.
8. Koca, N., Burdurlu, H. S., and Karadeniz, F. (2007). Kinetics of color changes in dehydrated carrots. *J. Food Eng.* **78**: 449-455.
9. Achir, N., Pénicaud, C., Avallone, S., and Bohuon, P. (2011). Insight into  $\beta$ -Carotene Thermal Degradation in Oils with Multiresponse Modeling. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **88**: 2035-2045.
10. Ganguli, O., Bicanic, D., Bonifačić, M., Nicoli, M.C., and Chirtoc, M. (2003). Optothermal window method for on-line monitoring of decay kinetics of *trans*- $\beta$ -carotene in thermally treated vegetable oils. *Eur. Food Res. Technol.* **217(1)**: 74-79.

11. Jia, M., Kim, H. J., and Min, D.B. (2007). Effects of soybean oil and oxidized soybean oil on the stability of  $\beta$ -carotene. *Food Chem.* **103**: 695-700.
12. Lemmens, L., De Vleeschouwer, K., Moelants, K. R., Colle, I. J., Van Loey A. M., and Hendrickx, M. E. (2010). Beta-carotene isomerization kinetics during thermal treatments of carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* **58(11)**: 6816-6824.
13. Baranska, M., Schütze, W., and Schulz, H. (2006). Determination of Lycopene and  $\beta$ -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR and NIR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **78(24)**: 8456-8461.
14. Huawei, Z., Xiaowen, W., Elshareif, O., Hong L., Qingrui, S. and Lianfu, Z. (2014). Isomerisation and degradation of lycopene during heat processing in simulated food system. *Int. Food. Res. J.* **21(1)**: 45-50.
15. D'Evoli, L., Lombardi-Boccia, G., and Lucarini, M. (2013). Influence of Heat Treatments on Carotenoid Content of Cherry Tomatoes. *Foods.* **2**: 352-363.
16. Nguyen M. L., and Schwartz, S. J. (1998). Lycopene stability during food processing. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **218**: 101-105.
17. Shierlie, J., Bretzel, W., Buhler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K., and Schuep, W. (1997). Content and isomeric ratios of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.* **59**: 459-465.
18. Knockaert, G., Pulissery, S. K., Colle, I., van Buggenhout, S., Hendrickx, M., and van Loey A. (2012). Lycopene degradation, isomerization and *in vitro* bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing. *Food Chem.* **135**: 1290-1297.
19. Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. (1989). Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 532-538.
20. Stutz, H., Bresgen, N., Eckl, P. M. Analytical tolols for the analysis of  $\beta$ -carotene and its degradation products. *Free Radic. Res.* **49(5)**: 650-680.
21. Caitlins, S., McClements, D. J., Weiss, J., and Decker, A. E. (2010). Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50(6)**: 515-532.

22. Ouyang, J. M., Daun, H., Chang, S. S. and Ho, C-T. (1980) Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization. *J. Food Sci.* **45**: 1214-1217.
23. Marty, C., Berset, C. (1988). Degradation products of *trans*-beta-carotene produced during extrusion cooking. *J. Food Sci.* **53**: 1880-1886.
24. Marty, C., and Berset, C. (1990). Factors affecting the thermal degradation of all-*trans*-beta-carotene. *J. Agr. Food Chem.* **38**: 1063-1067.
25. Onyewu, P. N., Ho, C-T., and Daun, H. (1986). Characterization of  $\beta$ -Carotene Thermal Degradation Products in a Model Food System. *J. Am. Oil Soc.* **63**: 1437-1441.
26. Merrick, J.P., Moran, D., and Radom, L. (2007). An evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors. *J. Phys. Chem.* **111(45)**: 11683-11700.
27. Pretsch, E., Bühlmann, P., and Badertscher M. (1993). Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data. 4<sup>th</sup> Ed. *Springer*. p. 310
28. Saleh, Z. A., and Taha D. K. (2014). Calculation of Ionization energies, electron affinities, hardnesses and electro negativites, using many bases set of many methods. *J. Sci. Eng. Res.* **5**: 727-729.
29. Chen, S., Scheiner, S., Kar, T., and Adhikari, U. (2012). Theoretical Study on Relationship Between Structure of Mercapto-Triazole Derivatives and Inhibition Performance. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**: 7128-7139.
30. Sancho-García J. C., and Pérez-Jiménez. (2010). A theoretical study of p-stacking tetracene derivatives as promising organic molecular semiconductors. *Chem. Phys. Lett.* **499**: 146-151.
31. Sadasivam, K. and Kumaresan, R. (2011). Theoretical Investigation on the antioxidant Behavior of Chrysoeriol and Hispidulin Flavonoid Compounds- A DFT Study. *Comp. Theor. Chem.* **963**: 227-235.
32. Parr, R. G., Szentpály, L. v., and Liu, S. Electrophilicity Index. (1999). *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 1922-1924.
33. Boon, C. S., Mcclements, D. J., Weiss, J., and Decker, E. A. (2010). Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50(6)**: 515-532.

34. Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Lindsay D. A., and Moffatt, D. J. (1993). Oxidative Degradation of  $\beta$ -Carotene and  $\beta$ -Apo-8'-carotenal. *Tetrahedron*. 49(4): 911-928.
35. Martin, H. D., Ruck, C., Schmidt, M., Sell, S., Beutner S., Mayer, B., and Walsh, R. (1999). Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl. Chem.* **71(12)**: 2253-2262.
36. Mordi, R. C. Mechanism of  $\beta$ -carotene degradation. (1992). *Biochem J.* **292(1)**: 310-312.

## **7. CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral son:

1. Se han estudiado los modos vibracionales del  $\beta$ -caroteno y del licopeno en diferentes muestras tanto de patrones, como en diversos tipos de frutos mediante espectroscopia Raman resonante en distintas configuraciones experimentales, observándose grandes similitudes y pequeños desplazamientos de señales achacados a la diferencia de las matrices. En general, los modos vibracionales más importantes observados en todas las muestras son similares a los encontrados en zanahoria:  $\nu_1$  ( $1522\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  ( $1158\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_3$  ( $1008\text{ cm}^{-1}$ ) y  $\nu_4$  ( $955\text{ cm}^{-1}$ ) asociados a las vibraciones de tensión (-C=C-), (-C-C-), de balanceo (-CH<sub>3</sub>) y de flexión fuera del plano (-CH), respectivamente. La medida de algunos sobretonos, ha permitido calcular la constante de anarmonicidad de los dos modos más intensos ( $\nu_1$  y  $\nu_2$ ) obteniéndose valores de  $\chi_e \cdot \tilde{\nu}_e$  de  $7.99\text{ cm}^{-1}$  y  $3.98\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

2. Se ha medido por espectroscopia Raman Resonante de Transmisión, la distribución espacial del  $\beta$ -caroteno en rodajas de zanahoria encontrándose que dicho pigmento se reparte de manera heterogénea con una mayor densidad en el floema secundario. Además, mediante la estimación del cociente de las intensidades de las dos bandas  $\nu_4/\nu_1$  se ha obtenido información acerca de la conformación espacial del  $\beta$ -caroteno en los distintos tejidos de las rodajas de zanahoria, observándose que la mayor concentración de la forma libre o monomérica se encuentra en la región del cambium vascular y el floema secundario.

3. Se ha desarrollado y puesto a punto una nueva técnica de Transmisión Raman Resonante con Luz Linealmente Polarizada que ha permitido medir el cociente de despolarización de las bandas  $\nu_1$  y  $\nu_2$ , en muestras de zanahoria observándose que el citado parámetro aumentaba con el espesor y con la concentración. Además, se estudió la evolución de dicho cociente en muestras de mango a espesor fijo en función del tiempo, observándose que el citado cociente disminuía a lo largo del tiempo de exposición al aire.

4. Se ha desarrollado un modelo teórico que ha permitido, mediante su ajuste a los datos experimentales, obtener valores de los coeficientes de absorción y de dispersión asociados a las dos bandas más intensas del  $\beta$ -caroteno obteniéndose los valores de

$\mu_a^{\parallel}(v_1) = (0.20 \pm 0.01) \text{ mm}^{-1}$  y  $\mu_a^{\parallel}(v_2) = (0.45 \pm 0.02) \text{ mm}^{-1}$  para los coeficientes de absorción y de  $\mu_s(v_1) = (1.1 \pm 0.1) \text{ mm}^{-1}$  y  $\mu_s(v_2) = (1.0 \pm 0.1) \text{ mm}^{-1}$  para los de dispersión.

5. Se ha medido la señal Raman en muestras de tomates mediante la configuración experimental de retodispersión. En todos los casos investigados se ha observado un aumento de intensidad de la banda  $v_1$  coincidiendo con el inicio de la maduración del fruto, un máximo posterior de señal, y un decaimiento post-máximo en la etapa final de la maduración. Adicionalmente, se encontró que el cociente de despolarización de la banda  $v_1$  apenas varía durante la evolución post-cosecha del fruto.

6. Se ha desarrollado un modelo teórico cinético y espectroscópico para describir la evolución temporal de la señal Raman observada teniendo en cuenta el coeficiente de velocidad de la síntesis de carotenoides, por una parte, y el coeficiente de dispersión de la luz de los frutos, por la otra. El modelo describe de forma satisfactoria la evolución post-cosecha de los tomates estudiados, demostrando la utilidad de la Espectroscopia Raman para determinar la calidad de los frutos y su evolución durante el proceso de maduración.

7. Se ha estudiado la estabilidad térmica del  $\beta$ -caroteno y del licopeno mediante espectroscopía Raman resonante y espectroscopia infrarroja a distintos tiempos de calentamiento y a distintas temperaturas. Se ha determinado que el proceso de degradación térmica sigue una cinética de primer orden, obteniéndose los siguientes valores para los coeficientes de velocidad:  $[T = 90 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$ ,  $[T = 100 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$ ,  $[T = 115 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (5.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$  y  $[T = 130 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (11.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$  para la degradación del  $\beta$ -caroteno, y  $[T = 115 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow k = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}]$  para el caso del licopeno. Estos valores, han permitido deducir una mayor estabilidad del  $\beta$ -caroteno en comparación con el licopeno. Adicionalmente, se ha determinado la energía de activación del proceso para el caso del  $\beta$ -caroteno, que tiene un valor de  $(51 \pm 3) \text{ kJ/mol}$ .

8. Se han analizado las estructuras, energías, y orbitales frontera, así como los espectros teóricos tanto de los reactivos, como de algunos productos esperables en la degradación térmica del  $\beta$ -caroteno, mediante dos métodos de modelización molecular: *mPW1PW91* y  $\omega$ B97xD empleando el conjunto de bases 6-31G\*. Esto, ha permitido obtener

información no sólo sobre la estabilidad inicial de los dos compuestos principales objeto de estudio, sino también de algunos productos de degradación cuyos espectros calculados coincidían con y los obtenidos experimentalmente. Todos ellos, pertenecen a la familia de los apocarotenales, destacando el retinal, que muestra un mayor grado de coincidencia. Este estudio detallado, ha confirmado algunas etapas clave del mecanismo de oxidación del  $\beta$ -caroteno en presencia de oxígeno atmosférico.



## **8. CONCLUSIONS**



## 8. CONCLUSIONS:

The most relevant findings in the work carried out in this Doctoral Thesis are summarized below

1. The vibrational modes of  $\beta$ -carotene and lycopene have been studied in pure samples and fruits by Resonance Raman Spectroscopy in diverse experimental configurations, observing great similarities and small displacements of signals which were attributed to the difference of matrices. In general, the most important modes observed in all samples were similar to those found in carrot:  $\nu_1$  ( $1522\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  ( $1158\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_3$  ( $1008\text{ cm}^{-1}$ ) and  $\nu_4$  ( $955\text{ cm}^{-1}$ ) associated with the stretching vibrations (-C=C-), and (-C-C-), rocking (-CH<sub>3</sub>) and out of plane wagging (C-H) respectively. The measurement of some overtones has allowed us to calculate the anharmonicity constant of the two most intense modes ( $\nu_1$  and  $\nu_2$ ), obtaining  $\chi_e \tilde{\nu}_e$  values of  $7.99\text{ cm}^{-1}$  and  $3.98\text{ cm}^{-1}$  respectively.

2. The spatial distribution of  $\beta$ -carotene in carrot slices has been measured by Resonance Raman Spectroscopy, being found that said pigment is distributed in a heterogeneous manner with a higher density in the secondary phloem. In addition, by measuring the  $\nu_4/\nu_1$  intensities ratio we have obtained information about the spatial conformation of  $\beta$ -carotene in the different tissues of the carrot slices, observing that the highest concentration of the free molecules or monomer is found in the vascular cambium region and in the secondary phloem.

3. A new technique of Resonance Raman Transmission with Linear Polarized Light has been developed and applied to measure the depolarization ratio of  $\nu_1$  and  $\nu_2$  bands in carrot samples. It was found that the aforementioned parameter increased with the thickness and concentration. In addition, we studied the evolution of this ratio in mango samples at fixed thickness as a function of time, observing that the ratio decreased during the time of air exposure.

4. A theoretical model has been developed in order to fit the experimental data and estimate the calculation of the absorption and scattering coefficients associated with the two most intense  $\beta$ -carotene Raman bands. The deduced values were:  $\mu_a^{\parallel}(\nu_1) = (0.20 \pm 0.01)\text{ mm}^{-1}$  and  $\mu_a^{\parallel}(\nu_2) = (0.45 \pm 0.02)\text{ mm}^{-1}$  for the absorption coefficients and  $\mu_s(\nu_1) = (1.1 \pm 0.1)\text{ mm}^{-1}$  and  $\mu_s(\nu_2) = (1.0 \pm 0.1)\text{ mm}^{-1}$  for the scattering coefficients.

5. The Raman signal has been measured in tomato samples by the experimental configuration of backscattering. In all cases, an increase in the intensity of the  $\nu_1$  band was observed at the onset of the fruit ripening reaching a maximum and followed by a post-peak decay during final maturation stage. Additionally, it was found that the depolarization ratio of the  $\nu_1$  band hardly varies during the post-harvest evolution of the fruit.

6. A theoretical, kinetic and spectroscopic model has been developed in order to describe the temporal evolution of the Raman signal using only two parameters: the rate coefficient of the carotenoids synthesis and the fruit scattering coefficient. The model describes satisfactorily the post-harvest evolution of the studied tomatoes, demonstrating the usefulness of Raman spectroscopy to determine the quality of the fruits and their evolution during ripening process.

7. The thermal stability of  $\beta$ -carotene and lycopene has been evaluated by Resonance Raman Spectroscopy and by infrared spectroscopy at different heating times and at different temperatures. It has been determined that the thermal degradation, followed a first order kinetics, obtaining the following values for the rate coefficients: [T = 90 °C  $\rightarrow$   $k = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ], [T = 100 °C  $\rightarrow$   $k = (3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ], [T = 115 °C  $\rightarrow$   $k = (5.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ] and [T = 130 °C  $\rightarrow$   $k = (11.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ] for the  $\beta$ -carotene degradation, and [T = 115 °C  $\rightarrow$   $k = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ] in the case of lycopene. These values, have allowed deducing a greater stability of  $\beta$ -carotene in comparison with the lycopene. In addition, for the  $\beta$ -carotene reaction the activation energy has been determined to be  $(51 \pm 3) \text{ kJ/mol}$ .

8. The structures, energies and frontier orbitals, as well as the theoretical spectra of both the reagents and some products expected in the thermal degradation of  $\beta$ -carotene, have been analyzed by two molecular modeling methods: *mPW1PW91* and  $\omega$ B97xD using the basis set 6-31G\*. This methodology has allowed obtaining information not only on the initial stabilities of the two main compounds under study, but also on some degradation products whose calculated spectra coincided with and those obtained experimentally. All of them, belonging to the apocarotenals family highlighting the retinal, which showed the greater coincidence. This detailed study has confirmed some key steps in the oxidation pathways of  $\beta$ -carotene in the presence of atmospheric oxygen.

# APÉNDICE I



## APÉNCICE I

### Apéndice I.a

En esta primera sección del Apéndice I se va a derivar el cociente de despolarización a partir de [ 4.7] del texto

$$\Gamma = \rho \frac{1 - \frac{1}{2} B x (1 + \gamma^\perp)}{1 - \frac{1}{2} B x (1 + \gamma^\parallel)} = \rho \left\{ \frac{1 - Z_1 x}{1 - Z_2 x} \right\} \quad [\text{A.1}]$$

donde  $Z_1 = \frac{1}{2} B (1 + \gamma^\perp)$  y además  $Z_2 = \frac{1}{2} B (1 + \gamma^\parallel)$  en este punto, se puede hacer un desarrollo en serie de la siguiente manera  $(1 + z) - 1 = 1 - z + z^2 + \dots$  en [A.1] obteniéndose tras despreciar los términos que van más allá del cuadrático lo siguiente

$$\Gamma = \rho \{1 - z_1 x\} \cdot \{1 + z_2 x + z_2^2 x^2\}$$

que puede reducirse a

$$\Gamma = \rho \{1 + x(Z_2 - Z_1)\} + \{x^2 Z_2 (Z_2 - Z_1)\}$$

Debido a que no existe información de  $\frac{\sigma_R^{a\perp}}{\sigma_R^{a\parallel}}$  en este punto se supone que el ratio  $\frac{\gamma^\perp}{\gamma^\parallel}$

viene dado por

$$\frac{\sigma_R^{a\perp}}{\sigma_a} / \frac{\sigma_R^{a\parallel}}{\sigma_a} = \frac{\sigma_R^{a\perp}}{\sigma_R^{a\parallel}} = \rho \text{ y como consecuencia } \gamma^\perp = \rho \gamma^\parallel. \text{ Así pues:}$$

$$z_2 - z_1 = \frac{1}{2} B (\gamma^\parallel - \gamma^\perp) = \frac{1}{2} B \gamma^\parallel (1 - \rho) = \frac{1}{2} \sigma_a N_s \frac{\sigma_R^{a\parallel}}{\sigma_a} (1 - \rho) = \frac{1}{2} N_s \sigma_R^{a\parallel} (1 - \rho)$$

entonces

$$\Gamma = \rho \left\{ 1 + \frac{1}{2} (1 - \rho) \sigma_R^{a\parallel} N_s x + \frac{1}{4} \sigma_R^{a\parallel} N_s \sigma_a N_s (1 - \rho) \right\} \quad [\text{A.2}]$$

Para llegar a este punto ha sido necesario realizar la aproximación  $1 + \gamma^\parallel \simeq 1$  puesto que  $\gamma^\parallel < 1$  debido a que la sección de atenuación Raman (Stokes),  $\sigma_R^{a\parallel}$  es generalmente menor que la sección de atenuación del láser  $\sigma_a$ . Esta última condición sucede porque las líneas Raman están desplazadas hacia el rojo con respecto a la longitud de onda de

excitación del láser y por lo tanto, su coeficiente de absorción es significativamente más pequeño con respecto al de la longitud de onda de la excitación.

