



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 925**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08805855 .7**

96 Fecha de presentación : **27.05.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2179270**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **Procedimiento y sistema para caracterizar un tejido biológico pigmentado.**

30 Prioridad: **01.06.2007 FR 07 03924**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.08.2011

73 Titular/es: **FORCE-A**
Centre Universitaire Paris-sud Bâtiment 503
91400 Orsay, FR
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS) y
Université Paris-sud

72 Inventor/es: **Cerovic, Zoran;**
Moise, Nicolae;
Latouche, Gwendal y
Goulas, Yves

74 Agente: **Díaz Núñez, Joaquín**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y sistema para caracterizar un tejido biológico pigmentado

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para caracterizar un tejido biológico pigmentado. También se refiere a un sistema que aplica este procedimiento.

10 Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento y un sistema para caracterizar un tejido de una entidad biológica, tal como una baya, que comprende un primer compuesto cromóforo poco o no fluorescente, tal como una antocianina o un flavonol, y un segundo compuesto cromóforo fluorescente, tal como la clorofila. La caracterización pretende determinar el contenido del primer compuesto en el tejido biológico. Una caracterización de este tipo de un tejido biológico presenta un gran interés. Por ejemplo, en el campo vinícola, el contenido en antocianinas de los granos de uva representa información con respecto a su madurez y la calidad del vino obtenido a partir de estos granos de uva. En el campo nutricional, el contenido en flavonol de la piel de los frutos y las verduras es un indicador de su valor nutricional.

20 El documento FR 2 830 325 desvela un instrumento óptico que permite medir, por efecto pantalla, características de absorción luminosa de una muestra de tejido biológico que comprende un primer compuesto cromóforo no fluorescente y un segundo compuesto cromóforo y fluorescente. El procedimiento desvelado en este documento consiste en medir la fluorescencia inducida por excitación del segundo compuesto por una primera y una segunda radiación, de longitudes de onda diferentes y que aclaran la muestra de tejido biológico. Una de estas radiaciones, llamada de referencia, es ligeramente o nada absorbida por el primer compuesto mientras que la otra, llamada de medida, es relativamente bien absorbida. Midiendo la fluorescencia inducida por ambas radiaciones y hallando la relación de las fluorescencias medidas, el procedimiento permite medir las características de absorción luminosa de la muestra y como resultado el contenido del primer compuesto en el tejido biológico.

25 El procedimiento desvelado en el documento de Hagen, "Chlorophyll fluorescent as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples", POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY, vol. 41, Nº. 2, agosto de 2006, páginas 156-163, para determinar el contenido en un compuesto cromóforo y no fluorescente es comparable al desvelado en el documento FR2830325, y comprende las características del preámbulo de la reivindicación independiente 1.

35 Sin embargo, la evolución del contenido del primer compuesto, cromóforo, no fluorescente, provoca una saturación de la medida de la radiación de fluorescencia inducidas por la primera radiación. Cuando la concentración del primer compuesto en el tejido aumenta, la absorción de la radiación de medida por el primer compuesto también aumenta. La radiación de fluorescencia inducida por la radiación de medida se vuelve cada vez más débil y ya no puede distinguirse del ruido de medida. Ocurre también que, cuando la concentración del primer compuesto en el tejido aumenta, la radiación de referencia comienza a verse afectada. En la presente descripción, estos fenómenos se denominarán "saturación".

40 La inmensa mayoría de los procedimientos y sistemas actualmente conocidos se limitan a caracterizar un tejido biológico hasta alcanzar la saturación. Entre estos sistemas podemos citar a los basados en la calorimetría, que además de la saturación, encuentran problemas vinculados a los depósitos que pueden estar presentes sobre el tejido biológico y pueden afectar a las medidas. También se pueden mencionar los sistemas basados en espectroscopia infrarroja que encuentra problemas vinculados a la presencia de agua en el tejido biológico y que realizan una determinación del contenido del primer compuesto en base a una deducción empírica quimiométrica.

45 Otros procedimientos y sistemas para caracterizar un tejido biológico permiten evitar la saturación mediante operaciones de diluciones en laboratorio. Un inconveniente de dichos procedimientos y sistemas es que son destructivos.

50 Un objetivo de la invención es proponer un nuevo procedimiento y un sistema que permita caracterizar un tejido biológico más allá de la saturación de manera no destructiva y no invasiva.

55 Otro objetivo de la invención es proponer un nuevo procedimiento y un sistema que permita caracterizar un tejido biológico más allá de la saturación y que pueda utilizarse *in situ*.

60 Por lo tanto, la invención propone un procedimiento para determinar, el contenido de un compuesto cromóforo no fluorescente, llamado primer compuesto, de un tejido biológico de una entidad biológica, comprendiendo además el tejido biológico un compuesto cromóforo y fluorescente, llamado segundo compuesto, comprendiendo este procedimiento al menos una iteración de las operaciones siguientes:

- Emisión por medios de emisión, en la dirección del tejido, de una primera radiación óptica, llamada de medida, y de una segunda radiación óptica, llamada de referencia, cada una escogida para inducir una radiación de fluorescencia del segundo compuesto, estando cada una de la primera y segunda radiaciones parcialmente absorbida por el primer compuesto,
- 65 - Medida, por medios de medida,
- Radiaciones de fluorescencia inducidas por la primera y segunda radiación, y

- Determinación, a partir de la medida, del contenido del primer compuesto en el tejido;

El procedimiento según la invención se caracteriza por que comprende además al menos una compensación de una saturación de medida debida a una absorción demasiado grande de la radiación de medida por el primer compuesto, debida a un contenido demasiado grande del primer compuesto, comprendiendo la compensación una elección, para la radiación de medida, de una longitud de onda correspondiente a una absorción inferior en el espectro de absorción del primer compuesto.

Por lo tanto, el procedimiento según la invención permite realizar la caracterización de un tejido biológico de una entidad biológica, más allá de una saturación debida a un contenido demasiado grande del primer compuesto, es decir, a una absorción demasiado grande de la radiación de medida por el primer compuesto, por el desplazamiento de la longitud de onda de la radiación de medida hacia una longitud de onda de absorción inferior en el espectro de absorción del primer compuesto. Además, ya no requiere operaciones en laboratorio, el procedimiento según la invención no es destructivo ni invasivo y puede ser aplicado *in situ*.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención puede además comprender una emisión, por los medios de emisión, con la dirección del tejido, de una tercera radiación óptica, llamada suplementaria, escogida para inducir una radiación de fluorescencia del segundo compuesto. En este caso, el procedimiento según la invención comprende medir la radiación de fluorescencia inducida por la radiación suplementaria. Después, esta medida se utiliza para determinar si la radiación de referencia se ve afectada o no por el primer compuesto. En efecto, en función de la relación de la radiación de fluorescencia inducida por ambas radiaciones, de referencia y suplementaria, y de la variación de esta relación, podemos determinar si la radiación de referencia se ve afectada o no por el primer compuesto. Cuando se detecta que la radiación de referencia se ve afectada por el primer compuesto, hay que realizar una compensación de saturación, por ejemplo invirtiendo la relación medida.

Según, un primer aspecto de la invención, cuando el contenido del tejido en el primer compuesto aumenta de modo que el primer compuesto afecta a la radiación de referencia, la longitud de onda escogida por la radiación de medida después de la saturación corresponde a una longitud de onda situada alrededor de la longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación. Según este primer aspecto de la invención, cuando se produce la saturación, se elige una nueva longitud de onda para la radiación de medida. La nueva longitud de onda elegida como la radiación de medida puede ser la longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación. Cuando la distancia entre el tejido biológico y los medios de emisión y los medios de medida es fija, no es necesario utilizar una radiación de referencia. Sin embargo la primera radiación de medida, incluso saturada, puede utilizarse en la relación medida.

Cuando la distancia entre el tejido biológico y los medios de emisión y los medios de medida no es fija, la longitud de onda escogida para la radiación de referencia después de la saturación puede corresponder a una longitud de onda que está poco o nada afectada por el contenido del primer compuesto. Más particularmente, la longitud de onda de la radiación de referencia después de la saturación puede corresponder a la longitud de onda de la radiación suplementaria.

Según un segundo aspecto de la invención, cuando la longitud de onda de referencia no se ve afectada por el contenido del primer compuesto en el tejido, la longitud de onda escogida para la radiación de medida corresponde a una absorción inferior por el primer compuesto que una longitud de onda, llamada límite, para la cual se produciría una saturación potencial para un contenido máximo previsto para el primer compuesto en el tejido biológico. Durante una serie de medida, puede determinarse el contenido máximo potencial en el primer compuesto. En función del valor máximo potencial y el espectro de absorción del primer compuesto, se puede calcular una absorción máxima que puede obtenerse potencialmente. Una longitud de onda, llamada límite, correspondiente a una saturación para la absorción máxima, puede determinarse para la radiación de medida. Así, si una longitud de onda que corresponde a una absorción inferior que la longitud de onda límite, se elige como la radiación de medida, no se producirá saturación en relación a la radiación de medida durante la serie de medida. La longitud de onda límite puede determinarse en función de un pico de absorción. En este caso, la longitud de onda de medida se escoge con relación al pico de absorción. El procedimiento según la invención puede entonces comprender una determinación del desplazamiento con relación al pico de absorción para evitar una saturación u obtener valores para el contenido del primer compuesto que evoluciona de una manera más lineal.

Según un tercer aspecto de la invención, cuando la longitud de onda de referencia no se ve afectada por el contenido del primer compuesto en el tejido, la compensación de la saturación puede realizarse cuando el contenido del primer compuesto en el tejido provoca una saturación de medida, reiterándose dicha compensación en cada saturación. Cuando, después de una serie de medida realizada con una radiación de medida que tiene una primera longitud de onda que corresponde por ejemplo a un pico de absorción, se consigue una primera saturación, la longitud de onda de la radiación de medida puede desplazarse hacia una segunda longitud de onda correspondiente a una absorción inferior que la primera longitud de onda de modo que esta segunda longitud de onda no provoque saturación de medida. Después, puede realizarse una segunda serie de medida hasta alcanzar una nueva saturación. Después, la longitud de onda de la radiación de medida puede desplazarse hacia una tercera longitud de onda correspondiente a una absorción inferior que la segunda longitud de onda, etcétera. En el momento de la elección de una nueva longitud de onda podemos tener en cuenta la diferencia de absorción en el cálculo del contenido del primer compuesto en el tejido. Esta

diferencia de absorción puede obtenerse estudiando el espectro de absorción del primer compuesto que proporciona valores de calibrado para las diferentes longitudes de onda escogidas.

Los tres aspectos de la invención que se han descrito anteriormente pueden combinarse ventajosamente.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención, puede comprender una modificación de la longitud de onda de la radiación de medida y/o de la radiación de referencia en función a una característica fisicoquímica que tiene una influencia sobre el espectro de absorción del primer compuesto y/o sobre el espectro de fluorescencia del segundo compuesto.

La característica fisicoquímica puede ser una característica escogida de la lista siguiente:

- El pH del tejido biológico
- Los efectos de copigmentación que afectan al primer compuesto, y
- Los efectos de los cambios en las estructuras de soporte del segundo compuesto.

La longitud de onda de la radiación de medida y/o de la radiación de referencia puede también modificarse en función de una aparición en el tejido biológico, de un nuevo compuesto, por ejemplo por cambio covalente, modificando el espectro de absorción del primer compuesto o el espectro de fluorescencia del segundo compuesto.

Ventajosamente, la radiación de medida (o la radiación de referencia) puede emitirse a una intensidad predeterminada y la radiación de referencia (o la radiación de medida) a una intensidad variable de forma que la radiación de fluorescencia inducida por cada una de las dichas radiaciones de referencia y de medida sean equivalentes en intensidad.

La intensidad de la primera radiación puede ser ajustada en función de una señal, llamada de dirección, relativa a las radiaciones de fluorescencia inducidas, por una parte por la radiación de medida, y por otra parte por la radiación de referencia.

Por otro lado, las intensidades de las radiaciones de medida y de referencia pueden variar de manera alternada, en desplazamiento de fase, a una frecuencia predeterminada que puede ser, por ejemplo, de 1 kHz.

