Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Estudo de métodos analíticos para determinação da qualidade em laranjas intactas e suco

Marilia Bizzani

Araraquara
2016

Estudo de métodos analíticos para determinação da qualidade em laranjas intactas e suco

Marilia Bizzani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos David Ferreira.

Araraquara
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B625e

Bizzani, Marilia
Estudo de métodos analíticos para determinação da qualidade em laranjas intactas e suco / Marilia Bizzani. - Araraquara, 2016.
91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, área de concentração: Ciências dos Alimentos.

Orientador: Marcos David Ferreira.

1. Laranja (Análise não destrutiva). 2. Suco (Análise não destrutiva). 3. Qualidade. 4. Análise multivariada. 5. Orange. 6. Juice. 7. Nondestructive analysis. I. Ferreira, Marcos David, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARILIA BIZZANI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aos 27 dias do mês de outubro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARCOS DAVID FERREIRA - Orientador(a) do(a) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Instrumentação Agropecuária, Prof. Dr. LUIZ ALBERTO COLNAGO do(a) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Instrumentação Agropecuária, Profa. Dra. MARTA HELENA FILLET SPOTO do(a) Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz do Câmpus de Piracicaba da USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARILIA BIZZANI, intitulada **ESTUDO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE EM LARANJAS INTACTAS E SUCO.** Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. MARCOS DAVID FERREIRA

Prof. Dr. LUIZ ALBERTO COLNAGO

Profa. Dra. MARTA HELENA FILLET SPOTO

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Ernesto e Lourdes pelo incentivo e apoio.

A minha irmã Melissa que sempre torceu pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Douglas pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos David Ferreira pela oportunidade, ensinamentos e orientação deste trabalho. Obrigada pela paciência e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago pelos esclarecimentos das dúvidas e sugestões.

Às analistas e técnicos da Embrapa Instrumentação, em especial à Silviane Zanni por toda ajuda durante a pesquisa.

Ao grupo de Pós-colheita da Embrapa Instrumentação pela ajuda na realização das análises: Eliane, Karla, Gabrielle, Luiz Gustavo e Brenda.

Ao doutorando Douglas Flores por toda ajuda desde o planejamento, a execução das análises, sugestões, muito obrigada pelos ensinamentos e pela paciência.

Á Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro processo nº 2013/23479-0.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida.

Epígrafe

"As espécies que sobrevivem não são as mais fortes, nem as mais inteligentes, mas sim aquelas que se adaptam melhor às mudanças." Charles Darwin

Resumo

Objetivo: Avaliar o uso de métodos não invasivos e não destrutivos por ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN-DT) e espectroscopia de infravermelho próximo e médio (NIR) e (MIR) associado à análise multivariada para determinação de parâmetros relacionados à qualidade de laranjas e suco. **Métodos:** Os modelos de validação interna e externa foram construídos com laranjas do cultivar "Valência" colhidas no ano de 2015 e 2016 em duas floradas distintas, quatro estádios de maturação e em quatro colheitas distintas. Foram realizadas análises não destrutivas de RMN, NIR e MIR seguidas das medidas destrutivas de textura, espessura da casca e pectina total para construção de modelos de predição utilizando a laranja intacta. Para predição da massa da fruta, massa da casca, massa de suco foi utilizada a medida de RMN-DT da fruta intacta e para predição da viscosidade, sólidos solúveis, pH do suco foi utilizada a medida por RMN-DT e NIR do suco extraído de cada laranja. Em um último estudo utilizaram-se as medidas de RMN-DT e MIR do suco para quantificação de pectina solúvel em água. Os resultados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) para melhor visualização das características de cada colheita e florada e os modelos foram desenvolvidos utilizando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Foi avaliado o desempenho dos modelos com base nos valores do erro padrão da predição (SEP) e coeficiente de Pearson da predição (r)**. Resultados:** Os modelos de PLS desenvolvidos por RMN-DT validados para predição foram: espessura da casca r=0.72 SEP=0.49cm; pectina total r=0.76 SEP=5.76; massa da fruta r=0.96 SEP=13.84g; massa da casca r=0.96 SEP=7.25g; massa do suco r=0.92 SEP=9.75g e pH r=0.83 SEP=0.14. Para análise de PLS utilizando os espectros de NIR validou-se os seguintes parâmetros: textura r=0.92 SEP=6.22N; pectina total r=0.7 SEP=5.04 e para medida do suco o modelo para sólidos solúveis foi validado com r=0.91 SEP=0.31. O modelo de PLS para textura foi validado com r=0.84 e SEP=9.05N utilizando as medidas de MIR. As predições por PLSR de pectina solúvel em suco de laranja utilizando RMN-DT e MIR obtiveram logo na etapa de calibração baixos coeficientes de correlação de Pearson, (r=0.48 e 0.51) e elevado SEC de 7.63mg/L e 7.49mg/L, respectivamente. Desta forma, não pode ser feitas validação externa dos dados. Por outro lado, as diferentes concentrações de pectina cítrica comercial isolada medidas pelos mesmo métodos de RMN-DT e MIR, apresentaram espectros bastante distintos, permitindo distinguir as amostras analisadas. As soluções de pectina cítrica isolada medidas por MIR apresentaram alta correlação (r=0.97 e 0.98) entre os espectros e as absorbâncias dos grupos funcionais ácido carboxílico e carbonila, respectivamente. Ainda, conforme a redução da concentração de pectina cítrica isolada foram observados decaimentos de RMN-DT mais longos e vice-versa. **Conclusão:** As metodologias não destrutivas utilizadas no estudo apresentaram grande potencial na avaliação de parâmetros de qualidade tanto em frutas intactas quanto no suco, necessitando assim de maiores estudos para viabilização em grande escala destas novas tecnologias.