Finalmente, la última ecuación queda definida como

$$\Gamma = \rho + \frac{1}{2}\rho(1 - \rho)\mu_R x + \frac{1}{4}\rho(1 - \rho)\mu_R \mu_a x^2 \quad [\text{A.3}]$$

Donde  $\mu_R = \mu_a + \mu_s$  y  $\mu_a$  es el coeficiente de absorción. Y siendo  $\mu_i = N_i \cdot \sigma_i$ .

### Apéndice I.b

La expresión más común para el cociente de despolarización para moléculas distribuidas al azar viene dada por<sup>1</sup>

$$\rho = \frac{3\gamma^2}{45\alpha^2 + 4\gamma^2} \quad [\text{A.5}]$$

donde  $\alpha$  es el promedio de la polarizabilidad y  $\gamma$  representa la anisotropía del tensor.

De esta manera, si una vibración es totalmente simétrica y si la molécula presenta simetría esférica  $\gamma = 0$  y  $\rho = 0$ , por el contrario si las vibraciones no son totalmente simétricas se tiene que  $\alpha = 0$  y  $\rho = 3/4$ .

El  $\beta$ -caroteno puede considerarse como una molécula prácticamente plana siendo el grupo de simetría al que más se aproxima el  $C_{2h}$ . De esta manera, tanto  $\gamma$  como  $\alpha$  presentan valores distintos de cero siendo tanto  $\nu_1$  como  $\nu_2$  bandas polarizadas debido a que pertenecen a la representación  $A_g$ . Dicha consideración justifica que los cocientes de despolarización del  $\beta$ -caroteno en acetonitrilo no sean cero.

En este punto la cuestión debería ser por qué los valores de  $\rho$  del  $\beta$ -caroteno tanto en matrices de zanahoria como de mango son mayores que los de las disoluciones de acetonitrilo y en qué grado, si lo hubiera, esta diferencia estaría relacionada con el orden de orientación del pigmento en matrices biológicas.

Es bien sabido que en muestras que presentan moléculas orientadas o alineadas, como cristales líquidos o sólidos cristalinos<sup>2,3</sup> las propiedades macroscópicas de la muestra también son anisotrópicas. De hecho, el orden de orientación de carotenoides ya ha sido estudiado en bicapas lipídicas mediante dispersión Raman Resonante con resolución angular<sup>4</sup>. Por lo tanto, la distribución molecular orientada al azar, que se ha empleado para obtener la Ecuación [A.5] no es válida.

Por regla general, la orientación molecular de un sistema viene dada por su función de distribución de orientación  $N(\theta)$  que suele venir dada por una suma infinita de los términos pares de los polinomios de Legendre  $P_l(\cos \theta)$ , es decir

$$N(\theta) = \sum_1^{\text{par}} \left(1 + \frac{1}{2}\right) \langle P_l \rangle P_l(\cos \theta)$$

Donde  $\langle P_l \rangle$  representa el valor promedio de los polinomios de Legendre de orden  $l$ , normalmente conocido como parámetros de orden, y siendo  $\theta$  el ángulo entre el momento de transición de la absorción y el eje (local) del laboratorio. Dichos coeficientes pueden determinarse experimentalmente. Por definición  $\langle P_0 \rangle = 1$  y  $\langle P_2 \rangle$  y  $\langle P_4 \rangle$  se estiman mediante espectros Raman polarizados<sup>3</sup>.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el cociente de despolarización en las muestras investigadas se puede dividir en dos grupos, el cociente a espesor cero y el resto de coeficientes a espesor distinto de cero que aumentan según lo hace el espesor.

Con respecto al mayor valor de  $\rho$  (es decir, el correspondiente a las muestras a espesor cero) del  $\beta$ -caroteno en la matriz biológica en comparación con el de la disolución líquida, la respuesta parece asociada a la influencia de los parámetros de órdenes elevados, específicamente con los parámetros de alto orden de los polinomios de Legendre como por ejemplo  $\langle P_4 \rangle$  que está íntimamente relacionado con el alineamiento molecular.

De hecho, mientras el espectro Raman de líquidos isotrópicos depende en gran medida de  $\langle P_2 \rangle$ , aquellos de muestras ordenadas, como las de las matrices de zanahoria de la presente tesis también dependen de  $\langle P_4 \rangle$  además del ya citado  $\langle P_2 \rangle$ . La diferencia en la dependencia de estos polinomios se antoja fundamental a la hora de obtener estos valores mayores de  $\rho$ . Un buen ejemplo de esta dependencia se puede ver en la referencia<sup>4</sup>, en cuya Tabla I se proporcionan los valores tanto de  $\langle P_2 \rangle$  como de  $\langle P_4 \rangle$  para carotenoides impregnados en varias mezclas de lípidos insaturados y agua.

Aplicando el modelo teórico descrito en la referencia<sup>4</sup>, el cociente de despolarización para el caso límite de muestras muy delgadas viene dado por la Ecuación 11b de dicha referencia para el caso de una incidencia normal, es decir  $\theta = 0$

$$\Gamma(x = 0) \equiv \rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} = \frac{R_1}{3R_1 + R_5 \sin^2 \phi}$$

donde  $R_1$  y  $R_5$  son las funciones de Legendre  $\langle P_2 \rangle$  y  $\langle P_4 \rangle$  a momentos dados (Ecuación 9 de la Referencia 2) y  $\phi$  es el ángulo existente entre la dispersión Raman una vez atravesada la muestra y la luz incidente del láser, es decir, en principio  $\phi = 180^\circ$ .

Desafortunadamente, con la configuración experimental que se ha empleado no ha sido posible medir la dispersión Raman en función del ángulo, por lo que no se han podido extraer los valores de  $\langle P_2 \rangle$  y  $\langle P_4 \rangle$ . En lugar de eso, se han empleado valores típicos obtenidos de muestras reales que contienen  $\beta$ -caroteno (Tabla I de la Referencia 4). Específicamente se tomaron  $\langle P_2 \rangle = 0.45$  y  $\langle P_2 \rangle$  y  $\langle P_4 \rangle = 0.31$  considerando el ángulo de la luz dispersada entre  $175^\circ$  y  $180^\circ$ . Empleando los valores del modelo citado se ha obtenido un valor de 0.35 para el cociente de despolarización a espesor 0 ( $\rho$ ).

Los ejemplos antes mencionados nos muestran un cierto alineamiento del  $\beta$ -caroteno, debido a que  $\langle P_4 \rangle$  puede tomar valores comprendidos entre -0.5 y 1, el cociente de despolarización continúa siendo superior que el obtenido en las disoluciones de acetonitrilo.

Con respecto a la segunda cuestión, la dependencia con el espesor, el principal efecto mostrado en esta parte de la tesis doctoral es el aumento de la dispersión difusa y por lo tanto de  $\Gamma$  con el espesor.

### Referencias

1. Wilson, E.B., and Decius, J.C. y de Cross, P. C. (1955). *Molecular Vibrations*. 1955. (McGraw-Hill, New York).
2. Richard-Lacroix, M., and Pellerin, C. (2013). Accurate New Method for Molecular Orientation Quantification Using Polarized Raman Spectroscopy. *Macromolecules*. **46(14)**: 5561-5569.
3. Spiro, T. G., and Strekas T.C. (1972). Resonance Raman Spectra of Hemoglobin and Cytochrome c: Inverse Polarization and Vibronic Scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69(9)**: 2622-2626.
4. van de Ven, M., Kattenber, M., van Ginkel, G., and Levine, Y.K. (1984). Study of the Orientational Ordering of Carotenoids in Lipid Bilayers by Resonance-Raman Spectroscopy. *Biophys. J.* **45(6)**: 1203-1210.

# APÉNDICE II



Tabla II.1 Parámetros geométricos del  $\beta$ -caroteno con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53822	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.22674	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-77.38416
C(1)-C(1b)	1.53868	C(1a)-C(1)-C(2)	110.17771	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	165.09210
C(1)-C(2)	1.53751	C(1b)-C(1)-C(2)	107.14729	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	111.16826
C(1)-C(6)	1.53788	C(1a)-C(1)-C(6)	109.13088	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-129.65851
C(2)-C(3)	1.51921	C(1b)-C(1)-C(6)	110.96565	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-68.52281
C(3)-C(4)	1.51994	C(2)-C(1)-C(6)	111.13833	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	50.65042
C(4)-C(5)	1.50818	C(1)-C(2)-C(3)	112.72669	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-62.05124
C(5)-C(5a)	1.50391	C(2)-C(3)-C(4)	109.12490	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	45.83378
C(5)=C(6)	1.35379	C(3)-C(4)-C(5)	113.69009	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	167.69151
C(6)-C(7)	1.47009	C(4)-C(5)-C(5a)	112.77386	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	175.55918
C(7)=C(8)	1.35097	C(4)-C(5)=C(6)	122.75438	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	-6.66184
C(8)-C(9)	1.45031	C(5a)-C(5)=C(6)	124.43939	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	-48.03956
C(9)-C(9a)	1.50183	C(5)=C(6)-C(7)	122.45268	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	-178.85357
C(9)=C(10)	1.36426	C(6)-C(7)=C(8)	125.59413	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	178.66273
C(10)-C(11)	1.43192	C(7)=C(8)-C(9)	126.06052	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	-1.10530
C(11)=C(12)	1.36019	C(8)-C(9)-C(9a)	118.27592	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.66950
C(12)-C(13)	1.43988	C(9a)-C(9)=C(10)	123.52021	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.96702
C(13)-C(13a)	1.50263	C(8)-C(9)=C(10)	118.20343	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.08545
C(13)=C(14)	1.36900	C(9)=C(10)-C(11)	128.05258	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.79883
C(14)-C(15)	1.42620	C(10)-C(11)=C(12)	122.92929	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	-179.81308
C(15)=C(15')	1.36399	C(11)=C(12)-C(13)	126.35496	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.21621
		C(12)-C(13)-C(13a)	118.40749	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	179.93713
		C(12)-C(13)-C(14)	118.25653	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	-179.96568
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.33597	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	-0.09370
		C(13)=C(14)-C(15)	128.08729		
		C(14)-C(15)=C(15')	123.42079		

Tabla III.2 Parámetros geométricos del licopeno con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.50401	C(1a)-C(1)-C(1b)	114.31829	C(1a)-C(1)=C(2)-C(3)	-179.41518
C(1)-C(1b)	1.50260	C(1a)-C(1)-C(2)	120.69839	C(1b)-C(1)=C(2)-C(3)	0.77516
C(1)=C(2)	1.33955	C(1b)-C(1)-C(2)	124.98308	C(1)=C(2)-C(3)-C(4)	115.08369
C(2)-C(3)	1.49824	C(1)-C(2)-C(3)	128.62822	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	176.18067
C(3)-C(4)	1.54377	C(2)-C(3)-C(4)	111.87626	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	67.23923
C(4)-C(5)	1.50525	C(3)-C(4)-C(5)	113.89537	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	179.15094
C(5)-C(5a)	1.50130	C(4)-C(5)-C(5a)	115.79178	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	-0.29892
C(5)=C(6)	1.35177	C(4)-C(5)=C(6)	120.05358	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	-179.46930
C(6)-C(7)	1.44165	C(5a)-C(5)=C(6)	124.15254	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.95215
C(7)=C(8)	1.35571	C(5)=C(6)-C(7)	127.84219	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	0.40024
C(8)-C(9)	1.44410	C(6)-C(7)=C(8)	122.95103	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	179.85638
C(9)-C(9a)	1.50250	C(7)=C(8)-C(9)	126.46313	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	-0.09501
C(9)=C(10)	1.36635	C(8)-C(9)-C(9a)	118.25732	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.76988
C(10)-C(11)	1.42992	C(9a)-C(9)=C(10)	123.43822	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	179.85969
C(11)=C(12)	1.36132	C(8)-C(9)=C(10)	118.30444	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.03465
C(12)-C(13)	1.43862	C(9)=C(10)-C(11)	128.13974	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	-179.91787
C(13)-C(13a)	1.50284	C(10)-C(11)=C(12)	122.85302	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	179.89883
C(13)=C(14)	1.36976	C(11)=C(12)-C(13)	126.42792	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	-0.05122
C(14)-C(15)	1.42541	C(12)-C(13)-C(13a)	118.45375	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	-179.99569
C(15)=C(15')	1.36464	C(12)-C(13)-C(14)	118.30444		
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.29578		
		C(13)=C(14)-C(15)	128.11175		
		C(14)-C(15)=C(15')	123.42696		

Método de cálculo  $\omega$ B97xD con base 6-31G\*

Tal y como se ha comentado con anterioridad, este método tiene en cuenta las interacciones moleculares y las dispersiones a largo alcance. La manera de proceder fue similar a las anteriores. Por ello, en primer lugar se obtuvo la geometría optimizada de ambas moléculas para posteriormente calcular sus espectros teóricos.

 *$\beta$ -Caroteno*

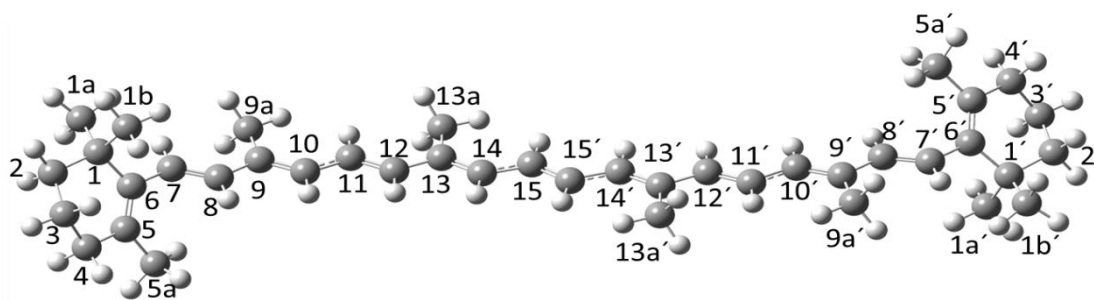
Procediendo en el mismo orden que en el resto de cálculos, la primera molécula objeto de estudio fue la de  $\beta$ -caroteno, donde se obtuvieron dos geometrías claramente diferenciadas. La primera de ellas contaba con una energía de -1557.40657 Hartrees mientras que la segunda presentaba una energía de -1557.41047 Hartrees, siendo la diferencia energética entre ambas configuraciones de  $3.9 \cdot 10^{-3}$  Hartrees que se corresponde con 10.24 kJ/mol, por lo que puede afirmarse que se trata de dos geometrías diferentes. Los cálculos realizados se harán por tanto para la disposición más estable, es decir en base a la que fue calculada en segundo lugar.

La geometría optimizada mediante el método de cálculo  $\omega$ B97xD se presenta en la Figura II.1. La molécula ha sido numerada convenientemente y sus parámetros estructurales más significativos se pueden consultar en la Tabla III.3.

Como se puede comprobar, existe una similitud estructural manifiesta en comparación con el otro método de cálculo.

Tabla III.3 Parámetros geométricos del  $\beta$ -caroteno con el método/base de cálculo  $\omega$ B97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.54047	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.36831	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-77.01539
C(1)-C(1b)	1.54078	C(1a)-C(1)-C(2)	110.17106	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	165.08700
C(1)-C(2)	1.53985	C(1b)-C(1)-C(2)	107.50668	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	109.99421
C(1)-C(6)	1.53790	C(1a)-C(1)-C(6)	108.96130	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-130.88075
C(2)-C(3)	1.52278	C(1b)-C(1)-C(6)	110.77523	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-68.68568
C(3)-C(4)	1.52314	C(2)-C(1)-C(6)	111.01716	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	50.43937
C(4)-C(5)	1.51213	C(1)-C(2)-C(3)	112.64828	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-61.81279
C(5)-C(5a)	1.50812	C(2)-C(3)-C(4)	109.21678	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	45.99628
C(5)=C(6)	1.34766	C(3)-C(4)-C(5)	113.51785	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	166.27034
C(6)-C(7)	1.47905	C(4)-C(5)-C(5a)	112.89357	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	175.93665
C(7)=C(8)	1.34320	C(4)-C(5)=C(6)	122.70985	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	-5.80468
C(8)-C(9)	1.46272	C(5a)-C(5)=C(6)	124.37663	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	-54.72120
C(9)-C(9a)	1.50563	C(5)=C(6)-C(7)	122.11476	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	-178.06470
C(9)=C(10)	1.35382	C(6)-C(7)=C(8)	124.43182	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	178.32442
C(10)-C(11)	1.44703	C(7)=C(8)-C(9)	126.04412	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	-0.98296
C(11)=C(12)	1.34952	C(8)-C(9)-C(9a)	117.69094	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-178.89811
C(12)-C(13)	1.45666	C(9a)-C(9)=C(10)	124.01269	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	178.44117
C(13)-C(13a)	1.50607	C(8)-C(9)=C(10)	118.29244	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.36201
C(13)=C(14)	1.35640	C(9)=C(10)-C(11)	127.80102	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.01526
C(14)-C(15)	1.44371	C(10)-C(11)=C(12)	122.78512	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	178.29319
C(15)=C(15')	1.35170	C(11)=C(12)-C(13)	126.09868	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	-1.23565
		C(12)-C(13)-C(13a)	117.81540	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.01778
		C(12)-C(13)-C(14)	118.30306	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	0.48028
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.87972	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.48028
		C(13)=C(14)-C(15)	127.86221		
		C(14)-C(15)=C(15')	123.21798		



**Figura II.1** Estructura molecular más estable del  $\beta$ -caroteno calculada con el método  $\omega$ B97xD.

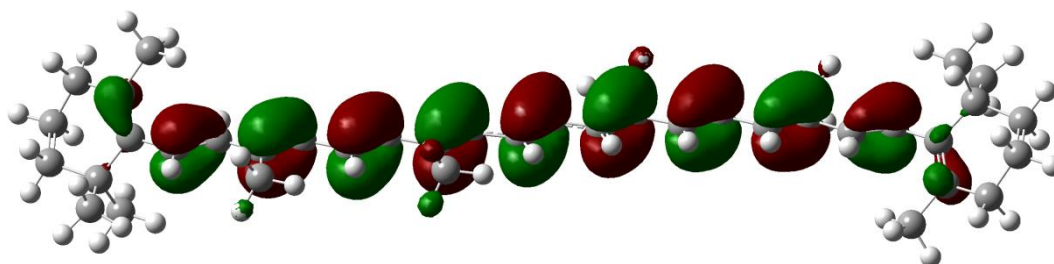
De igual manera que sucedía con el método de cálculo presentado en la memoria, entre algunos enlaces existe una línea punteada que se corresponde con el efecto de la conjugación a lo largo de la parte central de la estructura.