El procedimiento según la invención puede comprender ventajosamente una sincronización por modulación de fase de las radiaciones emitidas por los medios de emisión.

Cada una de las radiaciones de medida y de referencia puede emitirse en forma de impulsos.

La determinación del contenido del primer compuesto puede comprender un cálculo de la relación (fluorescencia inducida por la radiación de referencia) dividida por (fluorescencia inducida por la radiación de medida).

Según una particularidad ventajosa del procedimiento según la invención, la medida de las radiaciones de fluorescencia puede realizarse:

- Sobre una muestra de tejido tomada de la entidad biológica;
- O directamente en la entidad biológica que lleva el tejido, de manera no destructiva y no invasiva, es decir sin haber tomado una muestra.

El procedimiento según la invención puede comprender ventajosamente una determinación de la evolución, en el tiempo, del contenido del primer compuesto en el tejido biológico. Esta evolución puede determinarse según una unidad de tiempo que puede ser el día. Puede, por ejemplo, expresarse como un gráfico, mostrando la evolución del contenido del compuesto en función de la unidad de tiempo escogida.

En una realización no limitativa del primer aspecto del procedimiento según la invención, el tejido biológico es la piel de un grano de uva, el primer compuesto es una antocianina y el segundo compuesto es clorofila. Cuando la distancia entre el tejido y los medios de emisión y los medios de medida es fija:

- La longitud de onda de la radiación de medida antes de la saturación es de 530 nm;
- La longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación es de 650 nm;
- La longitud de onda de la radiación suplementaria es de 450 nm;
- La longitud de onda de la radiación de medida después de la saturación es de 650 nm;
- Y no hay necesidad de una radiación de referencia después de la saturación. Aún en el caso de este ejemplo, cuando la distancia entre el tejido y los medios de emisión y los medios de medida no es fijo:
- La longitud de onda de la radiación de medida antes de la saturación es de 530 nm;
- La longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación es de 650 nm;
- La longitud de onda de la radiación suplementaria es de 450 nm;
- La longitud de onda de la radiación de medida después de la saturación es de 650 nm;

- La longitud de onda de la radiación de referencia después de la saturación es de 450 nm;

En este caso, el contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva puede determinarse según las relaciones siguientes:

$$\begin{aligned} \text{ANTH}_{\text{Antes de la Saturación}} &= \log \text{FER_ANTH_GREEN} - \log \text{FER_CHLG} \\ \text{ANTH}_{\text{Después de la Saturación}} &= C + \log \text{FER_ANTH_RED} - \log \text{FER_CHLR} \end{aligned}$$

Con

1. $\log \text{FER_ANTH_GREEN} = \log (\text{FRFred}/\text{FRFgreen})$
2. $\log \text{FER_ANTH_RED} = \log (\text{FRFblue}/\text{FRFred})$ y
3. $\log \text{FER_CHLG} = \log (\text{FRFred}/\text{FRFgreen})$
4. $\log \text{FER_CHLR} = \log (\text{FRFblue}/\text{FRFred})$

En estas expresiones:

- FRFred corresponde a la radiación de fluorescencia de la clorofila inducida por una radiación emitida a 650 nm, es decir, la radiación de referencia antes de la saturación y la radiación de medida después de la saturación;
- FRFgreen corresponde a la radiación de fluorescencia de la clorofila inducida por una radiación emitida a 530 nm, es decir, la radiación de medida antes de la saturación;
- FRFblue corresponde a la radiación de fluorescencia de la clorofila inducida por una radiación emitida a 450 nm, es decir, la radiación suplementaria antes de la saturación y la radiación de referencia después de la saturación;
- Las expresiones 3 y 4 corresponden al menos a una medida realizada antes de la aparición de antocianinas en la piel de la uva. Sirve como referencia para las medidas realizadas después de la aparición de las antocianinas; y
- C es una constante de tal forma que $\text{ANTH}_{\text{después de la saturación}}$ sea igual a $\text{ANTH}_{\text{antes de la saturación}}$ en el momento de la saturación.

En otro ejemplo no limitativo y según el tercer aspecto de la invención, el tejido biológico es la piel de un grano de uva, el primer compuesto es un flavonol, el segundo compuesto es la clorofila:

- La longitud de onda de la radiación de medida antes de la saturación es alrededor de 375 nm;
- La longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación es alrededor de 650 nm;
- La longitud de onda de la radiación de medida después de la saturación es alrededor de 450 nm; y
- La longitud de onda de la radiación de referencia después de la saturación permanece alrededor de 650 nm;

Según otro aspecto más de la invención se propone un sistema aplicando el procedimiento según la invención.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes en el examen de la descripción detallada de una realización que no es de ninguna manera limitativa, y los dibujos adjuntos en los que:

- La figura 1 es una representación esquemática de una primera realización del sistema según la invención;
- La figura 2 es una representación esquemática de una segunda realización del sistema según la invención;
- La figura 3 es una representación esquemática del principio de medida, en la primera realización del sistema según la invención;
- La figura 4 es una representación esquemática del principio de medida, en la segunda realización del sistema según la invención;
- Las figuras 5, 6 y 7 son una representación esquemática de un sistema según la segunda realización.
- La figura 8 es una representación de los espectros de fluorescencia de la clorofila, de la absorción de una antocianina, de una absorción de un flavonol así como diferentes radiaciones y filtros usados según el primer aspecto del procedimiento según la invención;
- La figura 9 es una representación de los resultados obtenidos en el momento de la medida del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva según el primer aspecto del procedimiento según la invención;
- La figura 10 es una representación de los espectros de fluorescencia de la clorofila, de la absorción de una antocianina, así como de las diferentes radiaciones y filtros usados según el segundo aspecto del procedimiento según la invención;
- La figura 11 es una representación de los resultados obtenidos en el momento de la medida del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva según el segundo aspecto del procedimiento según la invención;
- La figura 12 es una representación de los resultados obtenidos en el momento de la medida del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva según una combinación del primer y del segundo aspectos del procedimiento según la invención;
- La figura 13 es una representación de un ejemplo de variación del espectro de absorción de las antocianinas en función del pH.

La realización no limitativa que se describirá a continuación se refiere a un sistema para la medida del contenido en un primer compuesto cromóforo no fluorescente, que pertenece a la familia de los polifenoles, en un tejido de una entidad biológica que comprende además un compuesto cromóforo y fluorescente que es la clorofila. La medida de los polifenoles se realiza por el procedimiento de la fluorescencia de la clorofila descrito en el documento FR 2 830 325.

Las figuras 1 y 2 son unas representaciones esquemáticas de dos realizaciones de un sistema según la invención. En estas dos realizaciones, el sistema se presenta en forma de dos partes: una parte emisora 10 y una parte receptora 20. En la primera realización representada en la figura 1, las partes emisora 10 y receptora 20 se disponen sobre cualquier lado de una muestra de un tejido vegetal 30, mientras que en la segunda realización representada en la figura 2, las partes emisora 10 y receptora 20 se disponen en el mismo lado de una muestra de tejido biológico 30.

Cualquiera que sea la realización, la parte emisora 10 comprende tres fuentes de radiación 11, 12 y 13 que iluminan la superficie anterior de una muestra de tejido biológico 30. Cada una de las fuentes 11 a 13 está asociada con una alimentación pulsada 14 a 16, como se muestra en las figuras 1 y 2, y controlada por una señal de sincronización Ss. Las fuentes 11 a 13 están previstas para inducir la fluorescencia de la clorofila. La parte emisora 10 puede comprender además un filtro óptico, no representado, situado entre las fuentes 11 a 13 y la muestra 30, para filtrar los componentes indeseables de las radiaciones 11 a 13 emitidas hacia la muestra 30.

La parte receptora 20 del sistema según la invención comprende un detector 21, fotodiodo de silicio que proporciona una señal eléctrica en función de las radiaciones de fluorescencia detectadas, asociado con un filtro óptico F2, dispuesto entre la muestra 30 y el detector 21. La función de este filtro F2 es:

- Bloquear el paso de las radiaciones de las fuentes de excitación 11 a 13 hacia el detector 21,
- Transmitir parcial o totalmente la emisión de la fluorescencia de la clorofila inducida por las radiaciones ópticas emitidas por las fuentes 11 a 13.

La parte receptora 20 del sistema comprende además un bloque 22 que comprende medios de control y de cálculos que permiten por una parte realizar la sincronización de las alimentaciones 14 a 16 mediante una señal de sincronización Ss y determinar el contenido del primer compuesto de la muestra de tejido 30 en función a la señal de medida Sm proporcionada por el detector 21.

Las figuras 3 y 4 son representaciones esquemáticas del principio de medida y de los trayectos ópticos de las diferentes radiaciones, respectivamente en la primera y segunda realizaciones. En referencia a las figuras 3 y 4, las fuentes 11 a 13, son preferentemente diodos electroluminiscentes (LED) e iluminan la misma superficie 31 de la muestra 30. Las fuentes 11 a 13 emiten tres radiaciones, respectivamente 111, 121 y 131, destinadas a inducir la fluorescencia de la clorofila 33 e inducir tres radiaciones fluorescentes, 112, 122 y 132 respectivamente. En la primera realización, la parte receptora 20 del sistema que se encuentra por el lado opuesto de la hoja o del grano con respecto a la parte emisora 10, son las radiaciones de fluorescencia emitidas, por la clorofila, hacia el lado opuesto a las fuentes 11 a 13 que serán detectadas por el detector 21. En efecto, en esta primera realización, el detector 21 está previsto para detectar la fluorescencia emitida hacia la superficie posterior 35 de la muestra para medir el contenido en polifenoles 34.

La figura 4 representa las radiaciones fluorescentes 112, 122 y 132 inducidas por las radiaciones 111, 121 y 131, y emitidas por la clorofila hacia las fuentes 11, 12 y 13. En esta segunda realización, la parte receptora 20 del sistema que se encuentra por el mismo lado de la hoja o del grano que la parte emisora 10, son las radiaciones emitidas, por la clorofila, hacia las fuentes 11 a 13 que serán detectadas por el detector 21. En efecto, en esta segunda realización, el detector 21 está previsto para detectar la fluorescencia emitida hacia la cara anterior 31 de la hoja para medir el contenido en polifenoles 34.

Cualquiera que sea la realización, las longitudes de onda de cada una de las fuentes 11 a 13 se escogen en función de las bandas de absorción de los compuestos que se van medir, de sus características técnicas, tales como la pureza espectral o su potencia, de su disponibilidad comercial y de su coste, y de la disponibilidad comercial y del coste de los filtros F2 asociados con el detector 21.

La primera y la segunda realización son sustancialmente equivalentes porque la fluorescencia es isotrópica. La segunda realización es la realización preferida y permite utilizar el sistema según la invención *in situ* y a distancia del tejido biológico que se va a caracterizar. Además, en esta segunda realización el sistema según la invención puede utilizarse directamente en la entidad biológica de manera no destructiva y no intrusiva, es decir, sin tener que realizar la extracción de una muestra de un tejido biológico.

Las figuras 5 a 7 son representaciones según diferentes vistas de un dispositivo 50 realizado según la segunda realización del sistema según la invención, siendo esta segunda realización la realización preferida del sistema según la invención. La figura 5 es una representación según una vista en sección transversal, la figura 6 es una representación según una vista isométrica y la figura 7 es una representación según otra vista en sección transversal del dispositivo 50. El dispositivo 50 permite realizar medidas directamente sobre un racimo de uvas 60 que comprende una pluralidad de granos 70.

Esta realización, que llamaremos MULTIPLEX®, está basada en una caja portátil 510 y alimentada por una batería 5121 que puede ser remota o estar integrada en el asa, dotada de una superficie de medida 514 y de una interfaz de usuario que comprende una pantalla 5152 y elementos de control, tales como botones o teclas 5101 y 5102. Esta caja puede mantenerse por una parte formando un asa 512 que contiene la batería extraíble 5121 o el conector de la batería portátil remota.

Esta caja 510 también comprende una parte cilíndrica 513 que se extiende hacia el lado opuesto a la interfaz y que lleva la superficie de medida en su extremo. La superficie de medida 514 está rodeada por un blindaje 5130 que es más o menos opaco y posiblemente desmontable, que permite reducir las interferencias de la luz ambiente y dar una referencia en cuanto a la distancia de medida óptima con respecto a la superficie de medida 514.