Palavras-chave: Análise não destrutiva. Qualidade. Laranja. Suco. Análise multivariada.

Abstract

Objective: Evaluate the use of non invasive and non destructive methods of nuclear magnetic resonance downfield (RMN-DT) spectroscopy and near and mid-infrared (NIR) and (MIR) associated with multivariate analysis for the determination of parameters related to the quality of oranges and juice. **Methods:** The internal and external validation of models were built with oranges cultivar "Valencia" harvested in 2015 and 2016 in two separate flowerings four maturity stages and four different crops. non-destructive NMR analyzes were performed, followed NIR and MIR destructive measurements of texture, peel thickness and total pectin to build prediction models using the orange intact. For fruit mass of the prediction weight of the peel, juice mass is used to measure NMR DT intact fruit and prediction of viscosity, soluble solids, pH of the juice was used to measure NMR DT and NIR extracted juice each orange. In the latest study we used the juice measurements of NMR and MIR-DT for quantification of water-soluble pectin. The results were submitted to principal component analysis (PCA) to better display the characteristics of each harvest and flowering and models were developed using regression by partial least squares (PLS). It evaluated the performance of the models based on the values of the standard prediction error (SEP) and Pearson prediction coefficient (r). **Results:** The models validated for predicting developed by NMR-PLS were: peel thickness r = 0.72 SEP = 0.49cm; total pectin r = 0.76 SEP = 5.76; fruit mass r = 0.96 SEP = 13.84g; peel mass r = 0.96 SEP = 7.25g; juice mass r = 0.92 SEP = 9.75g and pH r = 0.83 SEP = 0.14. The results of validated NIR-PLS models were: texture r = 0.92 SEP = 6.22N; total pectin r = 0.7 SEP = 5.04 and to model the juice to measure soluble solids has been validated with r = 0.91 SEP = 0.31. The model MIR-PLS for texture was validated with r = 0.84 and SEP = 9.05N. Predictions by PLSR of pectin soluble orange juice using NMR-DT and MIR obtained soon the calibration stage low Pearson correlation coefficient (r = 0.48 and 0.51) and high SEC of 7.63mg/L and 7.49mg/L, respectively .Thus, it cannot be done outside validation. In the other hand, different concentrations of commercial isolated citrus pectin measured by the same methods DT-NMR and MIR spectra showed very different allowing to distinguish the samples. The citrus pectin solutions isolated measures by MIR showed high correlation (r = 0.97 and 0.98) between the spectra and the absorbance of the functional groups carboxylic acid and carbonyl, respectively. Furthermore, as the reduction of the concentration of citrus pectin alone were observed NMR DT decays longer and vice versa. **Conclusion:** The non-destructive methods used in the study showed great potential in the evaluation of quality parameters both in intact fruit as in juice, thus requiring more studies to feasibility on a large scale of these new technologies.

Key-words: Nondestructive analysis. Quality. Orange. Juice. Multivariate analysis.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATR - Reflectância total atenuada
ºBrix – Unidade do teor de sólidos solúveis
CPMG – sequência de pulsos Carr-Purcel-Meiboom-Gill
FID – Free Induction Decay
MIR - Espectroscopia de infravermelho médio
N - Universo amostral
n Cal – Universo amostral da calibração
n Val – Universo amostral da validação
NIR – Espectroscopia de infravermelho próximo
PCA – Análise de componentes principais
PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais
PRESS – Resíduo da previsão
r – Coeficiente de correlação de Pearson
r Cal – Coeficiente de correlação de Pearson para calibração
r Val – Coeficiente de correlação de Pearson para validação
RMN - Ressonância magnética nuclear
SEC – Erro padrão da calibração
SEP – Erro padrão da predição
SEV – Erro padrão da validação
SNV – Variação normal padrão
SST – Sólidos solúveis totais