### Orbitales HOMO y LUMO

De manera análoga a los casos anteriores y mediante [5.1], [5.2], [5.3], [5.4], [5.5] se calcularon los parámetros que dan una idea de la reactividad empleando para ello las energías pertenecientes a los orbitales HOMO y LUMO.

#### Orbital HOMO del $\beta$ -caroteno

En la Figura II.2 se puede observar cómo está distribuido el orbital HOMO en la molécula de  $\beta$ -caroteno calculado con la metodología  $\omega$ B97xD.



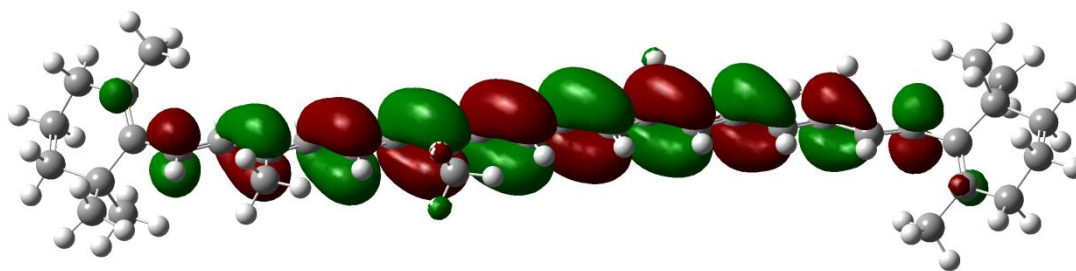
**Figura II.2** Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de  $\beta$ -caroteno.

Igual que sucedía con las metodologías anteriores estos orbitales se distribuyen a lo largo de la zona central de la molécula y no hacia los anillos laterales.

El reparto es similar al mostrado en la memoria, ya que se produce mayoritariamente sobre aquellas zonas cuyo carácter más cercano al doble enlace es significativo.

#### Orbital LUMO del $\beta$ -caroteno

Procediendo de igual manera en la Figura II.3 se puede apreciar la distribución del orbital LUMO en una molécula de  $\beta$ -caroteno.



**Figura II.3** Distribución del orbital LUMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de  $\beta$ -caroteno.

Finalmente, en la Tabla II.4 se presentan los resultados obtenidos con las ecuaciones [5.1],[5.2], [5.3], [5.4], [5.5] del texto.

En este caso la distribución se produce sobre los enlaces cuyo carácter se acerca más al sencillo, al contrario de lo que sucedía para el orbital HOMO.

**Tabla II.4** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la configuración más estable del  $\beta$ -caroteno. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$ (electrofilia global).

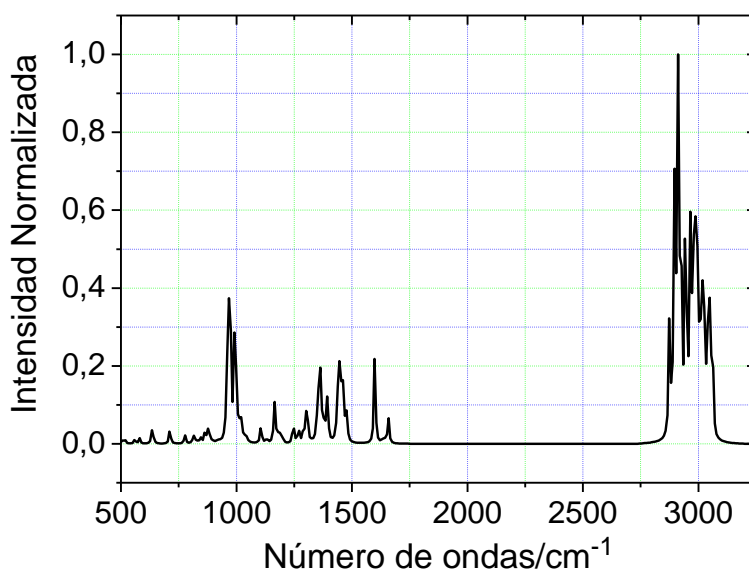
Parámetro	$\beta$ -Caroteno
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	6.21
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	0.50
$\Delta E / \text{eV}$	5.71
$\eta / \text{eV}$	2.86
$\sigma / \text{eV}^1$	0.35
$\mu / \text{eV}$	-3.36
$\omega^\circ / \text{eV}$	1.97

En este caso, las diferencias de energía entre el HOMO y el LUMO son mayores en comparación con la metodología anterior. Esto puede deberse a que gracias las interacciones intramoleculares de largo alcance la molécula se estabiliza.

El poder antioxidante para el  $\beta$ -caroteno calculado mediante [5.6] del texto para este caso es de  $W = 1515.8$ .

#### Espectro IR del $\beta$ -caroteno

En la Figura II.4 se puede apreciar el espectro de infrarrojo normalizado al máximo obtenido para esta metodología de cálculo. Lo primero que llama la atención es su similitud con el obtenido mediante el método *mPW1PW91* aunque con ciertas diferencias en las intensidades.

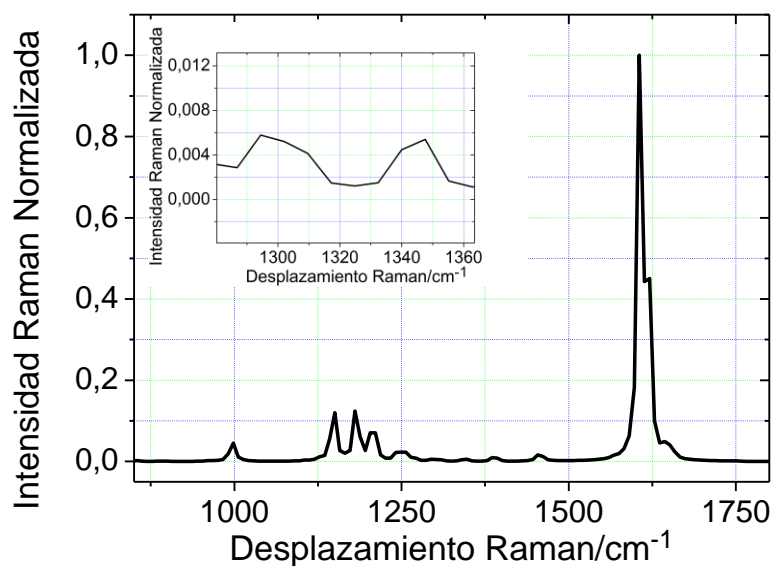


**Figura II.4** Espectro IR obtenido mediante cálculos computacionales del  $\beta$ -caroteno.

En este caso y en los sucesivos al tratarse de otro método de cálculo la corrección aplicada en el eje de abscisas ha sido diferente y se ha realizado aplicando el factor descrito en la referencia del organismo NIST<sup>1</sup>.

#### Espectro Espectro Raman del $\beta$ -caroteno

En la Figura II.5 se presenta el espectro Raman modelizado para el  $\beta$ -caroteno también normalizado y con las correcciones de desplazamientos antes citadas. En este caso, las intensidades han variado notablemente con respecto a las encontradas en el método anterior y es necesario hacer un recuadro interior para apreciar el efecto ya conocido de la inversión en la intensidad de las bandas cercanas a 1250 cm<sup>-1</sup> siendo además mediante esta metodología menos ostensible.



**Figura II.5** Espectro Raman obtenido mediante cálculos computacionales del  $\beta$ -caroteno. En la parte interior de la figura se destacan los modos vibracionales cuya inversión dependiendo de la muestra ya ha sido comentada.

Por otro lado en cuanto a desplazamientos, una vez aplicado el factor de corrección no existen diferencias tan significativas si se compara con el otro método.

### *Licopeno*

Para la optimización de la geometría en el caso del licopeno por este método se hicieron cálculos para dos disposiciones, en la primera de ellas se obtuvo una energía para el sistema de  $-1557.34244$  Hartrees, mientras que para la segunda el valor fue de  $-1557.34274$  Hartrees, siendo la diferencia de energías  $3.00 \cdot 10^{-4}$  Hartrees que es equivalente a  $0.79$  kJ/mol. Debido a esta pequeña diferencia de energías puede tratarse prácticamente de la misma configuración, pero por comodidad se trabajará con la de menor energía, es decir, con la última que fue calculada.

A pesar de tratarse de una configuración muy próxima a la obtenida por el otro método *mPW1PW91* existen ligeras variaciones en cuanto a distancias de enlace y ángulos que se pueden consultar en la Tabla III.5.

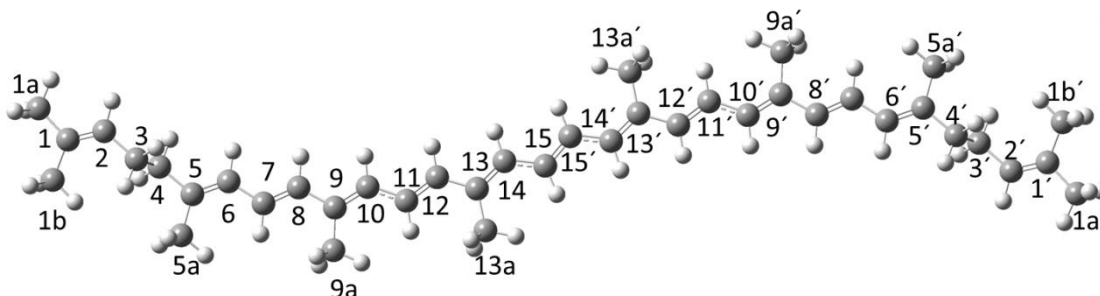
Tabla III.5 Parámetros geométricos del  $\beta$ -caroteno con el método/base de cálculo  $\omega$ B97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.50707	C(1a)-C(1)-C(1b)	114.46167	C(1a)-C(1)=C(2)-C(3)	-179.19446
C(1)-C(1b)	1.50713	C(1a)-C(1)-C(2)	121.31702	C(1b)-C(1)=C(2)-C(3)	0.91147
C(1)=C(2)	1.33724	C(1b)-C(1)-C(2)	124.22124	C(1)=C(2)-C(3)-C(4)	92.81924
C(2)-C(3)	1.50479	C(1)-C(2)-C(3)	126.95590	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	92.81924
C(3)-C(4)	1.54472	C(2)-C(3)-C(4)	112.07462	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	69.13572
C(4)-C(5)	1.50904	C(3)-C(4)-C(5)	113.25856	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	178.40315
C(5)-C(5a)	1.50641	C(4)-C(5)-C(5a)	115.37615	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	-0.13698
C(5)=C(6)	1.34561	C(4)-C(5)=C(6)	120.24409	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	-178.65994
C(6)-C(7)	1.45293	C(5a)-C(5)=C(6)	124.36508	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.93994
C(7)=C(8)	1.34734	C(5)=C(6)-C(7)	127.57867	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	0.53653
C(8)-C(9)	1.45871	C(6)-C(7)=C(8)	122.85937	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.93993
C(9)-C(9a)	1.50621	C(7)=C(8)-C(9)	126.20897	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.03407
C(9)=C(10)	1.35515	C(8)-C(9)-C(9a)	117.71389	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.66594
C(10)-C(11)	1.44598	C(9a)-C(9)=C(10)	123.88157	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.97084
C(11)=C(12)	1.35008	C(8)-C(9)=C(10)	118.40454	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	-0.07306
C(12)-C(13)	1.45607	C(9)=C(10)-C(11)	127.89930	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	179.90356
C(13)-C(13a)	1.50609	C(10)-C(11)=C(12)	122.68464	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.92024
C(13)=C(14)	1.35662	C(11)=C(12)-C(13)	126.18664	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.05487
C(14)-C(15)	1.44340	C(12)-C(13)-C(13a)	117.86041	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	179.97589
C(15)=C(15')	1.35190	C(12)-C(13)-C(14)	118.40454		
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.85160		
		C(13)=C(14)-C(15)	127.88299		
		C(14)-C(15)=C(15')	123.20321		

## Apéndice II

### Estructura

En la Figura II.6 se presenta la molécula de licopeno con la geometría optimizada siendo muy similar a la calculada mediante el método anterior.



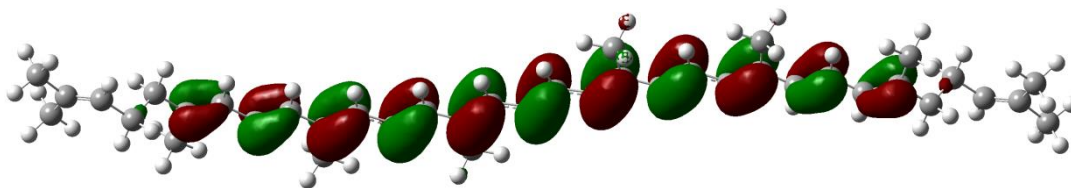
**Figura II.6** Estructura molecular más estable del licopeno calculada con el método antes citado.

Obsérvese cómo, a pesar de emplear un método diferente de cálculo, el efecto de la conjugación asociado a las líneas discontinuas, sigue estando muy presente a lo largo de la parte central de la estructura, al igual que sucedía con la molécula de  $\beta$ -caroteno.

### Orbitales HOMO y LUMO

Orbital HOMO del licopeno:

En la Figura II.7 se presenta la distribución del orbital HOMO para el caso del licopeno calculado mediante el método  $\omega$ B97xD.



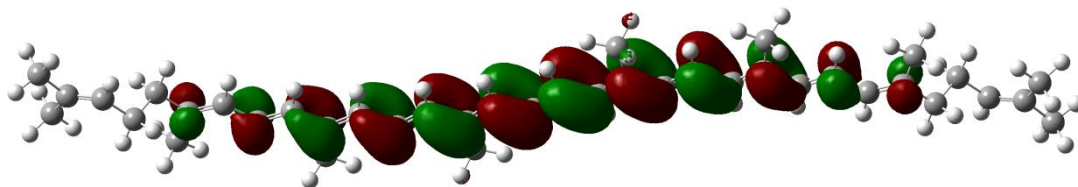
**Figura II.7** Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de licopeno.

Al tratarse de métodos similares, el comportamiento del orbital HOMO es muy parecido al presentado en la memoria, ya que éste se distribuye sobre aquellos enlaces cuya proximidad al carácter de doble enlace es mayor.

Los orbitales representados son enlazantes y de tipo  $\pi$ , al igual que en el resto de estructuras ya presentadas obtenidas por ambos métodos de cálculo.

Orbital LUMO del licopeno:

En la Figura II.8 se puede observar la distribución del orbital LUMO perteneciente a una molécula de licopeno.



**Figura II.8** Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de licopeno.

La mayor contribución se presenta en la parte central de la molécula, siendo despreciable la aportación orbitalaria en los extremos de la misma.

De igual manera que sucedía con el otro método de cálculo, en este caso la distribución mayoritaria de los orbitales se produce sobre aquellos enlaces con carácter más cercano al simple, tanto por la apariencia de su estructura como por sus distancias de enlace presentadas en la Tabla II.5.

Por otro lado en la Tabla II.6 se presentan los parámetros calculados mediante el empleo de las ecuaciones 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6 del texto.

**Tabla II.6** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la configuración más estable del licopeno. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$ (electrofilia global).

Parámetro	Licopeno
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	6.09
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	0.54
$\Delta E / \text{eV}$	5.55
$\eta / \text{eV}$	2.77
$\sigma / \text{eV}^1$	0.36
$\mu / \text{eV}$	-3.32
$\omega^\circ / \text{eV}$	1.98

## Apéndice II

Es muy interesante darse cuenta de que lo comentado para el método anterior continúa siendo válido para este método. Ya que la diferencia de energías entre el HOMO y el LUMO es menor para el caso del licopeno en comparación con el  $\beta$ -caroteno, y variando los parámetros del mismo modo que lo hacían con el otro método, aunque en este caso existe una menor diferencia.

El poder antioxidante para esta metodología obtenido con [5.6] para el caso del licopeno fue de  $W=2218.16$ .

### *Comparación de parámetros de $\beta$ -caroteno y licopeno*

En primer lugar se puede observar una gran diferencia energética entre los orbitales HOMO y LUMO de ambos carotenoides, del orden de unos 5.7 eV.

Además, si se observan con detenimiento la Tabla 5.10 y 5.11 y teniendo en cuenta los valores de las energías del orbital HOMO se ha calculado el poder antioxidante de ambos polienos. En el caso del licopeno (2218.16) los valores fueron mayores en comparación con el  $\beta$ -caroteno (1515.8), aunque dentro del mismo orden de magnitud. El licopeno, por tanto, presenta mayor poder antioxidante siendo este hecho consistente con otros estudios<sup>2</sup> ver Capítulo 5.

En el caso del  $\beta$ -caroteno el valor de dureza fue de 2.86 eV, mientras que para el licopeno fue de 2.77 eV, lo que indica que se puede esperar una mayor reactividad en el caso de éste último.

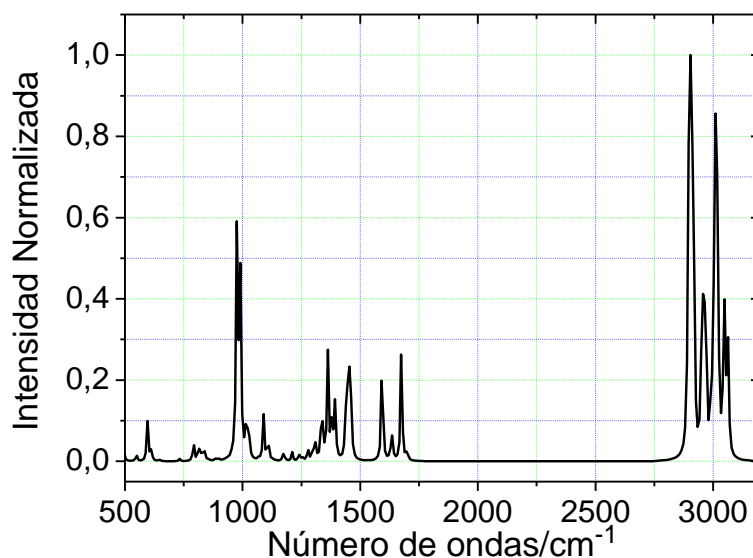
El índice de electrofilia global es una medida del poder electrofílico, da una idea de cómo varía la energía cuando un sistema es saturado con electrones<sup>3</sup>, en este caso es prácticamente igual para ambos.