Esta superficie de medida 514 comprende un juego de detectores 540 que cubren las longitudes de onda de fluorescencia que se van a medir. En la realización descrita en este documento, este juego 540 comprende tres detectores 541, 542 y 543 adyacentes entre sí y reagrupados en un triángulo equilátero en el centro de la superficie de medida 514. Estos tres detectores están orientados en direcciones paralelas entre sí alrededor de un eje de detección 5140, o muy ligeramente convergentes alrededor de este eje de detección 5140. Cada uno de estos detectores 541, 542 y 543 comprende un elemento de detección, en este documento un fotodiodo de silicio 5420 de aproximadamente 2 cm x 2 cm, y detecta la luz en una banda de longitud de onda determinada, respectivamente de color azul-verde, rojo y rojo lejano. Esta banda de detección se obtiene por un filtro coloreado o paso alto y un filtro interferencial. La combinación de estos dos tipos de filtros permite una mejor filtración que puede ser necesaria, en particular, para evitar que los detectores reciban la radiación emitida por las fuentes de excitación.

Es necesario señalar que los detectores reciben directamente la fluorescencia que se va a medir, sin utilizar óptica de recolección, convergente o alineada. Cada detector requiere únicamente un solo elemento de detección, el fotodiodo 5420 (figura 7), escogido lo bastante grande como para obtener una buena sensibilidad que permite prescindir de óptica de recolección. Este elemento de detección recibe de este modo una radiación 549 que proviene del conjunto de la zona diana 591 iluminada por los emisores de excitación.

Esta disposición permite utilizar elementos de detección relativamente simples, y evitar la necesidad de una óptica de recolección. Más allá de la economía sobre el coste de la óptica, también se evitan las limitaciones de volumen, ajuste y de profundidad de campos.

La superficie de medida 514 presenta una superficie periférica cónica cóncava que lleva varios juegos de emisores, que pueden emitir luz de excitación en diferentes longitudes de ondas, distribuidos en un círculo alrededor del juego de detectores 540.

Estos emisores comprenden un juego de emisores ultravioletas 520 que comprenden seis emisores UV 521 a 526, repartidos a 120° en tres grupos de dos emisores adyacentes, en un círculo alrededor del juego de detectores 540.

Cada una de estas fuentes comprende una fuente, en este documento un diodo LED ultravioleta 527, colocada en un reflector parabólico 5281 que forma un haz de aproximadamente 30°. Los reflectores están montados sobre una base 5282 que determina la posición de su haz con respecto al eje de detección 5140. Como alternativa, los emisores UV pueden también utilizar un dispositivo dióptrico o catadióptrico para mejorar la convergencia del haz emitido.

Los emisores comprenden también un juego de emisores de luz visible 530, que comprenden tres emisores 531, 532 y 533 repartidos a 120° alrededor del juego de detectores 540 según el mismo círculo que el juego de emisores UV 520 e intercalados con los emisores UV. Cada uno de estos emisores de luz visible comprende una fuente que comprende una formación de diodos LED intercalados de color rojo, verde y azul, integrados en un componente común 534 de aproximadamente 4,5 cm de lado y de una potencia de 3 x 15 W, y recubiertos con una placa de plástico transparente que forma una formación de microlentes convergentes. Este componente común 534 está montado sobre un bloque 536 que forma radiador, cuya forma determina la orientación de la fuente con respecto al eje de detección 5140. El emisor comprende también un filtro coloreado de paso de banda ancha, que permite restringir las emisiones en las longitudes de onda utilizadas para la detección de fluorescencia, en particular hacia el rojo lejano.

Como alternativa a las fuentes RGB, (rojo-verde-azul) descritas en este documento, también pueden usarse fuentes de excitación monocromáticas, por ejemplo fuentes de color ámbar en forma de una formación LED monocromática de gran potencia, del orden de 200 W en continuo.

Los emisores de excitación están orientados para obtener una iluminación uniforme de la zona diana 591, incluso cuando se trata de un objeto heterogéneo y/o en tres dimensiones.

En realizaciones para aplicaciones a corta distancia, por ejemplo utilizando una excitación UV, los haces de los emisores están orientados para converger hacia el eje o los ejes A541, A542 y A543 de los detectores 541, 542 y 543. Más particularmente, los ejes A522, A532 de los haces de excitación son concurrentes entre sí y con el eje de detección

5140 en un mismo punto P5140, a una distancia óptima para la medida. En la realización descrita, el punto de convergencia P5140 se sitúa entre 10 y 20 cm del juego de detectores 540, por ejemplo aproximadamente 15 cm.

El hecho de que los haces emitidos no estén alineados y presenten una cierta abertura o divergencia permite limitar las tensiones que pesan sobre la distancia de medida. En efecto, mientras la diana, en este documento un racimo de uvas 60, se encuentre dentro de los haces 529 y 539 de los emisores, será iluminado de modo homogéneo sobre sus diferentes superficies dirigidas hacia el juego de detectores 540. Por lo tanto, la fluorescencia 549 emitida hacia los detectores será bastante estable y homogénea para proporcionar medidas reales de la zona medida 591.

Por lo tanto, aunque las medidas que utilizan los emisores UV se hagan a una distancia de aproximadamente 15 cm, las medidas que sólo utilizan los emisores de luz visible pueden realizarse a distancias mayores, incluso hasta aproximadamente 1 m, por ejemplo para una medida de antocianinas.

En otras realizaciones, los haces de los emisores pueden orientarse para que sean paralelos al eje de detección, por ejemplo para aplicaciones de medida a una distancia importante.

La figura 7 ilustra más particularmente la estructura del dispositivo en esta realización de la invención. La parte cilíndrica 513 de la caja contiene una tarjeta electrónica 5131 sustancialmente anular, que comprende los circuitos de alimentación de las fuentes de excitación, el circuito de gestión de los impulsos de excitación y un circuito que produce un generador de corriente.

Los detectores, y la electrónica adjunta, se reagrupan en un módulo de detección cilíndrico 5400, situado sobre la superficie de medida 514 en el centro del círculo formado por los emisores de excitación y que se extienden en dirección a la diana que se va a analizar. La superficie externa de este cilindro lleva los tres detectores 541, 542 y 543.

Esta disposición permite colocar los detectores sustancialmente al mismo nivel que los extremos de los emisores para que dispongan de un campo de recepción amplio y permite de este modo acercarse a la diana.

El módulo de detección 5400 comprende tres pequeñas tarjetas electrónicas 5141, 5142, 5143 básicamente analógicas, sustancialmente circulares, apiladas a lo largo de su eje longitudinal, fijadas y espaciadas por pequeñas columnas 5144.

La primera pequeña tarjeta electrónica 5141, situada en la superficie de la superficie externa del módulo de detección 5400, lleva los elementos de detección, en este documento fotodiodos de silicio. Para cada uno de estos detectores, el fotodiodo de silicio 5420 recibe la luz que se va a detectar a través de un filtro coloreado o paso alto 5421 y un filtro interferencial 5422 fijados de modo desmontable por una tuerca de bloqueo 5423 en una abertura cilíndrica de 25,4 mm, que puede de esta manera recibir filtros convencionales de 1 pulgada o de 25 mm.

Alejándose de la superficie de medida 514, la segunda pequeña tarjeta electrónica 5142 lleva los circuitos y los amplificadores que realizan el rechazo de la luz ambiental mediante un bucle de retroalimentación negativo.

La tercera pequeña tarjeta electrónica 5143 lleva circuitos y componentes que contienen en particular dispositivos de muestreo y retención.

El módulo de detección 5400 constituye un conjunto compacto que puede desmontarse de la caja 510, por ejemplo para su mantenimiento o para ser reemplazado por un módulo de cámara o un módulo que incluye una o varias guías de ondas ópticas.

Este módulo de detección está conectado, a través de la abertura de la tarjeta electrónica grande, a un módulo de tratamiento 5151 situado por el lado de la interfaz y que comprende todo o parte de los medios de tratamiento: En particular una unidad de adquisición y medios de cálculo.

Este módulo de tratamiento está comprendido en una parte 515 de la caja que lleva la pantalla 5152 y puede inclinarse para una buena legibilidad, y replegarse en un alojamiento 5105 dentro de la caja 510. Este módulo de tratamiento puede comprender una conexión desmontable que le permite ser cambiado fácilmente, por ejemplo para una actualización o un cambio de función.

La tarjeta electrónica 5131 vinculada a la excitación, la 5141 a 5143 vinculadas a la detección, y el módulo de tratamiento 5151 están de este modo dispuestos en módulos electrónicos diferentes y separados, permitiendo un mantenimiento simplificado. Estos módulos además están separados por una cierta distancia, en este documento 2 cm y por ejemplo al menos 1,5 cm, lo que permite disipar mejor el calor generado y limita los riesgos de interferencias entre los circuitos que contienen.

En la realización describe en este documento, la detección está sincronizada sobre la excitación que es emitida por los emisores. Se ha utilizado con éxito una frecuencia de excitación de 1 kHz con impulsos de 520 microsegundos, y permite un tratamiento a tiempo real como y cuando sea necesario mientras se recubre el sitio. Las diferentes medidas

de fluorescencia necesarias para el establecimiento del contenido o del índice programado están entrelazadas en el seno del período de medida.

Por lo tanto, los medios de gestión y de tratamiento están dispuestos para:

- Emitir una señal para controlar los emisores por impulsos,
- Detectar los picos de fluorescencia generada por estos impulsos gracias a amplificadores que realizan el rechazo de la luz ambiental mediante un bucle de retroalimentación negativo,
- controlar, por ejemplo por la misma señal de dirección, el tratamiento del pico fluorescencia detectado por los dispositivos de muestreo y retención; y
- Proporcionar una medida analógica de la medida de fluorescencia a la unidad de adquisición.

En otras realizaciones, se prevé una detección sincrónica que utiliza la modulación de fase entre la excitación y la detección. Los medios de gestión y de tratamiento entonces están dispuestos para:

- Controlar los emisores según una frecuencia que incluye una modulación de fase,
- Tratar la señal de detección de fluorescencia en modulación de fase y proporcionar la medida de fluorescencia.

A continuación se describirá la determinación del contenido en antocianinas (ANTH) de la piel de un grano de uva según el primer aspecto de la invención y a una distancia variable.

La figura 8 proporciona el espectro de absorción 82 de la malvidina glicósida que es la antocianina mayoritaria de la uva, en metanol acidificado al 50%, en unidad de coeficientes de extinción; el espectro de emisión 83 de la clorofila y el espectro de transmisión 84 del filtro F2 que es un filtro Schott RG9.

La fuente 11 es una fuente que emite una radiación 111 en el verde (GREEN), cuya longitud de onda se sitúa en una banda de absorción de las antocianinas y que induce la fluorescencia de la clorofila 33 y provoca la emisión de una radiación de fluorescencia 112. La longitud de onda de esta fuente 111 puede por ejemplo ser de aproximadamente 530 nm. La figura 8 proporciona el espectro 86 de la radiación 11. Un ejemplo de una fuente GREEN es el diodo NS530L de la firma Roithner Lasertechnik.

La fuente 12 emite una radiación 121 en el rojo (RED), donde las antocianinas absorben ligeramente o nada, lo que induce la fluorescencia de la clorofila 33 y provoca la emisión de una radiación de fluorescencia 122, que sirve de referencia para la medida del contenido en antocianinas. La longitud de onda de esta fuente es preferentemente de 650 nm. La figura 8 proporciona el espectro 85 de la radiación 121.

Por otro lado, la fuente 13 emite una radiación 131 en el azul (BLUE), donde las antocianinas absorben ligeramente o nada, lo que induce la fluorescencia de la clorofila 33 y provoca la emisión de una radiación de fluorescencia 132, que sirve de radiación suplementaria para la medida del contenido en antocianinas. La longitud de onda de esta fuente es preferentemente de 450 nm. La figura 8 proporciona el espectro 87 de la radiación 12.