Lista de Tabelas

Capítulo 1. Página

Table 1. Physicochemical characterization of oranges according to their flowering and harvest time. 33
Table 2. Partial least squares regression for calibration models using time-domain nuclear magnetic resonance data. 36
Table 3. External validation of the partial least squares regression models based upon time-domain nuclear magnetic resonance data. 36
Table 4. Partial least squares regression for calibration models adjusted to near-infrared data. 37
Table 5. External validation of partial least squares regression models using near-infrared data. 38
Table 6. Partial least squares regression for calibration models using mid-infrared data. 39
Table 7. External validation partial least squares regression models using mid-infrared data. 39

Capítulo 2.

Tabela 1. Análises de referência laranjas da cultivar Valência. 55
Tabela 2. Desempenho do conjunto de calibração em modelos de PLS-RMN para parâmetros físico-químicos do suco de laranja. 56
Tabela 3. Desempenho de modelos PLS-RMN em conjunto de validação externa. 56
Tabela 4. Desempenho do conjunto de calibração em modelos de PLS-NIR para parâmetros físico-químicos do suco de laranja. 59
Tabela 5. Desempenho da validação externa dos modelos de PLS-NIR. 59

Capítulo 3.

Tabela 1. Desempenho do conjunto de calibração em modelos de PLSR desenvolvidos por RMN-DT e MIR para o conteúdo de pectina solúvel em suco de laranja. 76
Tabela 2. Correlação entre concentrações de pectina cítrica e T_2. 79
Tabela 3. Relação entre concentração de pectina cítrica comercial e absorbância do Ácido Carboxílico e Carbonila. 81

Lista de Figuras

Capítulo 1. Página

Figure 1. Scores of principal components 1 (PC 1) and 2 (PC 2), as obtained through principal component analysis based upon the physicochemical data of the first (■) and fourth (○) flowerings. 31

Figure 2. Principal component analysis loadings of the physic and chemical data of the first and fourth flowerings (Figure 1). 32

Figure3. Scores of principal components 1 (PC 1) and 2 (PC 2), as obtained through principal component analysis based upon the physicochemical data of harvests 1 (■), 2 (○),and 3(◊). 32

Figure4. Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) decays of two oranges with different firmness, peel thickness, and total pectin content. 33

Figure 5. Near-infrared spectra of two oranges with different firmness, peel thickness, and total pectin content. 34

Figure 6. Mid-infrared spectra of two orange fruits featuring different firmness. 35

Capítulo 2.

Figura 1. Correlação entre pH com os tempos de relaxação $T_{2.}$ 58

Capítulo 3.

Figura 1. Decaimentos de RMN-DT de sucos de laranja obtidos por CPMG. 74

Figura 2. Espectros de suco de laranja obtidos por infravermelho médio. 75

Figura 3. Decaimentos de RMN-DT de sucos de laranja com valores extremos e médios de pectina solúvel. 77

Figura 4. Perfil espectral obtido por MIR de sucos de laranja com valores extremos e médios de pectina solúvel. 77

Figura 5. Decaimentos RMN-DT para diferentes concentrações de pectina cítrica. 79

Figura 6. Espectro de MIR para diferentes concentrações de pectina cítrica. 80

Sumário

	Página
Introdução	15
Capítulo 1. Non-invasive spectroscopic methods to estimate orange firmness, peel thickness and total pectin content.	24
Abstract	25
Introduction	26
Materials and methods	27
Results and discussion	30
Conclusion	41
References	41
Capítulo 2. Determinação de propriedades físico-químicas de laranja e suco por meio de espectroscopia de RMN-DT e NIR.	46
Resumo	47
Abstract	48
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados e discussão	54
Conclusão	60
Referências	62
Capítulo 3. Determinação do conteúdo de pectina solúvel em água em suco de laranja por métodos não destrutivos.	66
Resumo	67
Abstract	68
Introdução	69
Material e Métodos	71
Resultados e discussão	74
Conclusão	81
Referências	81
Considerações Finais	87
Referências	89

Introdução

A economia brasileira atualmente apresenta como um de seus principais segmentos a agroindústria, com importância tanto no abastecimento interno quanto no desempenho exportador. A agropecuária obteve um aumento de 23% em sua participação no Produto Interno Bruto no ano de 2015 (PIB) (1). Este crescimento deste setor deve-se principalmente ao desempenho da agricultura (1).

O Brasil está entre os líderes de produção de frutas do mundo, sendo superado apenas por China e Índia (2). Na produção de laranjas é o principal produtor com 17,5 milhões de toneladas em 2013 que respondeu por 42,0% das colheitas totais da fruticultura (1).