Finalmente, la fragilidad que da una idea de la reactividad (ver capítulo 5) fue de (0.36 eV<sup>-1</sup>) para el  $\beta$ -caroteno y de (0.35 eV<sup>-1</sup>) para el licopeno. A pesar de ser muy similares la del licopeno se encuentra ligeramente por encima.

### Espectro IR del licopeno

En la Figura II.9 se presenta el espectro infrarrojo obtenido para una molécula de licopeno cuya geometría ha sido optimizada. Dicho espectro, al igual que los anteriores se encuentra normalizado al máximo y se le ha aplicado la corrección en el eje de abscisas correspondiente a esta metodología.

Merece la pena destacar que los modos principales coinciden con los calculados mediante la otra metodología, aproximándose también a los resultados obtenidos experimentalmente.

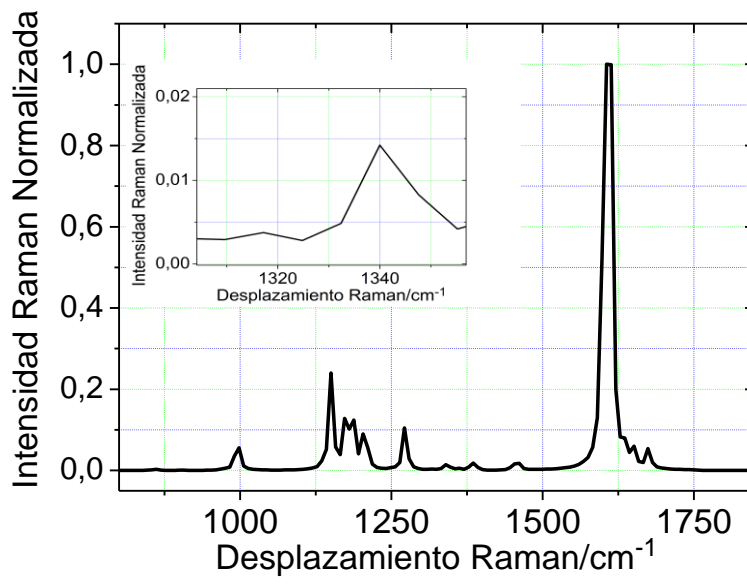


**Figura II.9** Espectro IR obtenido mediante cálculos computacionales del licopeno.

#### Espectro Raman del licopeno:

Finalmente, en la Figura II.10 se muestra el espectro Raman modelizado para una molécula de licopeno. Es preciso recordar que en esta metodología se tienen en cuenta las interacciones a largo alcance y por ello pueden existir ciertas variaciones en comparación con los obtenidos con el otro método. La diferencia más destacable tiene que ver con las intensidades relativas de las señales. Por otro lado el efecto de la inversión de picos ya comentada se mantiene para este caso, ya que el cociente varía con respecto a la molécula de  $\beta$ -caroteno pudiendo apreciarse este hecho en el recuadro interior de la figura.

Por último, tal y como se ha ido comentando es necesario destacar que aparecen más vibraciones en comparación con los espectros obtenidos experimentalmente, como ya se ha explicado este efecto tiene que ver con las condiciones resonantes en las que se han adquirido los espectros reales que hace que algunas señales se intensifiquen sobre otras que no se encuentran acopladas energéticamente a las transiciones electrónicas, por ello este efecto es esperable.



**Figura II.10** Espectro Raman obtenido mediante cálculos computacionales del  $\beta$ -caroteno. En la parte interior de la figura se destacan los modos vibracionales cuya inversión dependiendo de la muestra ya ha sido comentada.

**Referencias**

1. <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp> Fecha de acceso 16-07-2017.
2. Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. (1989). Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 532-538.
3. Parr, R. G., Szentpály, L. v., Liu, S. Electrophilicity Index. (1999). *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 1922-1924.



# APÉNDICE III



Tabla III.1 Parámetros geométricos del Retinal con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53883	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.29390	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-164.68527
C(1)-C(1b)	1.53802	C(1a)-C(1)-C(2)	107.12286	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	77.72398
C(1)-C(2)	1.53770	C(1b)-C(1)-C(2)	110.17930	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	129.13915
C(1)-C(6)	1.53802	C(1a)-C(1)-C(6)	110.92846	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-111.62348
C(2)-C(3)	1.51915	C(1b)-C(1)-C(6)	109.13730	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-50.95265
C(3)-C(4)	1.52003	C(2)-C(1)-C(6)	111.12649	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	68.28471
C(4)-C(5)	1.50767	C(1)-C(2)-C(3)	112.76369	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	62.02731
C(5)-C(5a)	1.50385	C(2)-C(3)-C(4)	109.10587	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-46.04825
C(5)=C(6)	1.35426	C(3)-C(4)-C(5)	113.71466	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-167.68760
C(6)-C(7)	1.46887	C(4)-C(5)-C(5a)	112.72859	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-175.54618
C(7)=C(8)	1.35071	C(4)-C(5)=C(6)	122.62493	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	6.79403
C(8)-C(9)	1.45112	C(5a)-C(5)=C(6)	124.61057	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	46.78146
C(9)-C(9a)	1.50172	C(5)=C(6)-C(7)	122.29495	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.58483
C(9)=C(10)	1.36352	C(6)-C(7)=C(8)	125.61441	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	-179.26311
C(10)-C(11)	1.43324	C(7)=C(8)-C(9)	125.89681	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	0.74966
C(11)=C(12)	1.35701	C(8)-C(9)-C(9a)	118.31677	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.71880
C(12)-C(13)	1.44740	C(9a)-C(9)=C(10)	123.64395	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.96638
C(13)-C(13a)	1.50442	C(8)-C(9)=C(10)	118.03927	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.26769
C(13)=C(14)	1.36125	C(9)=C(10)-C(11)	127.72836	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.84388
C(14)-C(15)	1.45561	C(10)-C(11)=C(12)	122.98091	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	-179.95671
C(15)=O	1.21829	C(11)=C(12)-C(13)	125.92905	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.05362
		C(12)-C(13)-C(14)	118.13185	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.92397
		C(12)-C(13)-C(13a)	118.06937	C(13)=C(14)-C(15)=O	-179.92779
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.79877	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.06506
		C(13)=C(14)-C(15)	127.16216		
		C(14)-C(15)=O	123.01809		

Tabla III.2 Parámetros geométricos de la  $\beta$ -apo-13-carotenona con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53891	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.26988	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-164.97356
C(1)-C(1b)	1.53824	C(1a)-C(1)-C(2)	107.16204	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	-111.22955
C(1)-C(2)	1.53728	C(1b)-C(1)-C(2)	110.15341	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	129.54159
C(1)-C(6)	1.53804	C(1a)-C(1)-C(6)	110.94951	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-111.22955
C(2)-C(3)	1.51932	C(1b)-C(1)-C(6)	109.15029	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-50.49081
C(3)-C(4)	1.51982	C(2)-C(1)-C(6)	111.10285	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	68.73804
C(4)-C(5)	1.50769	C(1)-C(2)-C(3)	112.70667	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	62.09054
C(5)-C(5a)	1.50379	C(2)-C(3)-C(4)	109.12523	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.97224
C(5)=C(6)	1.35428	C(3)-C(4)-C(5)	113.72094	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-167.64359
C(6)-C(7)	1.46889	C(4)-C(5)-C(5a)	112.75572	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-175.83429
C(7)=C(8)	1.35015	C(4)-C(5)=C(6)	122.62533	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	6.44785
C(8)-C(9)	1.45245	C(5a)-C(5)=C(6)	124.58478	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	46.82107
C(9)-C(9a)	1.50164	C(5)=C(6)-C(7)	122.33297	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.57777
C(9)=C(10)	1.36218	C(6)-C(7)=C(8)	125.71359	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	-179.12348
C(10)-C(11)	1.43637	C(7)=C(8)-C(9)	125.78498	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	0.86535
C(11)=C(12)	1.35184	C(8)-C(9)-C(9a)	118.26301	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.85640
C(12)-C(13)	1.47075	C(9a)-C(9)=C(10)	123.69416	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.98717
C(13)-C(13a)	1.51613	C(8)-C(9)=C(10)	118.04283	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.15542
C(13)=O	1.22103	C(9)=C(10)-C(11)	127.50873	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.94775
		C(10)-C(11)=C(12)	123.45686	C(11)=C(12)-C(13)=O	179.94419
		C(11)=C(12)-C(13)	125.40568	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	-0.04663
		C(12)-C(13)-C(13a)	119.36847		
		C(13a)-C(13)=O	120.72230		
		C(12)=C(13)=O	119.90923		

Tabla III.3 Parámetros geométricos del  $\beta$ -apo-14'-carotenal con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53875	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.30437	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-164.73794
C(1)-C(1b)	1.53816	C(1a)-C(1)-C(2)	107.14503	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	77.65073
C(1)-C(2)	1.53791	C(1b)-C(1)-C(2)	110.17059	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	129.17659
C(1)-C(6)	1.53786	C(1a)-C(1)-C(6)	110.92398	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-111.58584
C(2)-C(3)	1.51910	C(1b)-C(1)-C(6)	109.12153	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-51.06363
C(3)-C(4)	1.51997	C(2)-C(1)-C(6)	111.12369	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	68.17394
C(4)-C(5)	1.50754	C(1)-C(2)-C(3)	112.75082	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	62.05860
C(5)-C(5a)	1.50397	C(2)-C(3)-C(4)	109.10646	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-46.02230
C(5)=C(6)	1.35423	C(3)-C(4)-C(5)	113.69240	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-167.67718
C(6)-C(7)	1.46899	C(4)-C(5)-C(5a)	112.70497	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-175.34748
C(7)=C(8)	1.35085	C(4)-C(5)=C(6)	122.67180	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	6.91191
C(8)-C(9)	1.45042	C(5a)-C(5)=C(6)	124.58976	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	47.14798
C(9)-C(9a)	1.50153	C(5)=C(6)-C(7)	122.28594	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.46562
C(9)=C(10)	1.36416	C(6)-C(7)=C(8)	125.39836	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	-178.72268
C(10)-C(11)	1.43211	C(7)=C(8)-C(9)	126.07272	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	1.25037
C(11)=C(12)	1.35878	C(8)-C(9)-C(9a)	118.37117	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.88197
C(12)-C(13)	1.44281	C(9a)-C(9)=C(10)	123.59835	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.95397
C(13)-C(13a)	1.50250	C(8)-C(9)=C(10)	118.03048	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.14649
C(13)=C(14)	1.36661	C(9)=C(10)-C(11)	127.85934	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.91310
C(14)-C(15)	1.43096	C(10)-C(11)=C(12)	122.91155	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	-179.98574
C(15)=C(15')	1.35455	C(11)=C(12)-C(13)	126.09688	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.03542
C(15')-C(14')	1.45568	C(12)-C(13)-C(14)	118.09391	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.94385
C(14')=O	1.21577	C(12)-C(13)-C(13a)	118.36590	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	179.96196
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.54019	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.03382
		C(13)=C(14)-C(15)	127.41262	C(14)-C(15)=C(15')-C(14')	-179.97969
		C(14)-C(15)=C(15')	124.36761	C(15)=C(15')-C(14')=O	179.95672
		C(15)=C(15')-C(14')	121.05539		
		C(15')-C(14')=O	124.82215		

Tabla III.4 Parámetros geométricos del  $\beta$ -apo-14'-carotenol con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53863	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.26121	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-164.93033
C(1)-C(1b)	1.53818	C(1a)-C(1)-C(2)	107.18474	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	77.48334
C(1)-C(2)	1.53775	C(1b)-C(1)-C(2)	110.17741	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	129.50366
C(1)-C(6)	1.53751	C(1a)-C(1)-C(6)	110.88815	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-111.32980
C(2)-C(3)	1.51921	C(1b)-C(1)-C(6)	109.12794	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	129.50366
C(3)-C(4)	1.52015	C(2)-C(1)-C(6)	111.14820	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	-111.32980
C(4)-C(5)	1.50795	C(1)-C(2)-C(3)	112.71502	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	62.05048
C(5)-C(5a)	1.50402	C(2)-C(3)-C(4)	109.12334	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.88504
C(5)=C(6)	1.35360	C(3)-C(4)-C(5)	113.67230	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-167.69228
C(6)-C(7)	1.47064	C(4)-C(5)-C(5a)	112.72970	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-175.37317
C(7)=C(8)	1.35031	C(4)-C(5)=C(6)	122.74781	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	6.83131
C(8)-C(9)	1.45131	C(5a)-C(5)=C(6)	124.49061	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	48.50915
C(9)-C(9a)	1.50172	C(5)=C(6)-C(7)	122.28576	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.56617
C(9)=C(10)	1.36262	C(6)-C(7)=C(8)	125.21749	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	-178.74933
C(10)-C(11)	1.43471	C(7)=C(8)-C(9)	126.26856	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	1.25006
C(11)=C(12)	1.35702	C(8)-C(9)-C(9a)	118.26904	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.73741
C(12)-C(13)	1.44622	C(9a)-C(9)=C(10)	123.60209	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.70286
C(13)-C(13a)	1.50308	C(8)-C(9)=C(10)	118.12886	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.26323
C(13)=C(14)	1.36135	C(9)=C(10)-C(11)	128.14890	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.85960
C(14)-C(15)	1.44134	C(10)-C(11)=C(12)	122.79183	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	-179.76200
C(15)=C(15')	1.34412	C(11)=C(12)-C(13)	126.39777	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.21803
C(15')-C(14')	1.49039	C(12)-C(13)-C(14)	118.22483	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.80467
C(14')-O	1.41755	C(12)-C(13)-C(13a)	118.16171	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	-179.68839
		C(13a)-C(13)=C(14)	123.61345	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.21647
		C(13)=C(14)-C(15)	123.61345	C(14)-C(15)=C(15')-C(14')	177.79235
		C(14)-C(15)=C(15')	123.61345	C(15)=C(15')-C(14')-O	129.65375
		C(15)=C(15')-C(14')	123.61345		
		C(15')-C(14')-O	123.61345		

Tabla III.5 Parámetros geométricos del  $\beta$ -apo-10'-carotenal con el método/base de cálculo *mPW1PW91/6-31G\**.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53869	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.24709	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-165.12434
C(1)-C(1b)	1.53819	C(1a)-C(1)-C(2)	107.16396	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	77.32790
C(1)-C(2)	1.53745	C(1b)-C(1)-C(2)	110.15940	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	129.71325
C(1)-C(6)	1.53803	C(1a)-C(1)-C(6)	110.98535	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-111.07728
C(2)-C(3)	1.51917	C(1b)-C(1)-C(6)	109.12945	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-50.50555
C(3)-C(4)	1.51976	C(2)-C(1)-C(6)	111.10278	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	68.70392
C(4)-C(5)	1.50823	C(1)-C(2)-C(3)	112.70223	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	62.08632
C(5)-C(5a)	1.50381	C(2)-C(3)-C(4)	109.14250	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.88078
C(5)=C(6)	1.35396	C(3)-C(4)-C(5)	113.70808	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-167.69545
C(6)-C(7)	1.46944	C(4)-C(5)-C(5a)	112.84415	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-175.70733
C(7)=C(8)	1.35101	C(4)-C(5)=C(6)	122.67089	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	6.56570
C(8)-C(9)	1.45042	C(5a)-C(5)=C(6)	124.45100	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	47.91554
C(9)-C(9a)	1.50186	C(5)=C(6)-C(7)	122.46280	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	178.66533
C(9)=C(10)	1.36451	C(6)-C(7)=C(8)	125.74280	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	-178.44999
C(10)-C(11)	1.43148	C(7)=C(8)-C(9)	125.84462	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	1.23963
C(11)=C(12)	1.36003	C(8)-C(9)-C(9a)	118.28538	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	179.58810
C(12)-C(13)	1.44032	C(9a)-C(9)=C(10)	123.51614	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.64668
C(13)-C(13a)	1.50260	C(8)-C(9)=C(10)	118.19769	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	-0.08407
C(13)=C(14)	1.36904	C(9)=C(10)-C(11)	127.83092	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	179.84776
C(14)-C(15)	1.42617	C(10)-C(11)=C(12)	123.04027	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	179.83426
C(15)=C(15')	1.36320	C(11)=C(12)-C(13)	126.11649	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	-0.15674
C(15')-C(14')	1.42735	C(12)-C(13)-C(14)	118.21989	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.84363
C(14')=C(13')	1.36695	C(12)-C(13)-C(13a)	118.41483	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	-179.97791
C(13')-C(13a')	1.50102	C(13a)-C(13)=C(14)	123.36528	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.14689
C(13')-C(12')	1.44219	C(13)=C(14)-C(15)	127.75560	C(14)-C(15)=C(15')-C(14')	-179.98160
C(12')=C(11')	1.35344	C(14)-C(15)=C(15')	123.62799	C(15)=C(15')-C(14')=C(13')	-179.96814
C(11')-C(10')	1.45658	C(15)=C(15')-C(14')	122.85795	C(15')-C(14')=C(13')-C(13a')	-0.08717

Apéndice III

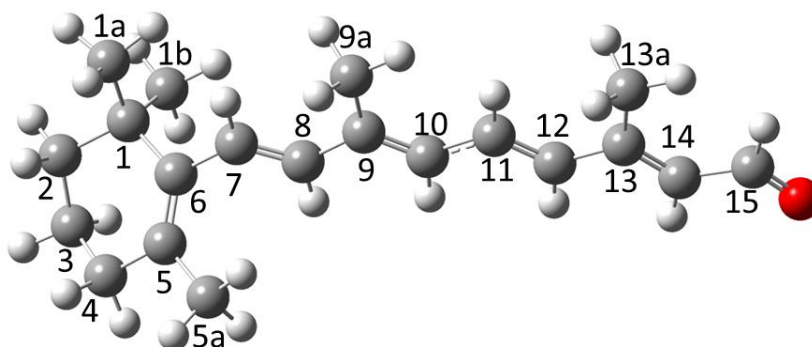
---

C(10')=O	1.21567	C(15')-C(14')=C(13')	128.05464	C(14')=C(13')-C(12')=C(11')	-179.76250
		C(14')=C(13')-C(13a')	124.05728	C(13')-C(12')=C(11')-C(10')	179.94297
		C(13a')-C(13')-C(12')	118.24713	C(13a')-C(13')-C(12')=C(11')	0.16007
		C(13')-C(12')=C(11')	126.91577	C(12')=C(11')-C(10')=O	-179.99516
		C(12')=C(11')-C(10')	120.62028		
		C(11')-C(10')=O	124.82024		