Las fuentes 11, 12 y 13 iluminan sucesivamente el tejido 30 por emisión respectivamente de una radiación 111, 121 y 131. La radiación 111 es absorbida en cantidad variable por la epidermis de la piel dependiendo de su contenido en antocianinas 34, mientras que las radiaciones rojo 121 y azul 131 no se absorben o son poco absorbidas. Todas las radiaciones 111, 121 y 131 inducen la fluorescencia de la clorofila 33 que emite entonces respectivamente radiaciones de fluorescencia 112, 122 y 132 en el rojo y el infrarrojo cercano, cuyas intensidades son proporcionales a las intensidades de las radiaciones 111, 121 y 131 recibidas por la clorofila 33. La medida de la relación de las emisiones de fluorescencia excitadas por la fuente 11 y por la fuente 12 permite determinar el contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva. Además, la medida de la relación de las emisiones de fluorescencia excitadas por la fuente 12 y por la fuente 13 permite determinar si la radiación de referencia 12 se ve afectada por las antocianinas, cuyo contenido aumenta con el tiempo. Cuando el contenido en antocianinas de un grano de uva aumenta, la radiación 111 se absorbida en exceso y comienza a saturarse. Además, las antocianinas comienzan también a afectar a la radiación de referencia. En este caso, para realizar medidas más allá de la saturación causada por una concentración demasiado grande en antocianinas, la radiación 121, que era la radiación de referencia antes de la saturación, se convierte en la radiación de medida después de la saturación y la radiación 131, que era la radiación suplementaria antes de la saturación, se convierte en la radiación de referencia después de la saturación. La radiación 111 ya no sirve en la medida. Por lo tanto, la medida del contenido en antocianinas puede entonces realizarse más allá de la saturación.

Después, el contenido en antocianina se calcula según la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{ANTH}_{\text{Antes de la Saturación}} &= \log \text{FER_ANTH_GREEN} - \log \text{FER_CHL}_G \\ \text{ANTH}_{\text{Después de la Saturación}} &= C + \log \text{FER_ANTH_RED} - \log \text{FER_CHL}_R \end{aligned}$$

Con

1. $\text{LogFER_ANTH_GREEN} = \log(\text{FRFred}/\text{FRFgreen})$

2. $\text{LogFER_ANTH_RED} = \log(\text{FRFblue}/\text{FRFred})$ y

3. $\text{LogFER_CHL}_G = \log(\text{FRFred}/\text{FRFgreen})$

4. $\text{LogFER_CHL}_R = \log(\text{FRFblue}/\text{FRFred})$

En estas expresiones $\text{logFER_CHL}_G = \log(\text{FRFred}/\text{FRFgreen})$ y $\text{logFER_CHL}_R = \log(\text{FRFblue}/\text{FRFred})$, las cantidades logFER_CHL_G y logFER_CHL_R se miden antes de la aparición de antocianinas en la piel del grano de la uva, ANTH es el contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva en $\text{nanomoles}/\text{cm}^2$, FRFgreen, FRFred y FRFblue son respectivamente las intensidades de radiaciones de fluorescencia 112, 122 y 132 inducidas por la radiación 111, 121 y 131 y C es una constante de tal forma que $\text{ANTH}_{\text{después de la saturación}}$ sea igual a $\text{ANTH}_{\text{antes de la saturación}}$ en el momento de la saturación.

La figura 9 muestra un gráfico que representa la evolución del contenido medido en antocianinas en la piel de un grano de uva, determinada según el primer aspecto de la invención. El eje 91 representa el momento a partir del cual se realiza la compensación de la saturación. La curva 92 muestra los resultados obtenidos con compensación de la saturación según la invención, es decir, considerando la radiación de referencia antes de la saturación como radiación de medida después de la saturación y la radiación suplementaria antes de la saturación como radiación de referencia después de la saturación. La curva 93 muestra los resultados obtenidos sin compensación de la saturación. Así, se observa que sin compensación de la saturación se obtiene una curva 93 disminuye después de la saturación, mientras que el contenido en antocianinas continúa aumentando. Con la compensación se obtiene una curva 92 creciente que muestra el aumento del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva.

A continuación se describirá la determinación del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva según el segundo aspecto de la invención y a una distancia variable. Según este segundo aspecto la longitud de onda de la radiación 121 se mantiene sin cambios a 650 nm. En cambio la longitud de onda de la radiación 111 se escoge a 590 nm. Esta longitud de onda corresponde a una absorción inferior de antocianinas que la longitud de onda de 530 nm escogida según el primer aspecto de la invención y que corresponde al pico de absorción de antocianinas. La figura 10 muestra el espectro de absorción 82 de la malvidina glicósida que es la antocianina cuyo contenido se desea determinar, con metanol acidificado al 50 %, en unidades de coeficientes de extinción, el espectro 83 de emisión de la clorofila y el espectro de transmisión 84 del filtro F2, así como el espectro 85 de la radiación 121 y el espectro 88 de la radiación 111 utilizada en este segundo aspecto de la invención.

El principio de medida en este segundo aspecto de la invención es sustancialmente similar al principio de medida en el primer aspecto de la invención. Las fuentes 11 y 12 iluminan sucesivamente el tejido 30 por emisión respectivamente de las radiaciones 111 y 121. La radiación 111 es absorbida en cantidad variable por la epidermis de la piel según su contenido de antocianinas 34, mientras que la radiación roja 121 no. Estas radiaciones 111 y 121 inducen la fluorescencia de la clorofila 33 que después emite respectivamente radiaciones de fluorescencia 112 y 122 que son medidas. Sin embargo, como la longitud de onda escogida, de 590 nm, para la radiación 121 corresponde a una absorción inferior que la longitud de onda, de 530 nm, de la radiación 121 escogida en el primer aspecto de la invención que se ha descrito anteriormente, no se produce ninguna saturación a causa del aumento del contenido en antocianinas en la piel del grano de uva. La figura 11 muestra una representación de:

- una primera curva 1111 que muestra la evolución de la medida realizada con una radiación 121 de longitud de onda de 530 nm en función del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva, y
- una segunda curva 1112 que muestra la evolución de la medida realizada con una radiación 121 de longitud de onda de 590 nm en función del contenido en antocianinas de la piel de un grano de uva.

La longitud de onda de 590 nm corresponde a una absorción inferior de antocianinas que la longitud de onda de 530 nm. Ha de apreciarse que para la longitud de onda de 530 nm, curva 1111, la saturación se produce muy rápidamente, mientras que para la longitud de onda de 590 nm, curva 1112, no se produce saturación. Además, en el caso de la curva 1112 los resultados obtenidos son más lineales que en el caso de la curva 1111.

Ventajosamente, el primer y el segundo aspecto de la invención pueden combinarse. En efecto, la radiación suplementaria 131 que se ha descrito anteriormente puede utilizarse para determinar si la radiación de referencia 121 se ve afectada o no por las antocianinas. Cuando la concentración o el contenido en antocianinas es tal que se produce una saturación incluso con una radiación 111 a una longitud de onda desplazada con relación al pico de absorción, por ejemplo de 590 nm, es posible considerar la radiación 121, que era la radiación de referencia antes de la saturación, como la radiación de medida después de la saturación y la radiación 131, que era la radiación suplementaria antes de la saturación, como la radiación de referencia después de la saturación. La figura 12 muestra los resultados obtenidos combinando el primer y el segundo aspectos de la invención. La curva 1201 corresponde a los resultados de las medidas realizadas con:

- Una radiación 111 de 530 nm,
- Una radiación 121 de 650 nm, y
- Una radiación 131 de 450 nm;

5 y la curva 1202 corresponde a los resultados obtenidos con:

- Una radiación 111 de 590 nm;
- Una radiación 121 de 630 nm, y
- Una radiación 131 de 450 nm.

10

El eje 1203 representa el momento a partir del cual se realiza la compensación de la saturación según el primer aspecto de la invención.

15

Por otro lado, las longitudes de onda de las radiaciones 111, 121 y 131 pueden modificarse en función de la evolución del pH en el tejido biológico que se desea caracterizar. La figura 13 muestra el espectro de absorción 1301 de antocianinas a pH = 1, y el espectro de absorción 1302 de antocianinas a pH = 8. Ha de apreciarse que cuando el pH aumenta el pico de absorción se desplaza hacia una longitud de onda más elevada. Esta variación del espectro de absorción puede tenerse en cuenta en la compensación de la saturación cualquiera que sea el aspecto aplicado de la invención.

20

A continuación se proporcionará una breve descripción de la medida del contenido en flavonol (FLAV) de la piel de un grano de uva, según el tercer aspecto de la invención. La fuente 11 es en este caso una fuente que emite una radiación 111 en el rayo ultravioleta (UV), cuya longitud de onda se sitúa en una banda de absorción de flavonoles y que induce la fluorescencia de la clorofila 33 y provoca la emisión de una radiación de fluorescencia 112. La longitud de onda de esta fuente 11 por ejemplo, puede ser de aproximadamente 375 nm. Después, la fuente 12 puede emitir una radiación de referencia 121 a 650 nm que corresponde a una longitud de onda no absorbida por los flavonoles. Cuando la radiación de medida 111 está saturada por el contenido en flavonoles de la piel entonces se puede utilizar como radiación de medida una radiación de 450 nm, que corresponde a una absorción inferior sobre el espectro de absorción de los flavonoles. Esta radiación a 450 nm puede emitirse por ejemplo por la fuente 13. La radiación de referencia no se modifica y permanece a 650 nm

25

30

La invención también puede aplicarse para medir el contenido de otros compuestos cromóforos y poco no fluorescentes, tales como los licopenos en el caso, por ejemplo, de los tomates.

35

La invención no se limita al ejemplo que se ha descrito en detalle anteriormente y puede utilizarse para caracterizar un tejido biológico de cualquier tipo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar el contenido en un compuesto cromóforo y no fluorescente (34), llamado primer compuesto, en un tejido (30) de una entidad biológica, comprendiendo dicho tejido biológico (30) además un compuesto cromóforo y fluorescente (33), llamado segundo compuesto, comprendiendo dicho procedimiento al menos una iteración de las operaciones siguientes:
- Emisión por medios de emisión (11, 12), en la dirección de dicho tejido (30), de una primera radiación óptica (111), llamada de medida, y de una segunda radiación óptica (121), llamada de referencia, cada una escogida para inducir una radiación de fluorescencia del dicho segundo compuesto (33), absorbiéndose parcialmente cada una de dichas primera y segunda radiaciones (111, 121) por el dicho primer compuesto (34),
 - Medida, por medios de medida (21, 22), de dichas radiaciones de fluorescencia (112, 122) inducidas por dichas primera y segunda radiaciones (111, 121), y
 - Determinación, a partir de dicha primera medida, del contenido de dicho primer compuesto (34) en dicho tejido (30);
- 15 **caracterizado por que** dicho procedimiento comprende además al menos una compensación de una saturación de medida debida a una absorción demasiado grande de dicha radiación de medida (111) por dicho primer compuesto (34), comprendiendo dicha compensación una elección, para dicha radiación de medida de una longitud de onda correspondiente a una absorción inferior en el espectro de absorción del primer compuesto (34).
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende además una emisión, mediante los medios de emisión (13), en la dirección de dicho tejido biológico (30), de una tercera radiación óptica (131), llamada suplementaria, escogida de manera que induce una radiación de fluorescencia (132) de dicho segundo compuesto (33), comprendiendo dicho procedimiento además una medida de radiación de fluorescencia (132) inducida por dicha radiación suplementaria (131), utilizándose dicha medida para determinar si la radiación de referencia (121) se ve afectada o no por el primer compuesto (34).
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado por que**, cuando el contenido del tejido biológico (30) en el primer compuesto (34) afecta a la radiación de referencia (121), la longitud de onda escogida para la radiación de medida (111) después de la saturación corresponde a una longitud de onda situada alrededor de la longitud de onda de la radiación de referencia (121) antes de la saturación.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado por que** comprende, cuando la distancia entre el tejido biológico (30) y los medios de emisión (11, 12, 13) y los medios de medida (21) no es fija, una elección de una nueva longitud de onda para la radiación de referencia después de la saturación, estando menos afectada dicha nueva longitud de onda por el contenido en el primer compuesto.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado por que** cuando la distancia entre el tejido biológico (30) y los medios de emisión (11, 12, 13) y los medios de medida (21, 22) no es fija, la nueva longitud de onda escogida para la radiación de referencia después de la saturación corresponde a una longitud de onda que se sitúa alrededor de la longitud de onda de la radiación suplementaria (131).
- 40 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que**, cuando la longitud de onda de referencia (121) no se ve afectada por el contenido del primer compuesto (34) en el tejido biológico (30), la longitud de onda escogida por la radiación de medida (111) corresponde a una absorción inferior por el primer compuesto (34) que una longitud de onda, llamada límite, para la cual se produciría una saturación potencial para un contenido máximo previsto del primer compuesto (34) en el tejido biológico (30).
- 45 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** comprende una modificación de la longitud de onda de la radiación de medida (111) y/o de la radiación de referencia (121) en función de una característica fisicoquímica que tiene una influencia sobre el espectro de absorción del primer compuesto (34) y/o sobre el espectro de fluorescencia del segundo compuesto (33).
- 50 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** al menos una de las radiaciones de referencia (121) y las radiaciones de medida (111) se emite a una intensidad predeterminada y la otra radiación se emite a una intensidad variable de modo que las radiaciones de fluorescencia inducidas (122, 112) por cada una de las dichas radiaciones de referencia (121) y de medida (111) sean iguales en intensidad.
- 55 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado por que** la intensidad de la radiación de medida se ajusta en función de una señal, llamada de control, con respecto a las radiaciones de fluorescencia inducidas, por una parte por la radiación de medida y por otra parte por la radiación de referencia.
- 60 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** las intensidades de las radiaciones de medida (111) y las radiaciones de referencia (121) varían de manera alternada, en desplazamiento de fase, a una frecuencia predeterminada.
- 65

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** comprende una sincronización de las radiaciones (111, 121, 131) por modulación de fase.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** cada una de las radiaciones de medida (111) y radiaciones de referencia (121) se emite en forma de impulsos.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la determinación del contenido del primer compuesto (34) comprende un cálculo de la relación:

$$\frac{\text{Fluorescencia inducida por la radiación de referencia}}{\text{Fluorescencia inducida por la radiación de medida}} \frac{(121)}{(111)}.$$

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** comprende una determinación de la evolución, en el tiempo, del contenido del primer compuesto (34) en el tejido biológico (30).

15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, **caracterizado por que** el tejido biológico es la piel de un grano de uva y el segundo compuesto es clorofila:

- cuando el primer compuesto es una antocianina:

- O la longitud de onda de la radiación de medida antes de la saturación está entre 500 y 600 nm,
- O la longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación está entre 600 y 700 nm,
- O la longitud de onda de la radiación suplementaria es entre 400 y 500 nm,
- O la longitud de onda de la radiación de medida después de la saturación está entre 600 y 700 nm,
- O la longitud de onda de la radiación de referencia después de la saturación está entre 400 y 500 nm; y

- cuando el primer compuesto es un flavonol:

- O la longitud de onda de la radiación de medida antes de la saturación está entre 300 y 400 nm,
- O la longitud de onda de la radiación de referencia antes de la saturación está entre 600 y 700 nm,
- O la longitud de onda de la radiación de medida después de la saturación está entre 400 y 500 nm,
- O la longitud de onda de la radiación de referencia después de la saturación está entre 600 y 700 nm.

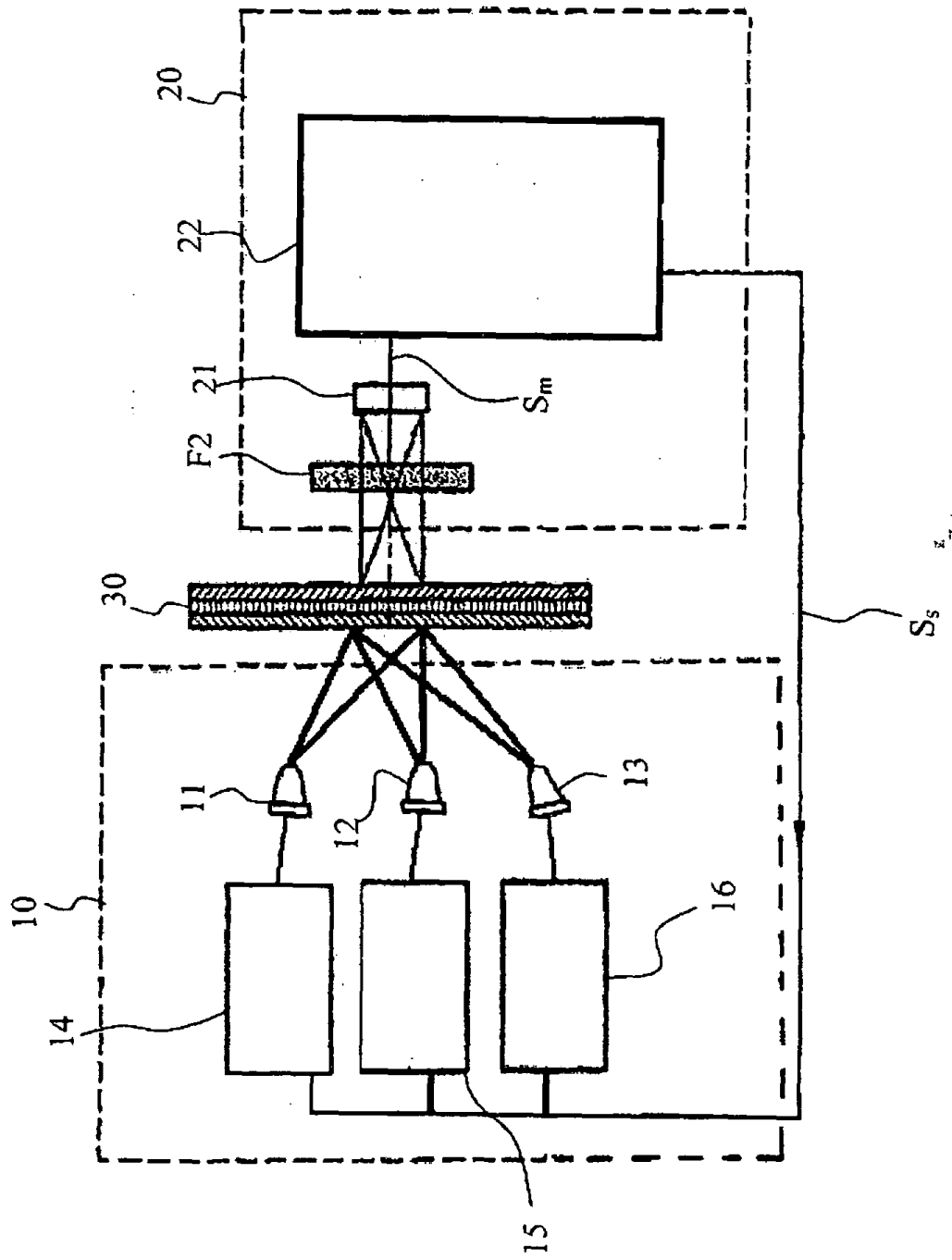
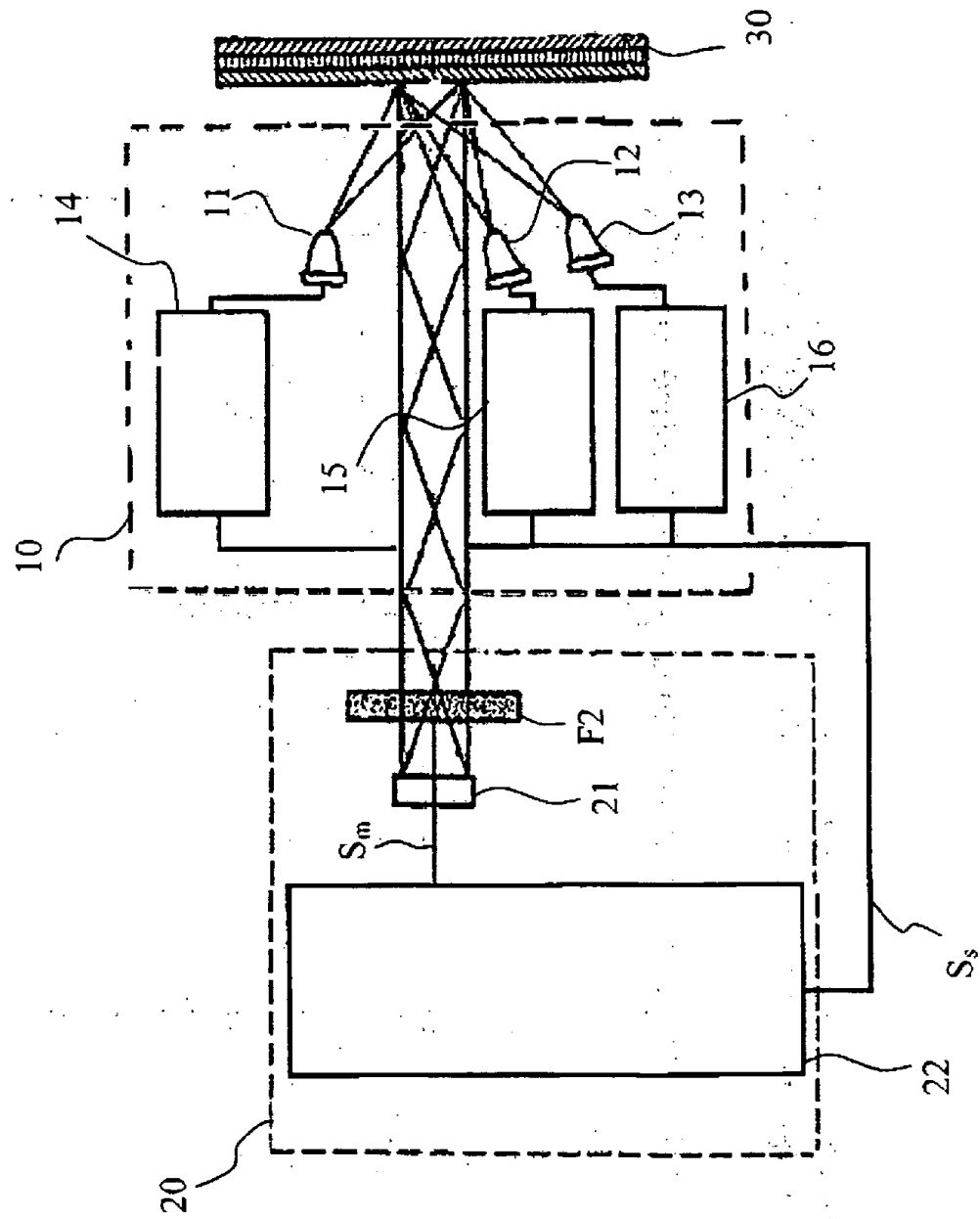