Tabla III.6 Parámetros geométricos del Retinal con el método/base de cálculo ωB97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.54076	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.36734	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-165.39381
C(1)-C(1b)	1.54068	C(1a)-C(1)-C(2)	107.49353	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	76.63468
C(1)-C(2)	1.53950	C(1b)-C(1)-C(2)	110.32083	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	131.36464
C(1)-C(6)	1.53779	C(1a)-C(1)-C(6)	110.81867	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-109.53590
C(2)-C(3)	1.52270	C(1b)-C(1)-C(6)	108.88038	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-49.72632
C(3)-C(4)	1.52346	C(2)-C(1)-C(6)	110.92438	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	69.37315
C(4)-C(5)	1.51225	C(1)-C(2)-C(3)	112.60825	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	61.81809
C(5)-C(5a)	1.50801	C(2)-C(3)-C(4)	109.27828	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.81412
C(5)=C(6)	1.34780	C(3)-C(4)-C(5)	113.56464	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-166.50689
C(6)-C(7)	1.47819	C(4)-C(5)-C(5a)	112.84729	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-176.55585
C(7)=C(8)	1.34289	C(4)-C(5)=C(6)	122.61446	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	5.42634
C(8)-C(9)	1.46328	C(5a)-C(5)=C(6)	124.51243	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	53.98410
C(9)-C(9a)	1.50542	C(5)=C(6)-C(7)	121.99808	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.45447
C(9)=C(10)	1.35394	C(6)-C(7)=C(8)	124.61211	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	179.82425
C(10)-C(11)	1.44683	C(7)=C(8)-C(9)	125.84838	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	-0.14838
C(11)=C(12)	1.34842	C(8)-C(9)-C(9a)	117.65593	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.33333
C(12)-C(13)	1.46053	C(9a)-C(9)=C(10)	124.14517	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	179.87030
C(13)-C(13a)	1.50756	C(8)-C(9)=C(10)	118.19890	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.63738
C(13)=C(14)	1.35391	C(9)=C(10)-C(11)	127.43991	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.53970
C(14)-C(15)	1.46423	C(10)-C(11)=C(12)	122.89421	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	-179.91636
C(15)=O	1.21560	C(11)=C(12)-C(13)	125.73059	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.09123
		C(12)-C(13)-C(14)	118.12661	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.97689
		C(12)-C(13)-C(13a)	117.58625	C(13)=C(14)-C(15)=O	-179.93228
		C(13a)-C(13)=C(14)	124.28714	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.01497
		C(13)=C(14)-C(15)	126.91851		
		C(14)-C(15)=O	122.81369		

Estructura

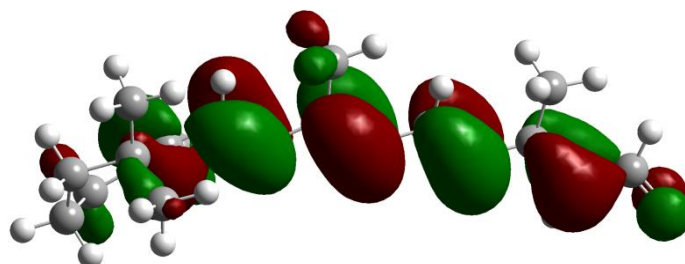


**Figura III.1** Estructura molecular más estable del retinal calculada con el método  $\omega$ B97xD.

Orbitales HOMO y LUMO

Orbital HOMO del retinal:

En la Figura III.2 se expone la distribución del orbital HOMO perteneciente al retinal calculado por el método  $\omega$ B97xD.



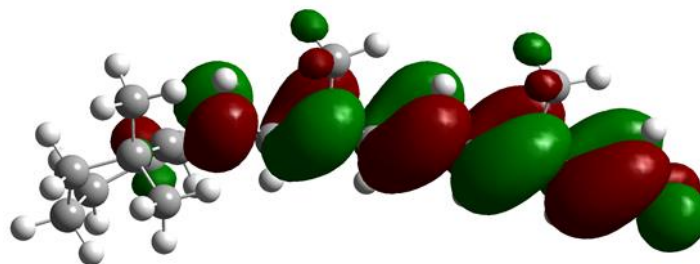
**Figura III.2** Orbital HOMO del retinal.

Se puede confirmar que el reparto se produce sobre las zonas en las que existe una mayor contribución al doble enlace, hecho que también se apreciaba en el otro método de cálculo presentado en el Capítulo 6.

Orbital LUMO del retinal

En la Figura III.3 se puede ver el orbital LUMO del retinal calculado con el método antes citado.

En este caso la distribución se presenta sobre las zonas que presentan una mayor contribución de enlace simple, como también sucedía con el otro método presentado en la memoria. En todos los casos presentados los orbitales son de tipo  $\pi$ .



**Figura III.3** Orbital LUMO del retinal.

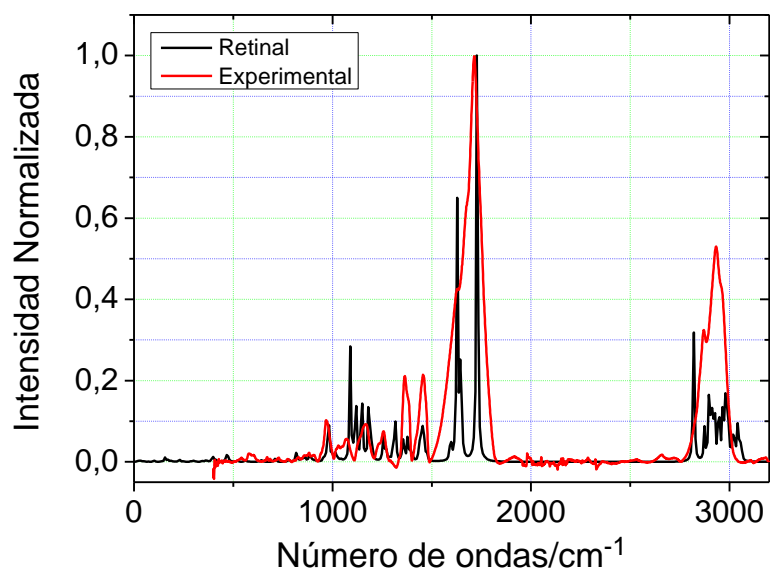
En la Tabla III.7 se presentan los resultados obtenidos con las ecuaciones 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, y 5.5 del texto.

**Tabla III.7** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la geometría optimizada del retinal. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

<b>Parámetro</b>	<b>Retinal</b>
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	7.23
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	0.54
$\Delta E / \text{eV}$	6.69
$\eta / \text{eV}$	3.35
$\sigma / \text{eV}^{-1}$	0.30
$\mu / \text{eV}$	-3.89
$\omega^\circ / \text{eV}$	2.26

#### Espectro IR comparado con experimental

En la Figura III.4 se presenta el espectro IR calculado del retinal comparado con el espectro IR experimental de una muestra que permaneció en el horno 4 horas a 130°C.



**Figura III.4** Espectro IR calculado y experimental del retinal.

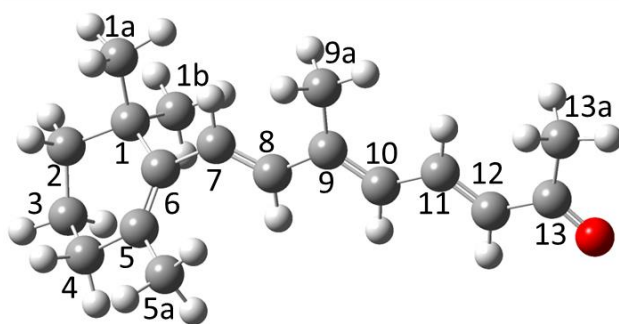
Al igual que sucedía con el otro método, existe una similitud manifiesta entre los cálculos realizados y las señales obtenidas mediante medidas de ATR-IR.

Como se ha dejado entrever a lo largo de la memoria, se trata de la molécula predicha con un mayor grado de coincidencia en comparación con los resultados experimentales obtenidos, para más información véase Capítulo 6.

Tabla III.8 Parámetros geométricos de la  $\beta$ -apo-13-carotenona con el método/base de cálculo  $\omega$ B97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.54097	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.32393	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-165.52075
C(1)-C(1b)	1.54079	C(1a)-C(1)-C(2)	107.40852	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	76.64742
C(1)-C(2)	1.53956	C(1b)-C(1)-C(2)	110.25217	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	131.33085
C(1)-C(6)	1.53826	C(1a)-C(1)-C(6)	110.90388	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-109.53447
C(2)-C(3)	1.52250	C(1b)-C(1)-C(6)	108.93951	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-49.46424
C(3)-C(4)	1.52320	C(2)-C(1)-C(6)	110.97266	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	69.67044
C(4)-C(5)	1.51202	C(1)-C(2)-C(3)	112.61646	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	61.66842
C(5)-C(5a)	1.50822	C(2)-C(3)-C(4)	109.34257	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.46982
C(5)=C(6)	1.34856	C(3)-C(4)-C(5)	113.67733	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-166.87749
C(6)-C(7)	1.47710	C(4)-C(5)-C(5a)	112.70299	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-176.59950
C(7)=C(8)	1.34316	C(4)-C(5)=C(6)	122.63024	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	5.30995
C(8)-C(9)	1.46361	C(5a)-C(5)=C(6)	124.64287	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	51.18351
C(9)-C(9a)	1.50540	C(5)=C(6)-C(7)	122.04248	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	-179.86417
C(9)=C(10)	1.35380	C(6)-C(7)=C(8)	124.90396	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	178.78885
C(10)-C(11)	1.44792	C(7)=C(8)-C(9)	125.72188	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	-0.93620
C(11)=C(12)	1.34563	C(8)-C(9)-C(9a)	117.73351	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.19543
C(12)-C(13)	1.47904	C(9a)-C(9)=C(10)	124.13037	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	179.55354
C(13)-C(13a)	1.51890	C(8)-C(9)=C(10)	118.13551	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.51057
C(13)=O	1.21824	C(9)=C(10)-C(11)	127.26322	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.58787
		C(10)-C(11)=C(12)	123.34565	C(11)=C(12)-C(13)=O	-179.84104
		C(11)=C(12)-C(13)	124.99424	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.40793
		C(12)-C(13)-C(13a)	119.07817		
		C(13a)-C(13)=O	120.97254		
		C(12)=C(13)=O	119.94882		

Estructura

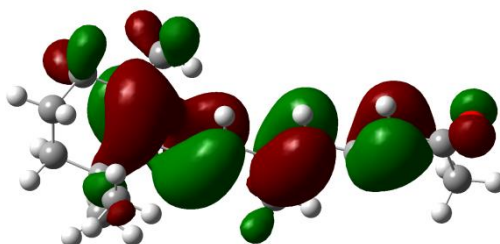


**Figura III.5** Estructura molecular más estable de la  $\beta$ -apo-13-carotenona calculada con el método  $\omega$ B97xD.

Orbitales HOMO y LUMO

Orbital HOMO de la  $\beta$ -apo-13-carotenona

En la Figura III.6 se presenta la distribución del orbital HOMO perteneciente a la  $\beta$ -apo-13-carotenona calculado por el método  $\omega$ B97xD.



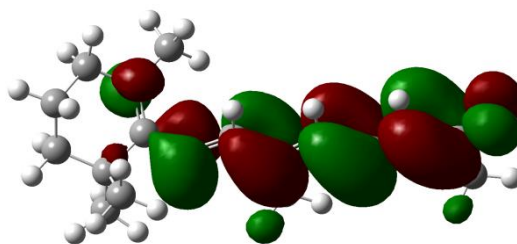
**Figura III.6** Orbital HOMO de la  $\beta$ -apo-13-carotenona.

De igual manera que sucedía en la molécula de retinal, en este caso el reparto de los orbitales también se acentúa en aquellas zonas en las que la contribución al doble enlace es mayor.

Orbital LUMO de la  $\beta$ -apo-13-carotenona

En la Figura III.7 se puede ver el orbital LUMO la  $\beta$ -apo-13-carotenona calculado con el método antes citado.

En este caso, la mayor contribución orbitalaria se localiza sobre las zonas cuyo carácter de doble enlace es menor.



**Figura III.7** Orbital LUMO de la  $\beta$ -apo-13-carotenona.

En la Tabla III.9 se presentan los resultados obtenidos con las ecuaciones 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, y 5.5 del texto.

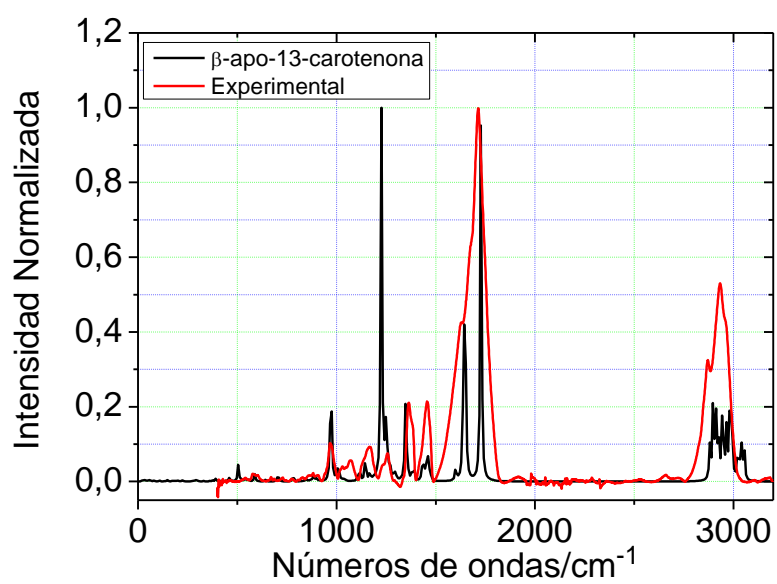
**Tabla III.9** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la geometría optimizada de la  $\beta$ -apo-13-carotenona. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

Parámetro	$\beta$ -apo-13-carotenona
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	7.46
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	0.27
$\Delta E / \text{eV}$	7.19
$\eta / \text{eV}$	3.59
$\sigma / \text{eV}^{-1}$	0.28
$\mu / \text{eV}$	-3.86
$\omega^\circ / \text{eV}$	2.07

### Espectro IR comparado con experimental

En la Figura III.8 se presenta el espectro IR calculado de la  $\beta$ -apo-13-carotenona comparado con el espectro IR experimental de una muestra que permaneció en el horno 4 horas a 130°C.

A pesar de que la coincidencia es aceptable, no es tan buena como en el caso del retinal. En primer lugar porque se trata de una molécula que presenta un grupo funcional diferente (cetona) en comparación con la citada molécula (aldehído) haciendo que algunas intensidades y desplazamientos varíen significativamente.



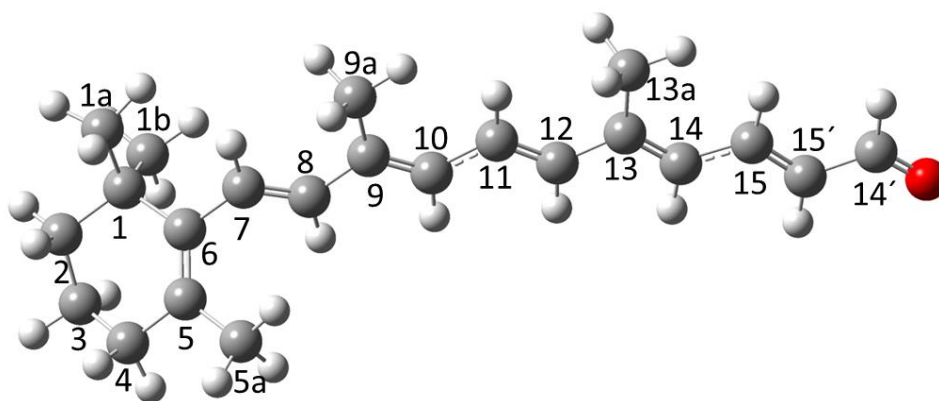
**Figura III.8** Espectro IR calculado y experimental de la  $\beta$ -apo-13-carotenona.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos mediante el otro método de cálculo presentado en la memoria a lo largo del Capítulo 6.

Tabla III.10 Parámetros geométricos del  $\beta$ -apo-14'-carotenal con el método/base de cálculo  $\omega$ B97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.54087	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.33882	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-164.98198
C(1)-C(1b)	1.54055	C(1a)-C(1)-C(2)	107.47443	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	77.10070
C(1)-C(2)	1.53968	C(1b)-C(1)-C(2)	110.30504	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	130.54560
C(1)-C(6)	1.53795	C(1a)-C(1)-C(6)	110.69916	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-110.38265
C(2)-C(3)	1.52263	C(1b)-C(1)-C(6)	109.00757	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-50.35721
C(3)-C(4)	1.52324	C(2)-C(1)-C(6)	110.97492	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	68.71455
C(4)-C(5)	1.51184	C(1)-C(2)-C(3)	112.63992	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	61.89350
C(5)-C(5a)	1.50815	C(2)-C(3)-C(4)	109.18877	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.91288
C(5)=C(6)	1.34832	C(3)-C(4)-C(5)	113.58563	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-166.68359
C(6)-C(7)	1.47790	C(4)-C(5)-C(5a)	112.82977	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-175.96936
C(7)=C(8)	1.34322	C(4)-C(5)=C(6)	122.62168	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	5.86513
C(8)-C(9)	1.46270	C(5a)-C(5)=C(6)	124.52643	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	52.57258
C(9)-C(9a)	1.50534	C(5)=C(6)-C(7)	121.98610	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	179.56157
C(9)=C(10)	1.35404	C(6)-C(7)=C(8)	124.46994	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	178.81277
C(10)-C(11)	1.44661	C(7)=C(8)-C(9)	126.01296	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	-0.91327
C(11)=C(12)	1.34920	C(8)-C(9)-C(9a)	117.74282	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-179.73281
C(12)-C(13)	1.45778	C(9a)-C(9)=C(10)	124.09360	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	178.23264
C(13)-C(13a)	1.50587	C(8)-C(9)=C(10)	118.16296	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	-0.02560
C(13)=C(14)	1.35645	C(9)=C(10)-C(11)	127.65632	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-179.90536
C(14)-C(15)	1.44425	C(10)-C(11)=C(12)	122.70952	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	178.61522
C(15)=C(15')	1.34735	C(11)=C(12)-C(13)	125.94447	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	-1.24351
C(15')-C(14')	1.46448	C(12)-C(13)-C(14)	118.12353	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	179.91081
C(14')=O	1.21309	C(12)-C(13)-C(13a)	117.84884	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	178.67270
		C(13a)-C(13)=C(14)	124.02747	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	-0.23991
		C(13)=C(14)-C(15)	127.20994	C(14)-C(15)=C(15')-C(14')	179.95684
		C(14)-C(15)=C(15')	124.09872	C(15)=C(15')-C(14')=O	179.44636
		C(15)=C(15')-C(14')	120.87681		
		C(15')-C(14')=O	124.60564		

Estructura

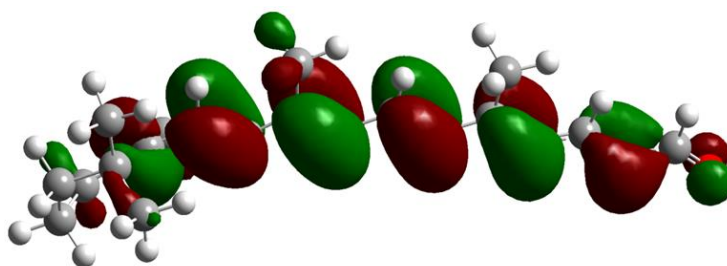


**Figura III.9** Estructura molecular más estable del  $\beta$ -apo-14'-carotenal calculada con el método  $\omega$ B97xD.

Orbitales HOMO y LUMO

Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal:

En la Figura III.10 se presenta la distribución del orbital HOMO perteneciente al  $\beta$ -apo-14'-carotenal calculado por el método  $\omega$ B97xD.



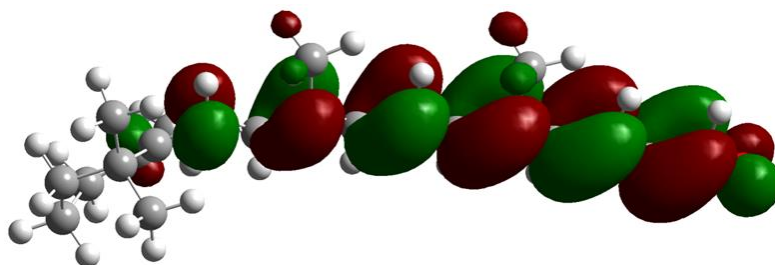
**Figura III.10** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal.

En este tipo de moléculas, los resultados obtenidos son muy similares a los expuestos anteriormente. En la zona del oxígeno perteneciente al grupo carbonilo existe una disminución de densidad en comparación con el resto de la cadena hidrocarbonada.

Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal

En la Figura III.11 se puede ver el orbital LUMO la  $\beta$ -apo-14'-carotenonal calculado con el método antes citado.

En la figura se aprecian los orbitales con simetría  $\pi$  con el correspondiente cambio de coloración que hace referencia al signo de la función de onda.



**Figura III.11** Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenal.

En la Tabla III.11 se presentan los resultados obtenidos con las ecuaciones 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, y 5.5 del texto.

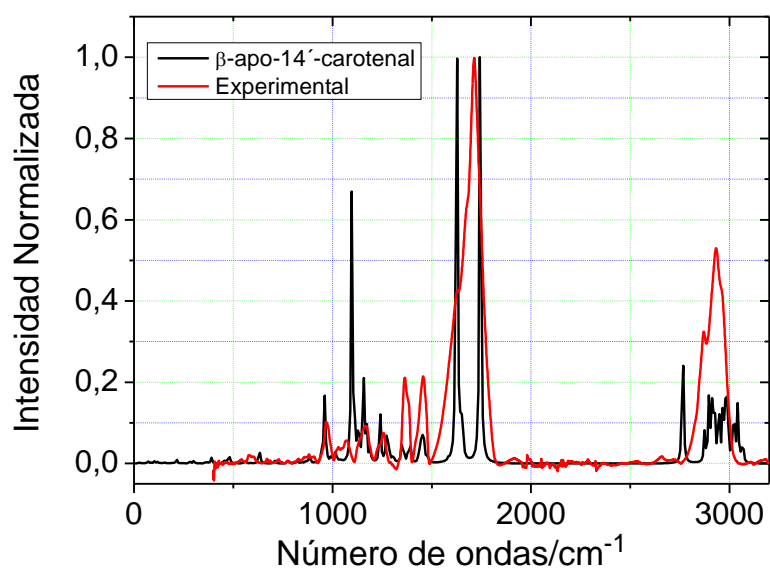
**Tabla III.11** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la geometría optimizada del  $\beta$ -apo-14'-carotenal. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

Parámetro	$\beta$ -apo-14'-carotenal
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	7.03
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	0.71
$\Delta E / \text{eV}$	6.32
$\eta / \text{eV}$	3.16
$\sigma / \text{eV}^{-1}$	0.32
$\mu / \text{eV}$	-3.87
$\omega^\circ / \text{eV}$	2.37

### Espectro IR comparado con experimental

En la Figura III.12 se presenta el espectro IR calculado del  $\beta$ -apo-14'-carotenal comparado con el espectro IR experimental de una muestra que permaneció en el horno 4 horas a 130°C.

Como sucedía con los cálculos realizados mediante el método presentado en el capítulo 6 no puede descartarse alguna contribución de este tipo de moléculas en la muestra experimental dado que existe una coincidencia considerable al compararlo con el espectro obtenido mediante modelización molecular.



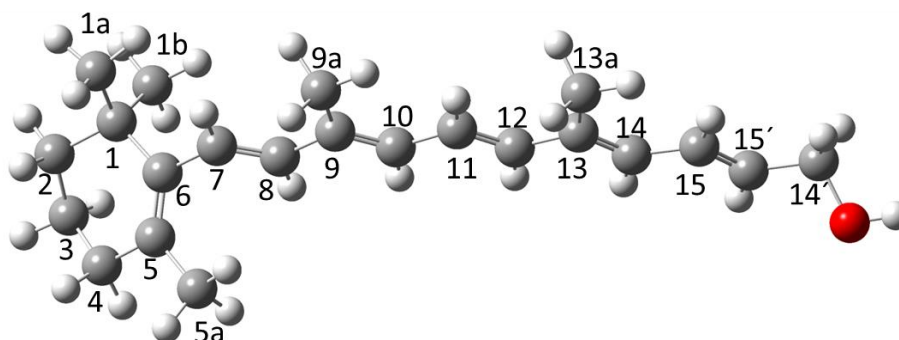
**Figura III.12** Espectro IR calculado y experimental del  $\beta$ -apo-14'-carotenal.

Los resultados son muy similares a los presentados en el capítulo 6 mediante la otra metodología de cálculo empleada *mPW1PW91/6-31G\**.

Tabla III.12 Parámetros geométricos del  $\beta$ -apo-14'-carotenol con el método/base de cálculo  $\omega$ B97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.53994	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.26706	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-166.40117
C(1)-C(1b)	1.54079	C(1a)-C(1)-C(2)	107.66748	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	75.62843
C(1)-C(2)	1.53943	C(1b)-C(1)-C(2)	110.35180	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	132.99173
C(1)-C(6)	1.53700	C(1a)-C(1)-C(6)	110.81818	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-108.06778
C(2)-C(3)	1.52301	C(1b)-C(1)-C(6)	108.82335	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-48.26926
C(3)-C(4)	1.52380	C(2)-C(1)-C(6)	110.87797	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	70.67123
C(4)-C(5)	1.51216	C(1)-C(2)-C(3)	112.58389	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	61.44946
C(5)-C(5a)	1.50819	C(2)-C(3)-C(4)	109.43941	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-44.64383
C(5)=C(6)	1.34734	C(3)-C(4)-C(5)	113.77956	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-167.10278
C(6)-C(7)	1.48007	C(4)-C(5)-C(5a)	112.89656	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-177.01929
C(7)=C(8)	1.34266	C(4)-C(5)=C(6)	122.76613	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	4.80894
C(8)-C(9)	1.46322	C(5a)-C(5)=C(6)	124.31531	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	57.43633
C(9)-C(9a)	1.50547	C(5)=C(6)-C(7)	121.81271	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	-179.64340
C(9)=C(10)	1.35318	C(6)-C(7)=C(8)	124.19105	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	-179.73812
C(10)-C(11)	1.44816	C(7)=C(8)-C(9)	126.18069	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	0.61845
C(11)=C(12)	1.34844	C(8)-C(9)-C(9a)	117.64356	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	-178.68242
C(12)-C(13)	1.45951	C(9a)-C(9)=C(10)	124.10453	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	-179.63109
C(13)-C(13a)	1.50643	C(8)-C(9)=C(10)	118.25087	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.93611
C(13)=C(14)	1.35277	C(9)=C(10)-C(11)	127.90419	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	-178.95788
C(14)-C(15)	1.45251	C(10)-C(11)=C(12)	122.62085	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	179.92705
C(15)=C(15')	1.33914	C(11)=C(12)-C(13)	126.19245	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	0.08767
C(15')-C(14')	1.49520	C(12)-C(13)-C(14)	118.25169	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	-179.35987
C(14')-O	1.41745	C(12)-C(13)-C(13a)	117.68355	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	-179.49711
		C(13a)-C(13)=C(14)	124.06455	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	0.46843
		C(13)=C(14)-C(15)	127.86813	C(14)-C(15)=C(15')-C(14')	0.46843
		C(14)-C(15)=C(15')	123.17231	C(15)=C(15')-C(14')-O	0.46843
		C(15)=C(15')-C(14')	124.32151		
		C(15')-C(14')-O	108.45773		

Estructura

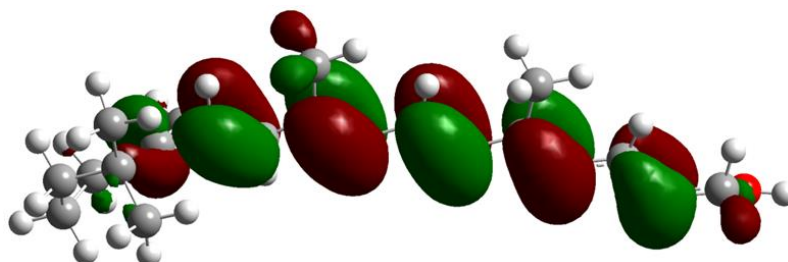


**Figura III.13** Estructura molecular más estable del  $\beta$ -apo-14'-carotenol calculada con el método  $\omega$ B97xD.

Orbitales HOMO y LUMO

Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol

En la Figura III.14 se presenta la distribución del orbital HOMO perteneciente al  $\beta$ -apo-14'-carotenol calculado por el método  $\omega$ B97xD.



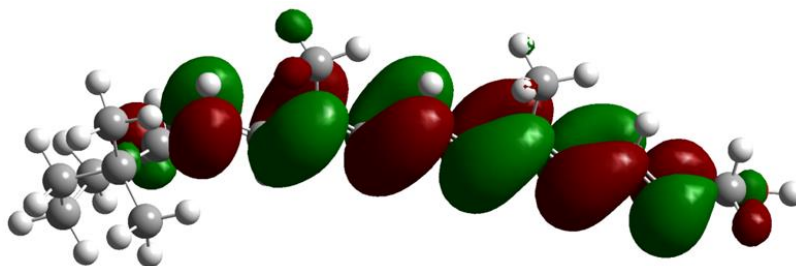
**Figura III.14** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

En la figura se observa la distribución de los orbitales con una menor contribución tanto en la zona perteneciente a los anillos de  $\beta$ -ionona así como en la región donde aparece el grupo alcohol. Encontrándose una mayor contribución en la parte central de la molécula.

Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol

En la Figura III.15 se puede ver el orbital LUMO la  $\beta$ -apo-14'-carotenol calculado con el método antes citado.

Igual que en el orbital HOMO, en el LUMO también se puede apreciar con claridad una mayor contribución en la parte central de la molécula si se compara con el anillo lateral y con la zona en la que se encuentra el grupo funcional alcohol.



**Figura III.15** Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

En la Tabla III.13 se presentan los resultados obtenidos con las ecuaciones 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, y 5.5 del texto.

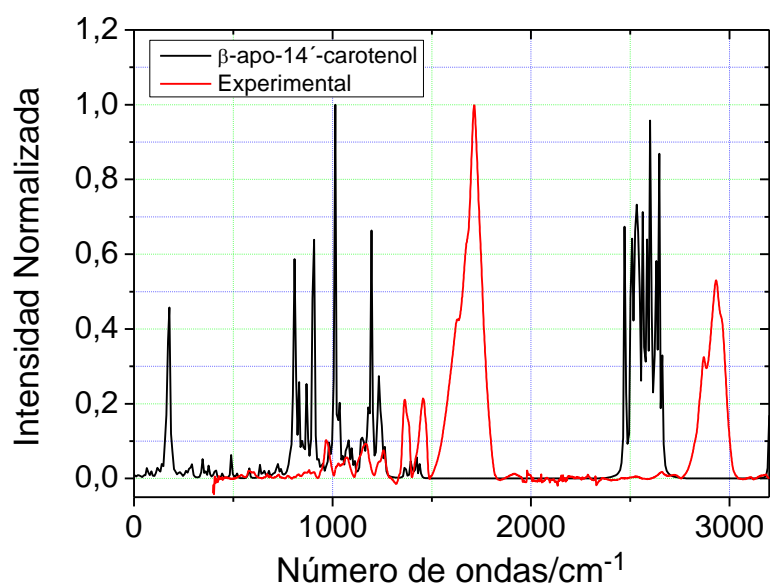
**Tabla III.13** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la geometría optimizada del  $\beta$ -apo-14'-carotenol. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

Parámetro	$\beta$ -apo-14'-carotenol
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	6.66
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	-0.08
$\Delta E / \text{eV}$	6.74
$\eta / \text{eV}$	3.37
$\sigma / \text{eV}^{-1}$	0.30
$\mu / \text{eV}$	-3.29
$\omega^\circ / \text{eV}$	1.60

#### Espectro IR comparado con experimental

En la Figura III.16 se presenta el espectro IR calculado del  $\beta$ -apo-14'-carotenol comparado con el espectro IR experimental de una muestra que permaneció en el horno 4 horas a 130°C.

De la misma manera que sucedía con los resultados presentados en el capítulo 6 de esta misma memoria, la coincidencia espectral para este tipo de moléculas no es muy significativa si se compara con el espectro obtenido experimentalmente.



**Figura III.16** Espectro IR calculado y experimental del  $\beta$ -apo-14'-carotenol.

Esto hace que se pueda descartar esta molécula como posible producto de degradación con el grupo funcional alcohol en su extremo.

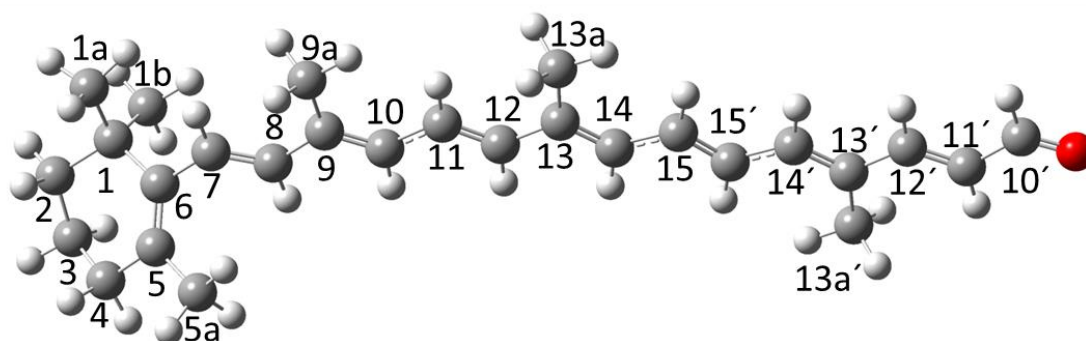
Tabla III.14 Parámetros geométricos del  $\beta$ -apo-10'-carotenal con el método/base de cálculo  $\omega$ B97xD/6-31G\*.