Fig. 1

Fig. 2



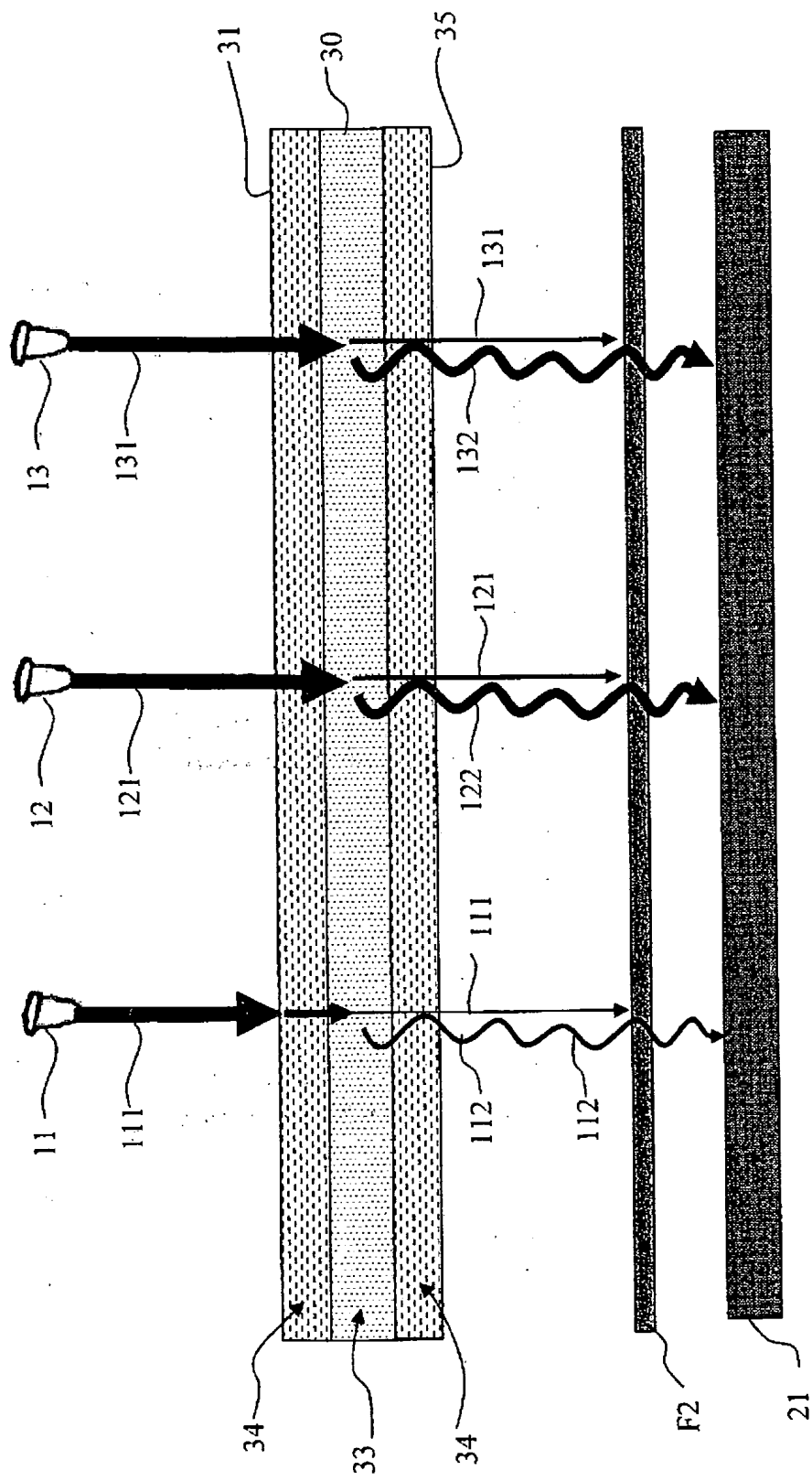


Fig. 3

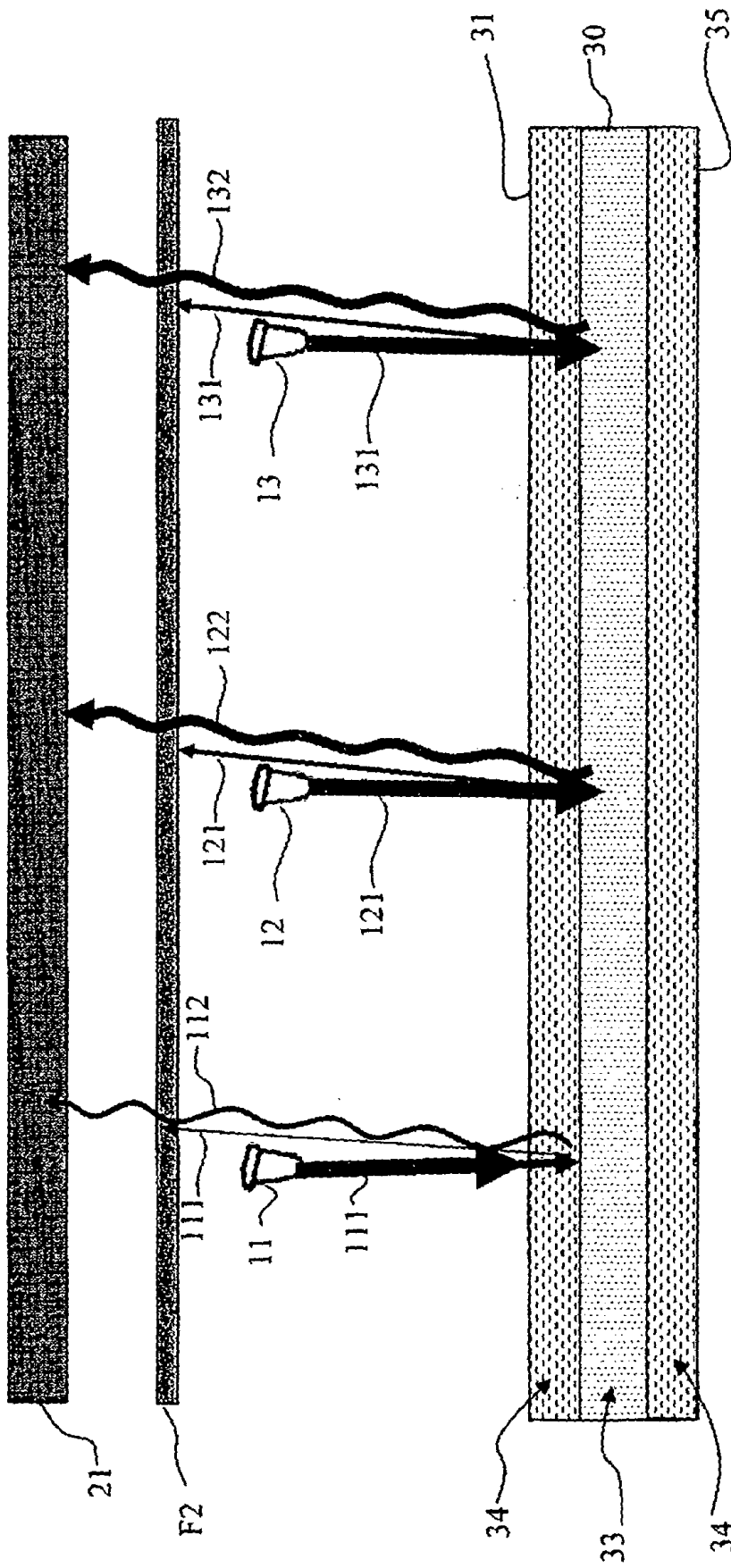


Fig. 4

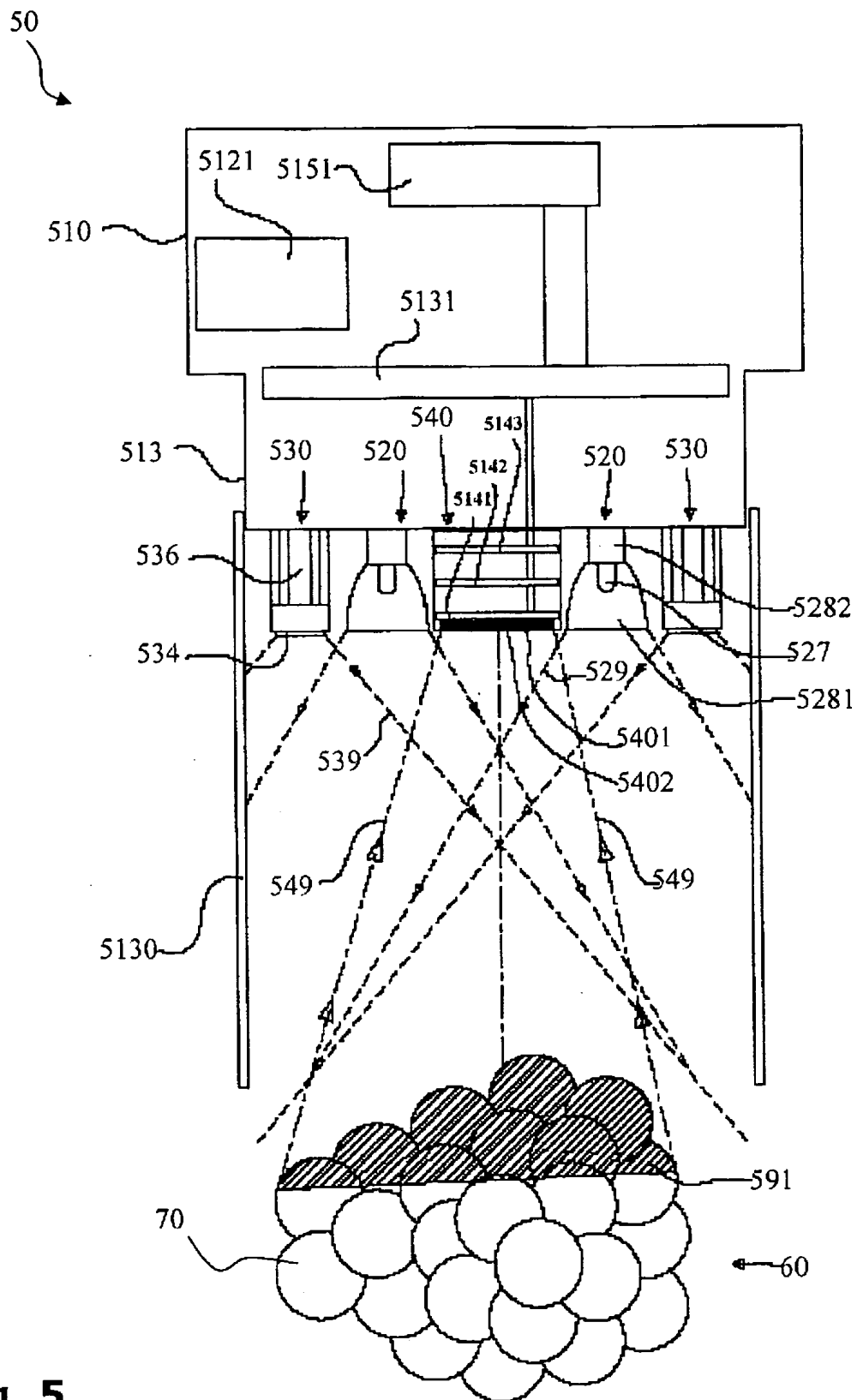


Fig. 5

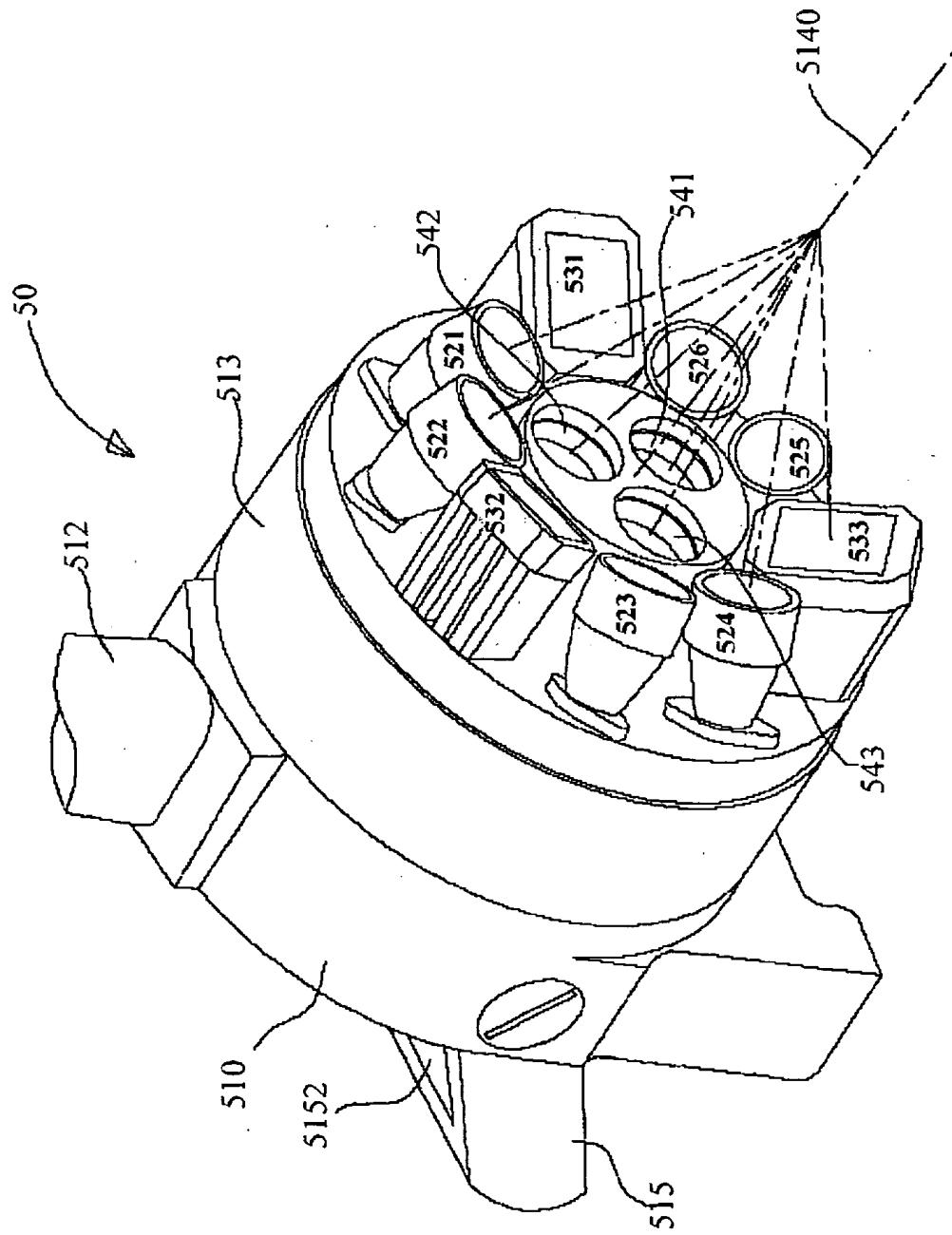


Fig. 6

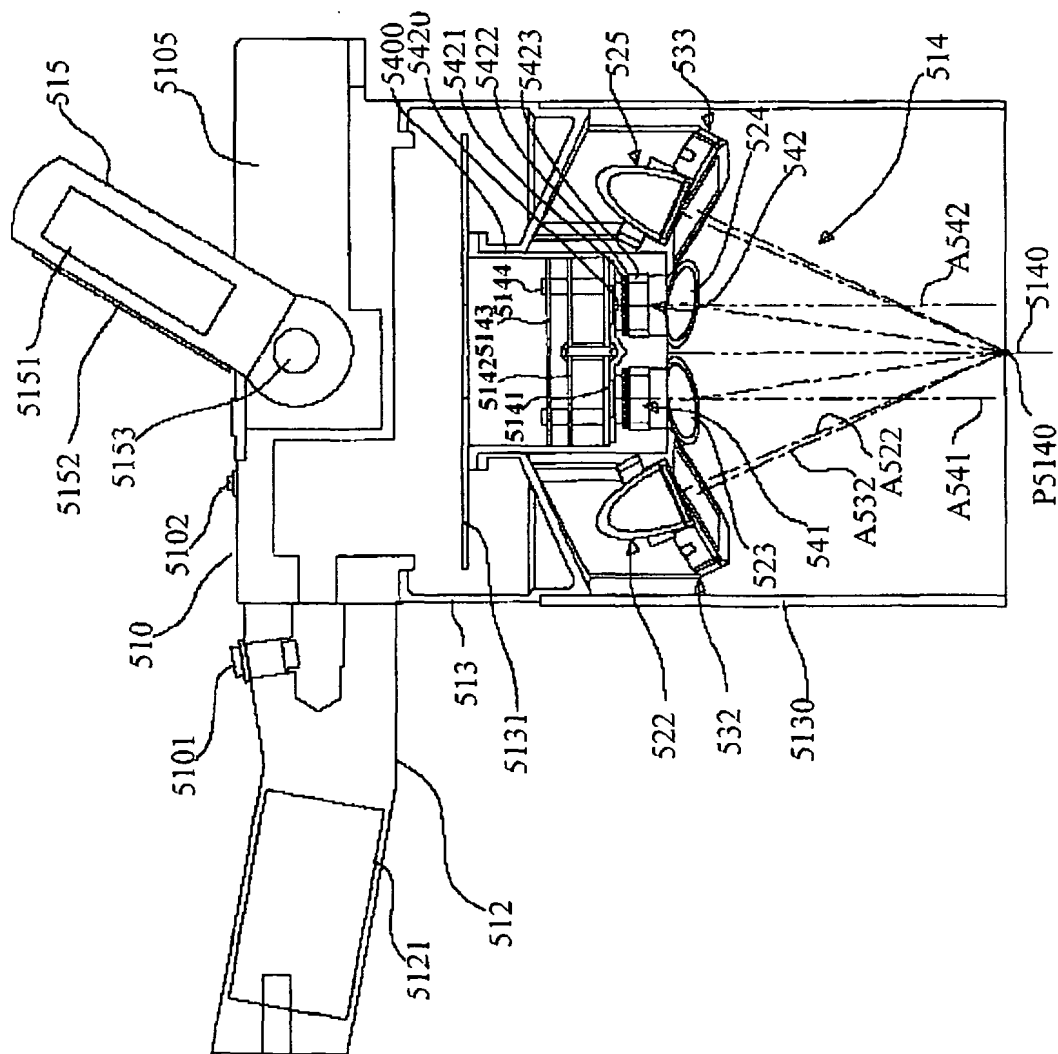
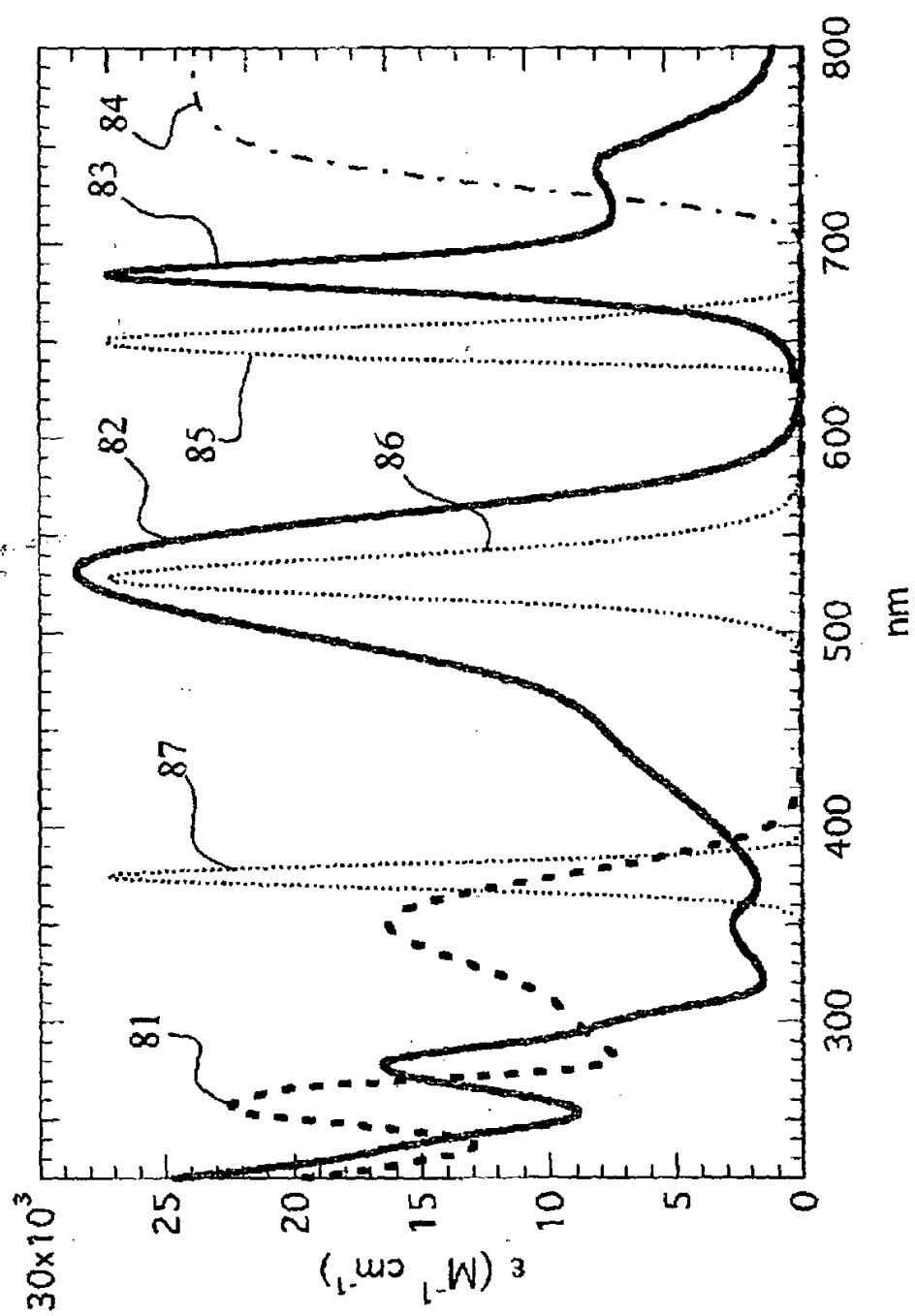