Átomos implicados	Distancia de enlace/Å	Átomos implicados	Ángulo de enlace /°	Átomos implicados	Ángulo diedro/°
C(1)-C(1a)	1.54064	C(1a)-C(1)-C(1b)	108.39518	C(1a)-C(1)-C(2)-C(3)	-165.87525
C(1)-C(1b)	1.54078	C(1a)-C(1)-C(2)	107.45145	C(1b)-C(1)-C(2)-C(3)	76.18783
C(1)-C(2)	1.53964	C(1b)-C(1)-C(2)	110.24230	C(1a)-C(1)-C(6)=C(5)	131.67841
C(1)-C(6)	1.53819	C(1a)-C(1)-C(6)	110.92310	C(1b)-C(1)-C(6)=C(5)	-109.12532
C(2)-C(3)	1.52248	C(1b)-C(1)-C(6)	108.87959	C(1a)-C(1)-C(6)-C(7)	-49.54900
C(3)-C(4)	1.52339	C(2)-C(1)-C(6)	110.91357	C(1b)-C(1)-C(6)-C(7)	69.64728
C(4)-C(5)	1.51242	C(1)-C(2)-C(3)	112.62132	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	61.69139
C(5)-C(5a)	1.50817	C(2)-C(3)-C(4)	109.35039	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-45.12351
C(5)=C(6)	1.34796	C(3)-C(4)-C(5)	113.67981	C(3)-C(4)-C(5)-C(5a)	-166.99259
C(6)-C(7)	1.47793	C(4)-C(5)-C(5a)	112.81003	C(4)-C(5)=C(6)-C(7)	-176.12264
C(7)=C(8)	1.34332	C(4)-C(5)=C(6)	122.74348	C(5a)-C(5)=C(6)-C(7)	5.51746
C(8)-C(9)	1.46286	C(5a)-C(5)=C(6)	124.42882	C(5)=C(6)-C(7)=C(8)	52.66263
C(9)-C(9a)	1.50569	C(5)=C(6)-C(7)	122.29004	C(6)-C(7)=C(8)-C(9)	178.45030
C(9)=C(10)	1.35409	C(6)-C(7)=C(8)	124.88361	C(7)=C(8)-C(9)=C(10)	179.44125
C(10)-C(11)	1.44661	C(7)=C(8)-C(9)	125.82259	C(7)=C(8)-C(9)-C(9a)	-0.67795
C(11)=C(12)	1.34943	C(8)-C(9)-C(9a)	117.67660	C(8)-C(9)=C(10)-C(11)	179.98406
C(12)-C(13)	1.45698	C(9a)-C(9)=C(10)	123.99587	C(9)=C(10)-C(11)=C(12)	179.36565
C(13)-C(13a)	1.50609	C(8)-C(9)=C(10)	118.32741	C(9a)-C(9)=C(10)-C(11)	0.11138
C(13)=C(14)	1.35676	C(9)=C(10)-C(11)	127.55837	C(10)-C(11)=C(12)-C(13)	179.99515
C(14)-C(15)	1.44305	C(10)-C(11)=C(12)	122.98943	C(11)=C(12)-C(13)=C(14)	179.77222
C(15)=C(15')	1.35173	C(11)=C(12)-C(13)	125.87647	C(11)=C(12)-C(13)-C(13a)	-0.28924
C(15')-C(14')	1.44344	C(12)-C(13)-C(14)	118.30863	C(12)-C(13)=C(14)-C(15)	179.89054
C(14')-C(13')	1.35603	C(12)-C(13)-C(13a)	117.78548	C(13)=C(14)-C(15)=C(15')	179.76073
C(13')-C(13a')	1.50476	C(13a)-C(13)=C(14)	123.90586	C(13a)-C(13)=C(14)-C(15)	-0.04394
C(13')-C(12')	1.45544	C(13)=C(14)-C(15)	127.56344	C(14)-C(15)=C(15')-C(14')	179.97906
C(12')-C(11')	1.34649	C(14)-C(15)=C(15')	123.45607	C(15)=C(15')-C(14')=C(13')	179.78124
C(11')-C(10')	1.46521	C(15)=C(15')-C(14')	122.55053	C(15')-C(14')=C(13')-C(13a')	-0.03220

Apéndice III

---

C(10')=O	1.21297	C(15')-C(14')=C(13')	127.96353	C(14')=C(13')-C(12')=C(11')	179.85369
		C(14')=C(13')-C(13a')	124.55744	C(13')-C(12')=C(11')-C(10')	179.81134
		C(13a')-C(13')-C(12')	117.73500	C(13a')-C(13')-C(12')=C(11')	-0.10370
		C(13')-C(12')=C(11')	126.66102	C(12')=C(11')-C(10')=O	179.99618
		C(12')=C(11')-C(10')	120.46682		
		C(11')-C(10')=O	124.58996		

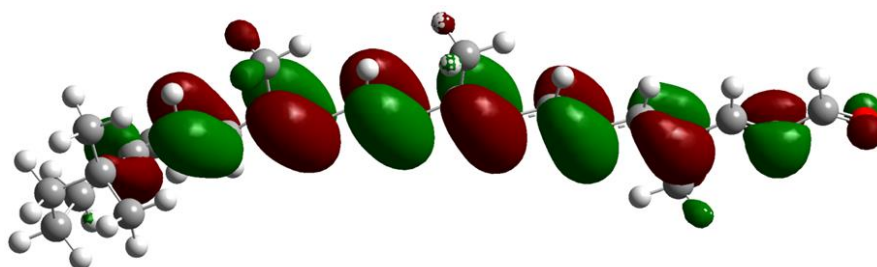
Estructura

**Figura III.17** Estructura molecular más estable del  $\beta$ -apo-10'-carotenal calculada con el método  $\omega$ B97xD.

Orbitales HOMO y LUMO

Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal:

En la Figura III.18 se presenta el reparto del orbital HOMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal calculado por el método  $\omega$ B97xD.



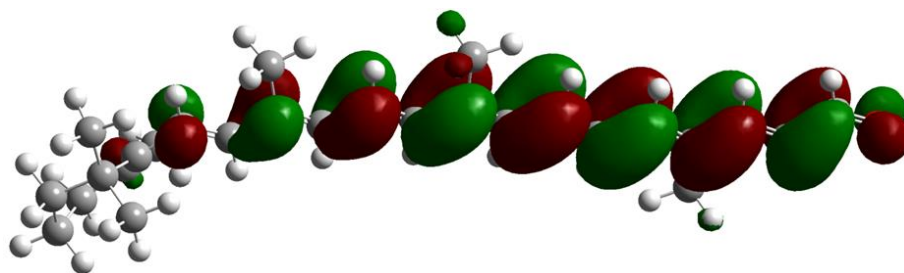
**Figura III.18** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

En este apocarotenal los orbitales se localizan principalmente en la parte central de la molécula con una menor contribución en los extremos. Además el orbital molecular se sitúa principalmente sobre las regiones en las que existe un mayor carácter de doble enlace.

Orbital LUMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal

En la Figura III.19 se puede ver el orbital LUMO la  $\beta$ -apo-10'-carotenal calculado con el método antes citado.

Al contrario de lo que sucedía en el caso del orbital HOMO, en el LUMO la contribución es mayoritaria sobre aquellos enlaces cuya contribución al enlace doble es menor.



**Figura III.19** Orbital HOMO del  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

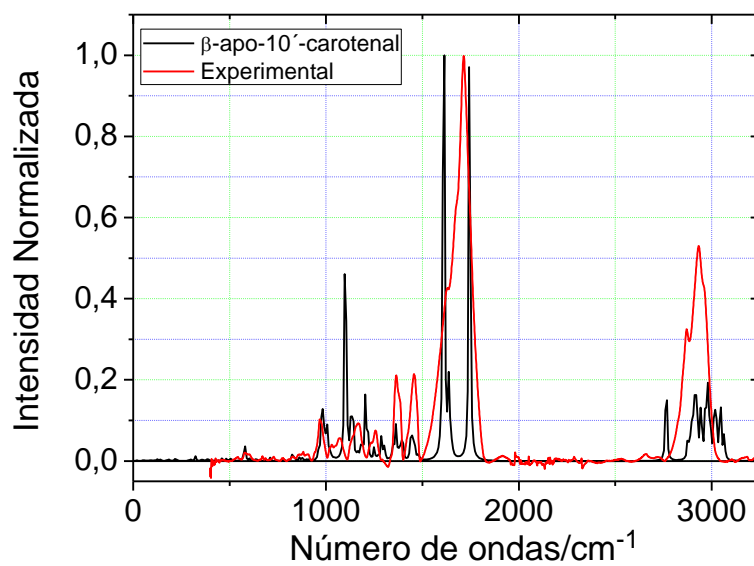
En la Tabla III.15 se presentan los resultados obtenidos con las ecuaciones 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 del texto.

**Tabla III.15** Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la geometría optimizada del  $\beta$ -apo-10'-carotenal. Siendo  $\Delta E$  (diferencia de energías HOMO LUMO),  $\eta$  (dureza),  $\sigma$  (fragilidad),  $\mu$  (potencial),  $\omega^\circ$  (electrofilia global).

Parámetro	$\beta$ -apo-10'-carotenal
$-E_{\text{HOMO}} / \text{eV}$	6.69
$-E_{\text{LUMO}} / \text{eV}$	0.88
$\Delta E / \text{eV}$	5.83
$\eta / \text{eV}$	2.92
$\sigma / \text{eV}^{-1}$	0.34
$\mu / \text{eV}$	-3.77
$\omega^\circ / \text{eV}$	2.44

#### Espectro IR comparado con experimental

En la Figura III.20 se presenta el espectro IR calculado del  $\beta$ -apo-10'-carotenal comparado con el espectro IR experimental de una muestra que permaneció en el horno 4 horas a 130°C.



**Figura III.20** Espectro IR calculado y experimental del  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

En este caso, los espectros presentan una alta coincidencia, aunque no tan marcada como la que se producía en el caso del retinal. Por lo que no puede descartarse la formación de este producto tras la descomposición térmica del  $\beta$ -caroteno.



# APÉNDICE IV



### Lista de Figuras:

<b>Figure 1.1:</b> An electromagnetic wave with perpendicular electric and magnetic field. ....	23
<b>Figure 1.2:</b> Jablonsky diagram representing quantum energy transitions for Rayleigh and Raman scattering. ....	24
<b>Figure 1.3:</b> Different Raman geometries. Left: SORS, center: Backscattering, right: transmission. L: Laser beam. R: Raman scattering. ....	28
<b>Figure 1.4:</b> Typical generation of evanescent wave in ATR-IR technique. ....	30
<b>Figura 2.1:</b> Estructura molecular del $\beta$ -caroteno donde destaca la alta conjugación de dobles enlaces. ....	55
<b>Figura 2.2:</b> Espectro de absorción UV-VIS del $\beta$ -caroteno en hexano. ....	55
<b>Figura 2.3:</b> Montaje esquemático para las medidas de Transmisión Raman Resonante (TRRS). <b>1:</b> Láser de diodo (CW $\lambda=532\text{nm}$ ); <b>2:</b> Fotodetector; <b>3:</b> Medidor de potencia; <b>4:</b> Espejo ( $90^\circ$ ); <b>5:</b> Lente plano convexa $f$ (75mm) ( $\phi=25.4\text{mm}$ ); <b>6:</b> Porta muestras con micrómetro XY y muestra; <b>7:</b> Diafragma; <b>8:</b> Lente plano convexa $f$ (25mm) ( $\phi=25.4\text{ mm}$ ); <b>9:</b> Filtro de corte (Semrock modelo LP03-532RU-25); <b>10:</b> Espectrógrafo Shamrock 163; <b>11:</b> CCD (Charge Coupled Device) con módulo de enfriamiento: Detector modelo Newton (Andor) 920; <b>12:</b> Ordenador. ....	56
<b>Figura 2.4:</b> Montaje experimental empleado para medir el cociente de despolarización en espectroscopia Raman Resonante de Transmisión con Luz Linealmente Polarizada. <b>(1): A:</b> Láser de diodo (CW $\lambda=532\text{nm}$ ), <b>B</b> y <b>C:</b> Sistema de espejos, <b>D:</b> Medidor de potencia, <b>E:</b> Primer polarizador Glan-Taylor, <b>F:</b> Fuente de alimentación y control del láser, <b>G:</b> Cámara CCD, <b>H:</b> Sistema de refrigeración de la cámara CCD. <b>(2): I:</b> Lente plano convexa $f$ (75 mm), <b>J:</b> Muestra, <b>K:</b> Portamuestras con micrómetro XY, <b>L:</b> Diafragma, <b>M:</b> Segundo polarizador Glan Taylor, <b>N:</b> Lente plano convexa de 25 mm de distancia focal y filtro 532 nm, <b>O:</b> Entrada al detector. <b>P:</b> Espectrómetro. ....	60
<b>Figura 2.5:</b> Esquema ilustrativo de distintas configuraciones para la medida del cociente de despolarización. <b>M:</b> Muestra; <b>G.T.P:</b> Polarizador Glan-Taylor; <b>A:</b> configuración para la medida de polarización paralela; <b>B:</b> configuración para la medida de polarización perpendicular. ....	61
<b>Figura 2.6:</b> Intensidad frente al ángulo del polarizador .....	62
<b>Figura 2.7:</b> Estructura molecular del licopeno donde destaca la alta conjugación de dobles enlaces. ....	63

**Figura 2.8:** Espectro de absorción UV-VIS de un extracto de licopeno en hexano..... 64

**Figura 2.9:** Sonda de la casa comercial InPhotonics modelo: RPBXXX empleada para las medidas de intensidad Raman a 180° (backscattering) y a 90° empleando solo el canal de detección. **A)** Canal de detección. **B)** canal de excitación. **OM:** Obturador manual. **DF:** Filtro dicróico **F1:** Filtro de paso largo OD (Optical Density) > 6. **FPB2:** Filtro de paso de banda. **M:** Muestra. .... 64

**Figura 2.10:** Montaje experimental para la medida de: **(a)** Señal Raman de carotenoides en tomates en configuración de Backscattering 180° **(b)** Cocientes de despolarización de las bandas Raman de los carotenoides presentes en el pericarpio exterior de los tomates a 90°. **PC:** Ordenador, **CCD:** Detector, **F:** Filtro, **D:** Dicroico, **P.M:** Medidor de potencia, **L:** Laser de diodo (CW,  $\lambda= 532\text{nm}$ ), **G.T.P:** Polarizador de Glan-Taylor. 1) Configuración paralela, i.e.  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ . 2) Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$  Donde  $\epsilon$  Representa el vector unitario del campo eléctrico. .... 66

**Figura 3.1:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de zanahoria de 5 mm de espesor. 66 adquisiciones de 10 segundos cada una. .... 79

**Figura 3.2:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de mango con 0.7 mm de espesor obtenido a tiempo 0 horas. .... 81

**Figura 3.3:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una pastilla de 0.1mg de patrón de  $\beta$ -Caroteno en 50 mg de KBr. 500 Adquisiciones de 10 segundos cada una a 60 mW de potencia. .... 83

**Figura 3.4:** Espectro Raman Resonante de un extracto de licopeno obtenido con excitación a 514.5 nm. Se han promediado 10 espectros de 15 segundos cada uno. Potencia de láser  $\leq 1\text{mW}$ . .... 85

**Figura 3.5:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión con sonda de tomate Rambo a t = 48 h..... 87

**Figura 3.6:** Tomates cherry objeto de estudio. **A:** Amarillo ovalado. **B:** Rojo ovalado. **C:** Verde ovalado. **D:** Naranja ovalado..... 88

**Figura 3.7:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión de un tomate amarillo ovalado a t = 48 h..... 89

**Figura 3.8:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión de un tomate rojo ovalado a t = 48 h..... 91

**Figura 3.9:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión de tomate verde ovalado a  $t = 48$  h. .... 92

**Figura 3.10:** Espectro Raman Resonante en retrodispersión para un tomate naranja ovalado a  $t = 0$  h. .... 93

**Figura 3.11:** Espectros adquiridos para una rodaja de zanahoria a radio (distancia al centro) **a)** 0mm (negro) **b)** 4 mm (azul) y **c)** 4.65 mm (rojo). .... 96

**Figura 3.12:** Mapa de contorno obtenido por Espectroscopia de Transmisión Raman Resonante. La acumulación de  $\beta$ -caroteno se da predominantemente en el floema secundario y en los tejidos vasculares de las rodajas de zanahoria. **SX:** xilema secundario; **VC:** Cambium Vascular; **SP:** Floema secundario; **PP:** Peridermis con periciclo. .... 97

**Figura 3.13:** Logaritmo de la Intensidad de la banda  $\nu_1$  frente al radio. Para una mayor ilustración, en el interior de la gráfica se muestra una fotografía. **SX:** xilema secundario; **VC:** Cambium Vascular; **SP:** Floema secundario; **PP:** Peridermis con periciclo. .... 98

**Figura 3.14:** Cociente de  $100 \cdot \nu_4/\nu_1$  en función de la distancia al centro de las rodajas de zanahoria, las medidas son en régimen quasi-contínuo, cada  $300\mu\text{m}$  como en el caso anterior. **SX:** xilema secundario; **VC:** Cambium Vascular; **SP:** Floema secundario; **PP:** Peridermis con periciclo. .... 99

**Figura 3.15:** Espectro de transmisión Raman Resonante de una rodaja de zanahoria de 0.4 mm de espesor. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ . Rojo: Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$ , donde  $\epsilon i$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.63. .... 100

**Figura 3.16:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de zanahoria de 0.5 mm de espesor. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ . Rojo: Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$ , donde  $\epsilon i$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.64. .... 101

**Figura 3.17:** Espectro de transmisión Raman resonante de una rodaja de zanahoria de 0.9 mm de espesor. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ . Rojo: Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$ , donde  $\epsilon$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.82. .... 102

**Figura 3.18:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una muestra patrón de  $\beta$ -caroteno en KBr de concentración  $8,12 \cdot 10^{-4} \text{ mg/mm}^3$ . **Negro:** Configuración paralela, es decir, configuración  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ . **Rojo:** Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$ , donde  $\epsilon$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.59. .... 104

- Figura 3.19:** Espectro de Transmisión Raman Resonante de una rodaja de mango de 0.7mm de espesor. **Negro:** Configuración paralela, es decir, configuración  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ . **Rojo:** Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$ , donde  $\epsilon$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.63. .... 106
- Figura 3.20:** Intensidades de la banda  $\nu_1$  en distintos tipos de tomates. **Granate:** Rojo ovalado, **Amarillo:** Amarillo ovalado, **Negro:** Verde Ovalado, **Azul:** Naranja ovalado. 109
- Figura 3.21:** Evolución temporal de la intensidad de la banda  $\nu_1$  para dos tomates Rambo en distinto periodo inicial de maduración. **(a)** Tomate en la denominada fase “green”. **(b)** Tomate en la fase llamada “breaker”. .... 110
- Figura 3. 22:** Espectro Raman resonante medido a  $90^\circ$  de un tomate Rambo a tiempo cero. Negro: Configuración paralela, es decir, configuración  $\epsilon f \parallel \epsilon i$ ; Rojo: Configuración perpendicular  $\epsilon f \perp \epsilon i$ ; donde  $\epsilon$  es el vector unitario de campo eléctrico. El cociente de despolarización para la banda  $\nu_1$  es 0.87. .... 111
- Figura 3.23:** Resultados experimentales obtenidos para la evolución del cociente de despolarización de la banda  $\nu_1$  con el paso del tiempo en tomate cherry rojo ovalado obtenidos de espectros adquiridos en configuración de  $90^\circ$ . La línea roja es una guía para ver la evolución. .... 113
- Figura 4.1:** Aproximación de la curva de energía potencial del movimiento nuclear de una molécula diatómica. **Negro:** Oscilador armónico. **Rojo:** Oscilador anarmónico. .... 128
- Figura 4.2:** Comparación entre los espectros Raman Resonantes adquiridos en configuración de transmisión de 10  $\mu\text{g}$  de un estándar de  $\beta$ -caroteno diluidos en KBr hasta alcanzar los 50mg totales de muestra (**línea azul**) y una rodaja de zanahoria de 0,5 mm de espesor (**línea roja**). En ambos espectros la banda  $\nu_1$  ha sido normalizada a 1. La diferencia queda mejor reflejada en el recuadro de la figura. .... 130
- Figura 4.3:** **a)** Cociente de despolarización de la banda  $\nu_1$  del  $\beta$ -caroteno presente en muestras de zanahoria en función del espesor de la muestra. Puntos: Valores experimentales. Línea sólida: mejor ajuste empleando [4.8]. **b)** Misma representación para la banda  $\nu_2$ . .... 138
- Figura 4.4:** Cociente de despolarización de una pastilla de  $\beta$ -caroteno (KBr) de 0.2 mm de espesor en función de la concentración expresada en  $\text{mg}/\text{mm}^3$ . La masa total de la pastilla fue de 50 mg. **Puntos:** Resultados experimentales. **Línea sólida:** Mejor ajuste empleando ..... 139