Fig. 7

**Fig. 8**

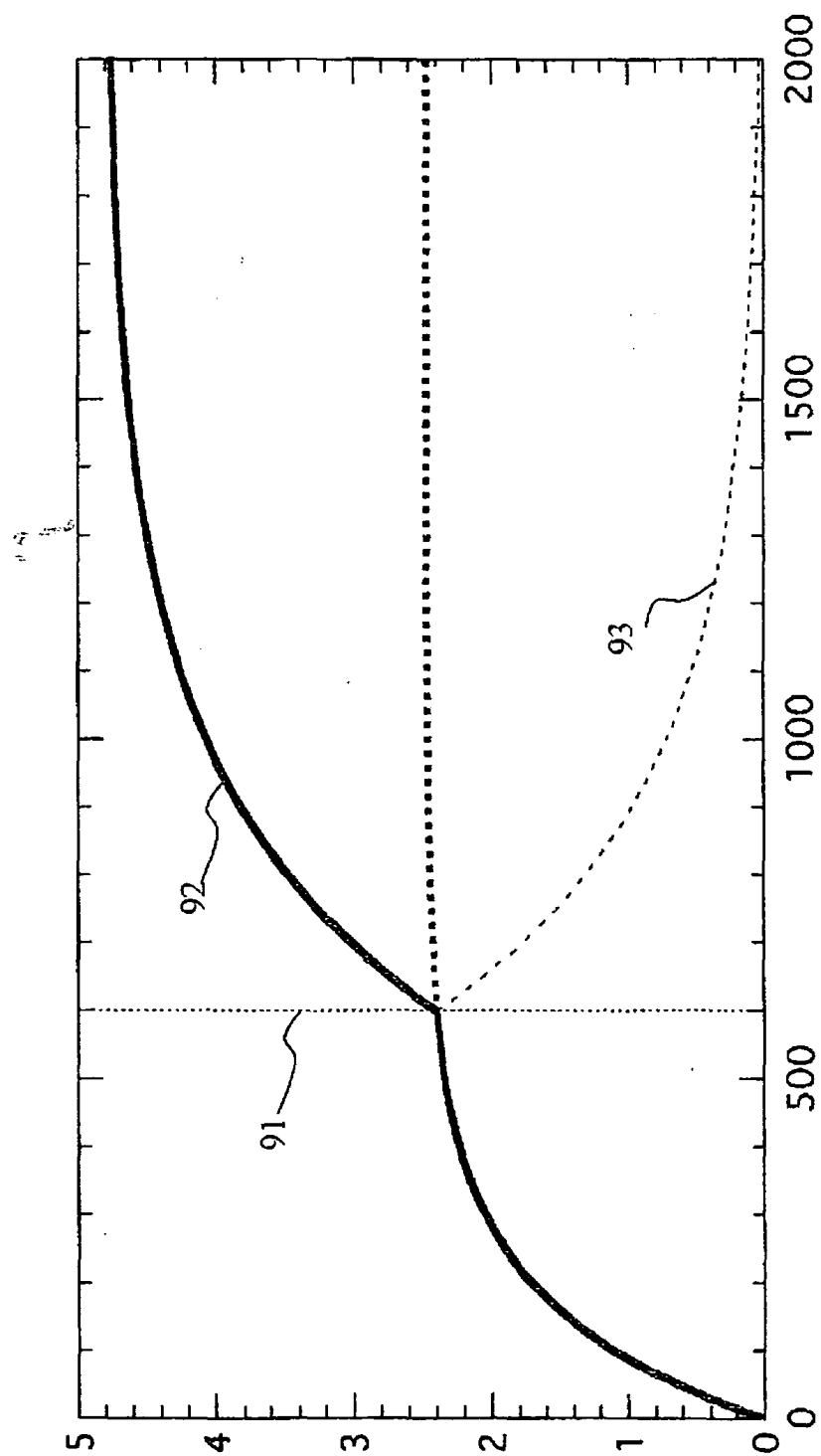
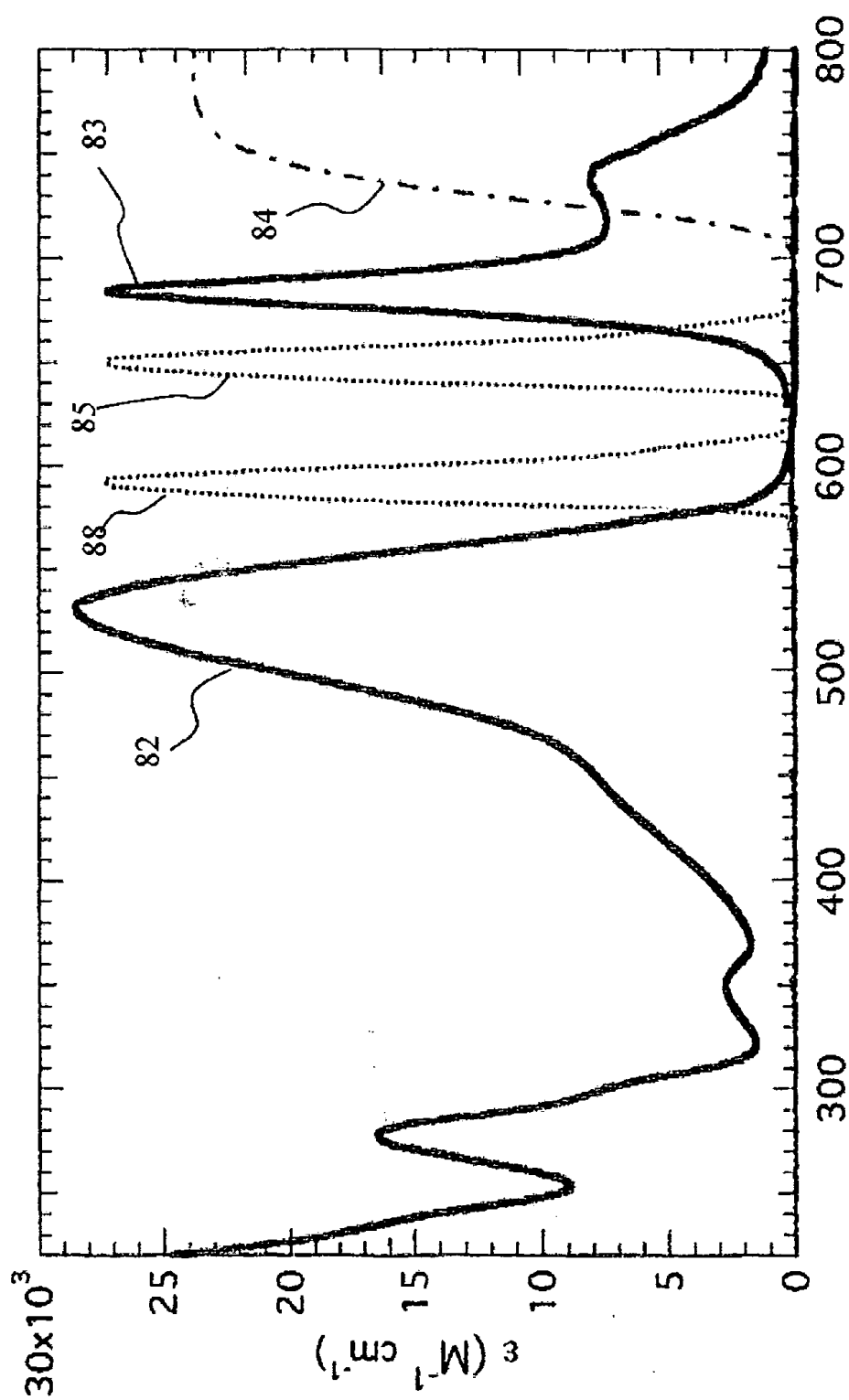
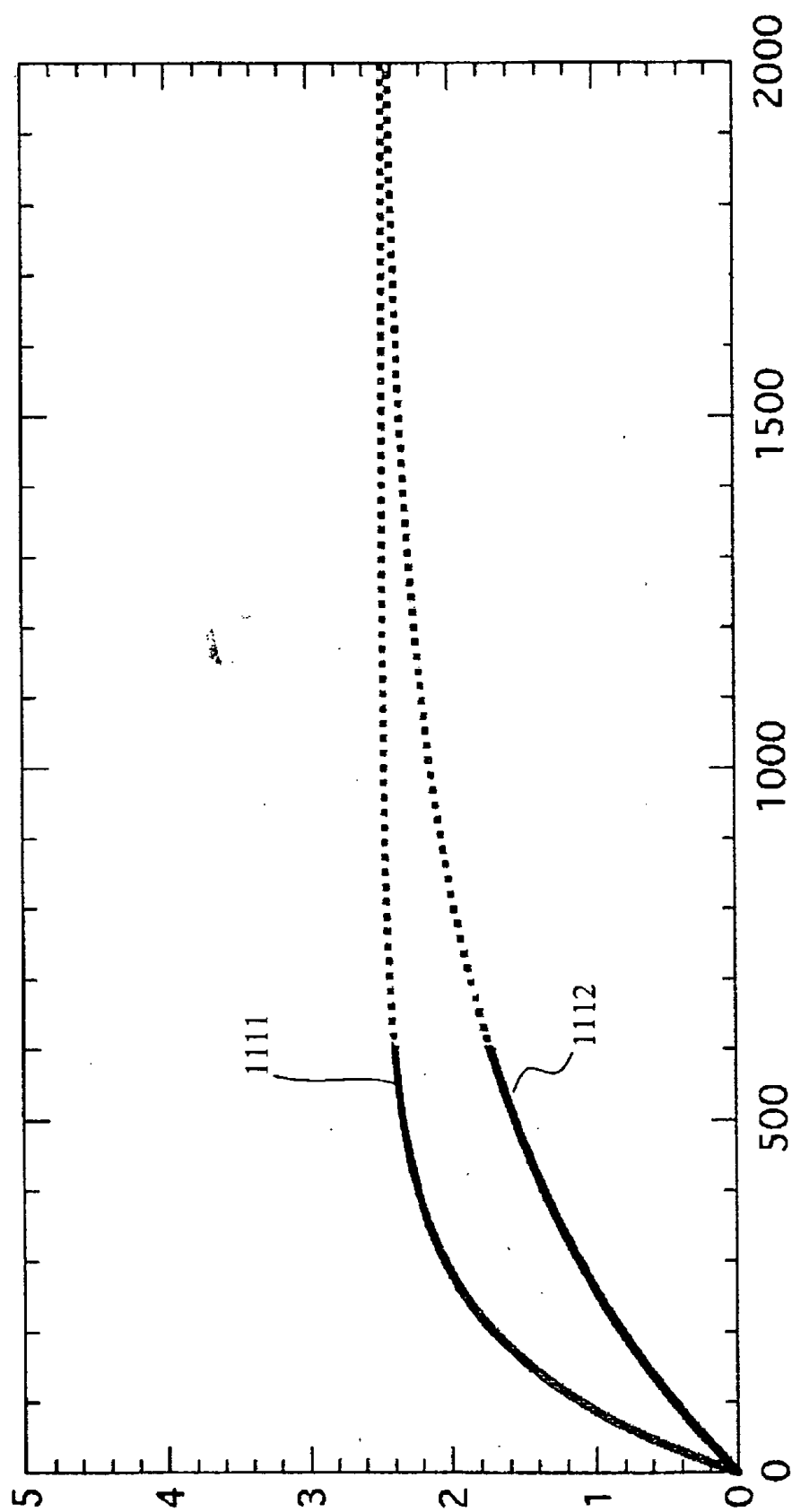


Fig. 9

**Fig. 10**

**Fig.11**

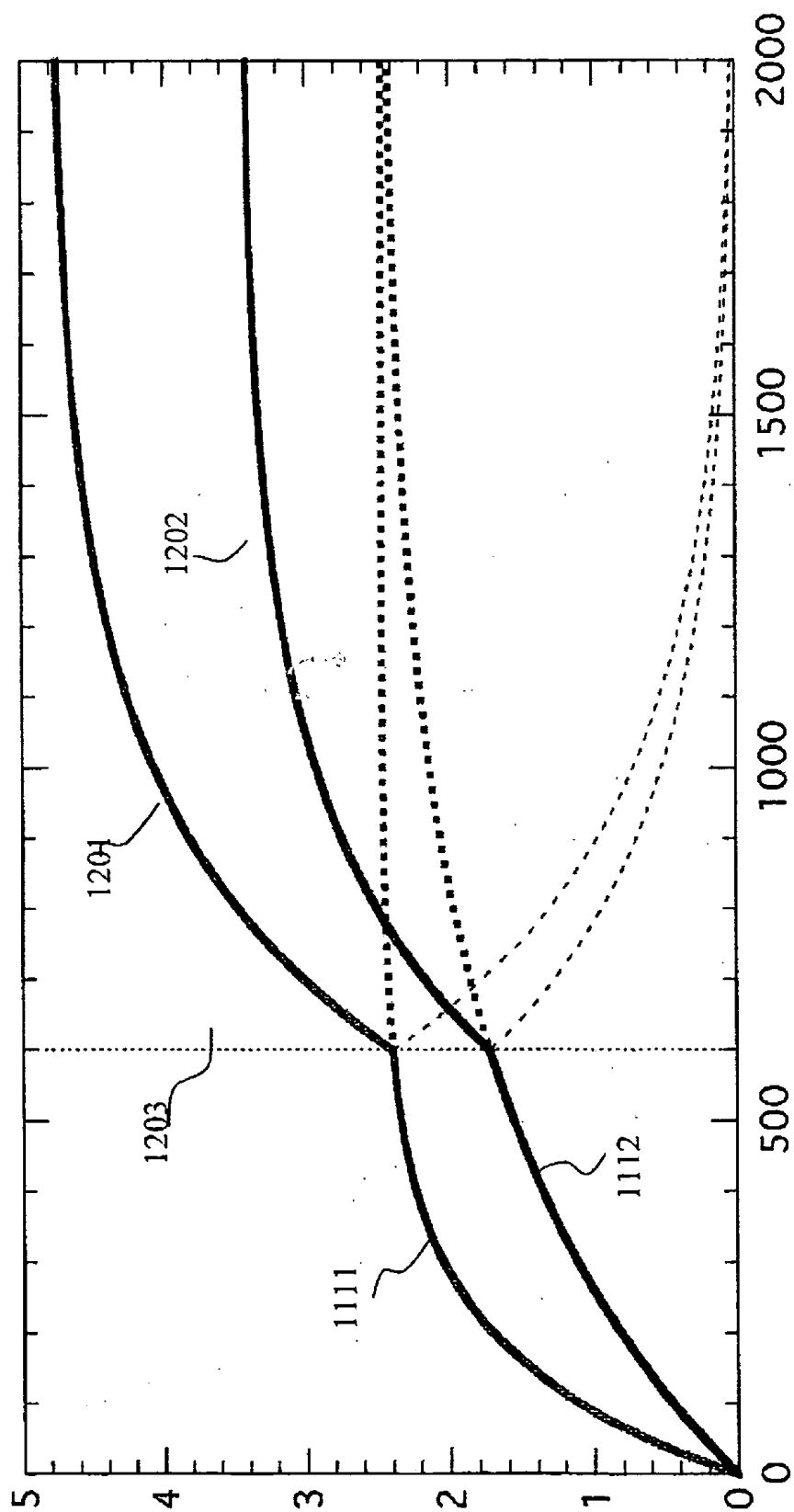
**Fig. 12**

Fig. 13