**Figura 4.5:** a) Cociente de despolarización de una muestra de mango de 0.7 mm de espesor en función del tiempo b) Evolución temporal de la masa de la misma rodaja de mango **Rojo:** ajuste a la función exponencial decadente [4.12]..... 140

**Figura 4.6:** Cálculos para el modelo presentado en función del tiempo. Se ha empleado [4.26] del texto: (a) Intensidad Raman, empleando diversos valores de  $\beta$ . Como se ha indicado el resto de valores de siembra han sido:  $A=20\ 000$ ,  $\tau_{1/2}=25\text{h}$  y  $t_{\min}=50\text{h}$ . (b) Intensidad Raman descrita por el modelo empleando diferentes valores de  $\tau_{1/2}$  siendo los valores de siembra:  $A=20\ 000$ ,  $\beta=0.5$ , y  $t_{\min} 50\text{h}$ . ..... 151

**Figura 4.7:** Intensidades de la banda  $\nu_1$ . El número de cuentas está referido al total de cuentas con respecto a  $t = t_{\text{th}}$  siendo  $t_{\text{th}}$  el tiempo en el que la señal Raman comienza a crecer. **Granate:** Rojo ovalado, **Amarillo:** Amarillo ovalado, **Negro:** Verde Ovalado, **Azul:** Naranja ovalado. **Puntos sólidos:** datos experimentales. **Líneas continuas:** ajuste realizado mediante [4.26]. ..... 153

**Figura 4.8:** Intensidades de la banda  $\nu_1$  para dos tomates Rambo en distinto periodo inicial de maduración. (a) Tomate Rambo en la denominada fase *green*. (b) Tomate Rambo en la fase llamada *breaker*. El número de cuentas está referido al total de cuentas con respecto a  $t = t_{\text{th}}$ . **Puntos sólidos:** datos experimentales. **Línea roja:** ajuste realizado mediante [4.26]. ..... 154

**Figura 4.9:** Evolución temporal de  $\Gamma$  para un tomate Cherry. **Puntos sólidos:** valores experimentales. **Línea roja:** ajuste lineal..... 160

**Figura 4.10:** Evolución temporal de  $\Gamma$  para un tomate Rambo. **Puntos sólidos:** valores experimentales. **Línea roja:** ajuste lineal..... 161

**Figura 4.11:** Evolución del cociente  $100 \cdot \nu_4 / \nu_1$  en función del tiempo en una muestra de tomate Rambo. **Puntos sólidos:** Puntos experimentales. **Línea roja:** Ajuste lineal. .... 162

**Figura 5.1:** (a) Espectro Raman Resonante a 514.5 nm de longitud de onda de  $\beta$ -caroteno obtenido tras 8 horas de calentamiento (b) Espectros Raman resonantes de la zona de interés punteada en (a) tras la corrección de la línea base. Los espectros han sido desplazados unos respecto de otros por claridad. A temperatura ambiente: **Negro:**  $t = 0$  h. y tras varios tiempos de calentamiento a  $115^\circ\text{C}$ : **Rojo:**  $t = 4$  h, **Azul:**  $t = 6$  h y **Verde:**  $t = 8$  h. .... 172

**Figura 5.2:** Espectro IR de patrón de  $\beta$ -caroteno con sus asignaciones correspondientes a  $t = 0$  h. .... 174

- Figura 5.3:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente **rojo:** t = 0 h y tratada térmicamente a 90°C a distintos tiempos. **Gris:** t = 2 h; **morado:** t = 3 h; **azul:** t = 4 h; **verde:** t = 6 h y **negro:** t = 8 h. Por claridad, los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0.04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base. .... 178
- Figura 5.4:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente **rojo:** t = 0 h y tratada térmicamente a 100°C a distintos tiempos. **Azul:** t = 4 h; **verde:** t = 6 h y **negro:** t = 8 h. Por claridad los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0.04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base. .... 180
- Figura 5.5:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente **rojo:** t=0 y varios tiempos tratada térmicamente a 115°C a distintos tiempos. **Rosa:** t = 1 h; **gris:** t = 2 h; **azul:** t = 4 h y **verde:** t = 6 h. Por claridad, los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0.04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base. .... 182
- Figura 5.6:** Espectros de infrarrojo de una muestra de  $\beta$ -caroteno a temperatura ambiente **rojo:** t = 0 h y tratada térmicamente a 130°C a distintos tiempos. **Rosa:** t = 1 h; **gris:** t = 2 h y **morado:** t = 3 h. Por claridad, los espectros se encuentran desplazados unos con respecto de otros 0.04 unidades en la parte superior, en la inferior forman parte de la misma línea base..... 184
- Figura 5.7:** Disminución de poder antioxidante con el tiempo. **Negro:** t = 0 h; **Azul:** t = 4 h; **Rojo:** t = 8 h..... 186
- Figura 5.8:** (a) Espectro Raman Resonante a 514.5 nm de longitud de onda de excitación de un extracto de licopeno obtenido tras 8 horas de calentamiento a 115°C. (b) Espectros Raman resonantes de la zona de interés marcada en la zona punteada de (a) tras la corrección de la línea base. Se han desplazado unos respecto de otros por claridad. A temperatura ambiente: **Negro:** t = 0 h. y tras varios tiempos de calentamiento: **Morado:** t = 2 h. **Rojo:** t = 4 h, **Azul:** t = 6 h y **Verde:** t = 8 h. Cada espectro es el promedio de 10 adquisiciones de 15 segundos cada una. .... 188
- Figura 5.9:** Zona espectral ampliada en espectros de **Rojo:**  $\beta$ -caroteno. **Negro:** extracto de licopeno donde se observa una inversión del cociente entre los dos picos. .... 190
- Figura 5.10:** Zona espectral ampliada en espectros de **Rojo:**  $\beta$ -caroteno. **Negro:** Extracto de licopeno donde se observa desplazamiento de uno de los picos de 7cm<sup>-1</sup>. .... 191
- Figura 5.11:** Espectro Infrarrojo (ATR) de un extracto de licopeno obtenido a t = 0 h. . 192

<b>Figura 5.12:</b> Estructura molecular más estable del $\beta$ -caroteno calculada con el método antes citado. ....	196
<b>Figura 5. 13:</b> Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de $\beta$ -caroteno. ....	197
<b>Figura 5.14:</b> Distribución de los orbital LUMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de $\beta$ -caroteno. ....	198
<b>Figura 5.15:</b> Espectro IR obtenido mediante cálculos computacionales del $\beta$ -caroteno..	200
<b>Figura 5.16:</b> Espectro Raman obtenido mediante cálculos computacionales del $\beta$ -caroteno.	
<b>Zona punteada:</b> modos vibracionales diferenciadores descritos en la Sección 5.2.1.....	201
<b>Figura 5.17:</b> Estructura molecular más estable del licopeno calculada con el método antes citado. ....	202
<b>Figura 5.18:</b> Distribución del orbital HOMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de licopeno. ....	203
<b>Figura 5.19:</b> Distribución del orbital LUMO a lo largo de la molécula con la geometría optimizada de licopeno. ....	204
<b>Figura 5.20:</b> Espectro IR obtenido mediante cálculos computacionales del licopeno. ....	206
<b>Figura 5.21:</b> Espectro Raman obtenido mediante cálculos computacionales del licopeno.	
<b>Zona punteada:</b> modos vibracionales diferenciadores descritos en la Sección 5.2.1.....	207
<b>Figura 6.1:</b> Representación semi-logarítmica de las áreas del pico de IR obtenido a $966\text{ cm}^{-1}$ frente al tiempo de permanencia en el horno a cada temperatura. Errores experimentales: $< 10\%$ . Representados en el último punto de cada temperatura. Para una mayor claridad: Los puntos experimentales de $90^{\circ}\text{C}$ y $100^{\circ}\text{C}$ han sido desplazados 0.3 y 0.2 unidades respectivamente en el eje de ordenadas con respecto a $115^{\circ}\text{C}$ y $130^{\circ}\text{C}$ . ....	215
<b>Figura 6.2:</b> Representación semi-logarítmica de $k$ frente a $1000/T$ . Las barras de error de los puntos a mayores valores en abscisas están tapadas por el propio punto. ....	218
<b>Figura 6.3:</b> Representación semi-logarítmica de las áreas del pico de IR obtenido a $958\text{ cm}^{-1}$ frente al tiempo de permanencia en el horno a $115^{\circ}\text{C}$ . Errores experimentales $<10\%$ . ....	221
<b>Figura 6.4:</b> Moléculas estudiadas por modelización molecular. <b>a:</b> Retinal, <b>b:</b> $\beta$ -apo-13-carotenona, <b>c:</b> $\beta$ -apo-14'-carotenal, <b>d:</b> $\beta$ -apo-14'-carotenol, <b>e:</b> $\beta$ -apo-10'-carotenal. ....	223
<b>Figura 6.5:</b> Estructura molecular más estable del retinal. ....	224
<b>Figura 6.6:</b> Orbital HOMO del retinal.....	225

<b>Figura 6.7:</b> Orbital LUMO del retinal.....	226
<b>Figura 6.8:</b> Espectros IR <b>Negro:</b> calculado para el retinal. <b>Rojo:</b> Experimental. ....	227
<b>Figura 6.9:</b> Estructura molecular más estable de la $\beta$ -apo-13-carotenona.....	228
<b>Figura 6.10:</b> Orbital HOMO de la $\beta$ -apo-13-carotenona. ....	229
<b>Figura 6.11:</b> Orbital LUMO de la $\beta$ -apo-13-carotenona.....	229
<b>Figura 6.12:</b> Espectros IR <b>Negro:</b> calculado para la $\beta$ -apo-13-carotenona. <b>Rojo:</b> Experimental. ....	230
<b>Figura 6.13:</b> Estructura molecular más estable del $\beta$ -apo-14'-carotenal. ....	231
<b>Figura 6.14:</b> Orbital HOMO del $\beta$ -apo-14'-carotenal.....	232
<b>Figura 6.15:</b> Orbital LUMO del $\beta$ -apo-14'-carotenal. ....	232
<b>Figura 6.16:</b> Espectros IR. <b>Negro:</b> Calculado para el $\beta$ -apo-14'-carotenal. <b>Rojo:</b> Experimental. ....	233
<b>Figura 6.17:</b> Estructura más estable para el $\beta$ -apo-14'-carotenol. ....	234
<b>Figura 6.18:</b> Orbital HOMO del $\beta$ -apo-14'-carotenol.....	234
<b>Figura 6.19:</b> Orbital LUMO del $\beta$ -apo-14'-carotenol.....	235
<b>Figura 6.20:</b> Espectros IR. <b>Negro:</b> Calculado para el $\beta$ -apo-14'-carotenol. <b>Rojo:</b> Experimental. ....	235
<b>Figura 6.21:</b> Estructura más estable para el $\beta$ -apo-10'-carotenal. ....	236
<b>Figura 6.22:</b> Orbital HOMO del $\beta$ -apo-10'-carotenal.....	237
<b>Figura 6.23:</b> Orbital LUMO del $\beta$ -apo-10'-carotenal.....	237
<b>Figura 6.24:</b> Espectros IR <b>Negro:</b> Calculado para el $\beta$ -apo-10'-carotenal. <b>Rojo:</b> Experimental. ....	238
<b>Figura 6.25:</b> Estructura del todo-trans-15,15'-epoxi- $\beta$ -caroteno.....	241
<b>Figura 6.26:</b> Mecanismo sugerido por otros investigadores <sup>36</sup> . ....	242

## Lista de Tablas

<b>Tabla 2.1:</b> Espesores de las muestras empleadas.....	52
<b>Tabla 3.1:</b> Asignaciones para el espectro Raman Resonante de Rodaja de Zanahoria de 5 mm de espesor.....	80
<b>Tabla 3.2:</b> Asignaciones del espectro Raman Resonante de Rodaja de mango de 0.7 mm de espesor a t= 0 horas.....	82
<b>Tabla 3.3:</b> Asignaciones del espectro Raman Resonante de una pastilla con 0.1 mg de $\beta$ -caroteno patrón en 50 mg de KBr.....	83
<b>Tabla 3.4:</b> Asignaciones para el espectro Raman Resonante de un extracto de licopeno..	85
<b>Tabla 3.5:</b> Asignaciones del espectro Raman Resonante de un tomate Rambo a t = 48 h.	88
<b>Tabla 3.6:</b> Asignaciones del espectro Raman Resonante de un tomate cherry amarillo ovalado a t = 48 h. ....	90
<b>Tabla 3.7:</b> Asignaciones del espectro Raman Resonante de tomate cherry rojo ovalado a t = 48 h.....	91
<b>Tabla 3.8:</b> Asignaciones para el espectro Raman Resonante de tomate cherry verde ovalado a t = 48 h .....	92
<b>Tabla 3.9:</b> Asignaciones del espectro Raman Resonante de tomate cherry naranja ovalado a t = 0 h.....	94
<b>Tabla 3.10:</b> Valores obtenidos para el cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) a distintos espesores para los modos vibracionales $\nu_1$ y $\nu_2$ . ....	103
<b>Tabla 3.11:</b> Variación del cociente de despolarización $\Gamma$ con la concentración de $\beta$ -caroteno. ....	105
<b>Tabla 3.12:</b> Variación del cociente de despolarización ( $\Gamma$ ) con el tiempo de exposición al aire de una rodaja de mango. ....	107
<b>Tabla 3.13:</b> Resultados experimentales obtenidos para la evolución del cociente de despolarización con el paso del tiempo en tomate Rambo.....	112
<b>Tabla 3.14:</b> Evolución temporal del cociente de intensidades de las bandas $\nu_4/\nu_1$ en tomates Rambo .....	114
<b>Tabla 4.1:</b> Desplazamientos del modo vibracional $\nu_1$ y $\nu_2$ en distintos tipos de muestras. ....	125

<b>Tabla 4. 2:</b> Valores obtenidos para bandas de combinación y sobretonos comparados con los estudios de la referencia 18. ....	127
<b>Tabla 4.3:</b> Valores óptimos tras el ajuste del coeficiente de absorción y del coeficiente de dispersión empleando [4.8]. ....	139
<b>Tabla 4.4:</b> Valores óptimos de los cocientes de despolarización obtenidos empleando [4.8] para el ajuste en distintas muestras y su comparación con los resultados observados en la bibliografía. ....	141
<b>Tabla 4.5:</b> Valores experimentales de CEF, $t_{th}$ y PTMP en distintos tipos de tomates....	155
<b>Tabla 4.6:</b> Valores óptimos para los parámetros de ajuste empleando [4.26].....	157
<b>Tabla 5.1:</b> Asignación de modos vibracionales en espectroscopia Raman con excitación de 514.5nm en una muestra patrón de $\beta$ -caroteno. ....	173
<b>Tabla 5.2:</b> Identificación de los modos vibracionales más significativos en espectroscopia infrarroja de una muestra patrón de $\beta$ -caroteno a $t = 0$ . ....	175
<b>Tabla 5.3:</b> Área del pico asignado como $\omega_{op}$ (C=C-H) a temperatura ambiente $t = 0$ h y tratado térmicamente a $90^{\circ}\text{C}$ a diferentes tiempos para una muestra patrón de $\beta$ -caroteno. ....	179
<b>Tabla 5.4:</b> Área del pico que ha sido asignado como $\omega_{op}$ (C=C-H) a temperatura ambiente tratado térmicamente a $100^{\circ}\text{C}$ a diferentes tiempos para una muestra patrón de $\beta$ -caroteno. ....	181
<b>Tabla 5.5:</b> Área del pico que ha sido asignado como $\omega_{op}$ (C=C-H) a temperatura ambiente $t = 0$ h y tratado térmicamente a $115^{\circ}\text{C}$ a diferentes tiempos para una muestra patrón de $\beta$ -caroteno. ....	183
<b>Tabla 5. 6:</b> Área del pico que ha sido asignado como $\omega_{op}$ (C=C-H) a temperatura ambiente $t = 0$ y tratado térmicamente a $130^{\circ}\text{C}$ a diferentes tiempos para una muestra patrón de $\beta$ -caroteno.....	185
<b>Tabla 5.7:</b> Asignaciones más significativas del extracto de licopeno en espectroscopia Raman con una excitación de 514.5 nm.....	189
<b>Tabla 5.8:</b> Asignación de modos vibracionales más importantes en espectroscopia infrarroja encontrados en un extracto de licopeno a $t = 0$ h. ....	193
<b>Tabla 5.9:</b> Área del pico que ha sido asignado como $\omega_{op}$ (C=C-H) a temperatura ambiente $t = 0$ y tratado térmicamente a $115^{\circ}\text{C}$ a diferentes tiempos para una muestra de extracto de licopeno. ....	194

---

<b>Tabla 5.10:</b> Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la configuración más estable del $\beta$ -caroteno. Siendo $\Delta E$ (diferencia de energías HOMO LUMO), $\eta$ (dureza), $\sigma$ (fragilidad), $\mu$ (potencial), $\omega^\circ$ (electrofilia global).....	199
<b>Tabla 5.11:</b> Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la configuración más estable del licopeno. Siendo $\Delta E$ (diferencia de energías HOMO LUMO), $\eta$ (dureza), $\sigma$ fragilidad, $\mu$ (potencial), $\omega^\circ$ (electrofilia global). ....	204
<b>Tabla 6.1:</b> Valores obtenidos de $k$ y $\tau_{1/2}$ a cada temperatura.....	216
<b>Tabla 6.2:</b> Parámetros obtenidos con las energías de los orbitales HOMO y LUMO para la conformación más estable del licopeno. Siendo $\Delta E$ (diferencia de energías HOMO LUMO), $\eta$ (dureza), $\sigma$ (fragilidad), $\mu$ (potencial), $\omega^\circ$ (electrofilia global).....	239