Do ponto de vista do mercado, o cenário atual demonstra uma perspectiva animadora de crescimento da demanda por frutas nos mercados interno e externo. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2), estima-seque tanto o consumo mundial per capita de frutas quanto o consumo brasileiro continuará crescendo nos próximos anos a taxas superiores à da economia mundial e doméstica.

Tendo em vista a competitividade do mercado internacional, a qualidade da fruta é um dos principais fatores que determinam o seu valor de comercialização. Neste contexto matérias pécticas são importantes atributos para qualidade da de frutas, pois estão relacionadas à firmeza e rendimento do suco, além de possuírem alto valor comercial ao serem vendidas como subprodutos, pois apresentam diversas aplicações na indústria de alimentos. Em suco de frutas cítricas as pectinas são

importantes atributos para a indústria processadora pois conferem estabilidade ao suco (3).

A pectina é um homo polissacarídeo constituinte da lamela média das paredes celulares de plantas dicotiledôneas, responsável pela resistência mecânica da parede celular. Também encontra-se nas paredes celulares primárias, por isso constitui parte substancial das matérias estruturais dos tecidos brancos, como por exemplo, o parênquima das frutas e raízes carnosas (4).

Abrange o grupo das pectinas, a protopectina, os ácidos pécticos e os ácidos pectínicos (5). Sendo a protopectina insolúvel em água e presente nos vegetais e frutas verdes, conferindo à mesma textura compacta. Em presença de ácidos diluídos, a protopectina pode ser hidrolizada e liberar pectina (4,6). Os ácidos pectínicos são substâncias coloidais, constituídas por ácidos poligalacturônico parcialmente metoxilados ou não e não necessariamente solúveis em água. Enquanto que os ácidos poligalacturônicos são cadeias de ácidos D-galacturônicos, livres de metoxilas, formado em água soluções coloidais (7).

As moléculas de pectina são constituídas de uma cadeia principal linear com cerca de 150-500 unidades de ácido galacturônico (peso molecular 30.000 –100.000 daltons) parcialmente esterificados com grupos metoxílicos, unidos por ligações glicosídicas α- 1,4. Também podem estar presentes na molécula de pectina alguns açúcares neutros como galactose, glicose, ramnose, arabinose e xilose, inseridos na cadeia principal ou ligados como cadeias laterais (7).

Devido à presença de grupos polares, a pectina possui caráter hidrofílico, produzindo assim uma solução viscosa, o que caracteriza a pectina em um coloide por excelência (5). Em função dessa capacidade coloidal, a pectina na indústria de alimentos é amplamente utilizada no preparo de geleias, doces de frutas, produtos de confeitaria e sucos de frutas, entre outros (5).

Algumas alterações bioquímicas e químicas ocorridas na molécula de pectina resultam em alterações na textura da polpa do fruto (8). E também encontram-se relacionadas a outros parâmetros de qualidade em frutas cítricas e no suco, como o peso da fruta, rendimento, viscosidade, e SST do suco.

A taxa de perda de turbidez é um importante para determinação da estabilidade de emulsões, como por exemplo, no suco de laranja. De forma geral, quanto mais baixa a taxa de perda de turbidez, maior é a capacidade da emulsão em manter sua estabilidade e nebulosidade (9). O efeito de diferentes concentrações de hidrocoloides como a pectina sobre a estabilidade física, taxa de perda de turbidez, nebulosidade em bebidas à base de laranja indicando a importância da pectina como um parâmetro de qualidade (10).

Portanto, durante o processamento do suco de laranja processos de inativação de enzimas que degradam pectina bem como, homogeneização e centrifugação do suco tem a finalidade de evitar a degradação da pectina, e evitar a perda de nebulosidade no produto final (11).

A determinação de propriedades de qualidade de laranjas e suco são realizadas atualmente por meio de métodos físico-químicos que são destrutivos e permitem somente a análise de um número representativo de frutos e quantidade de suco. Neste contexto, métodos não destrutivos apresentam uma alternativa para controle de qualidade.

Métodos não invasivos, que não exijam prévia preparação da amostra apresentam uma eficiente alternativa para controle de qualidade de alimentos. Como exemplo a ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN-DT) é capaz identificar danos internos nos frutos com base em mudanças nos valores do tempo de relaxação T_2 (12). Outra metodologia não invasiva que vem sendo aplicada é espectroscopia de infravermelho e Raman com transformada de Fourier para análise de pectinas (13).

A RMN é observada quando certos núcleos atômicos que possuem momento angular ou spin (L) e momento magnético μ, são submetidos à um campo magnético estático, denominado B_0 e à um campo magnético oscilante, denominado de B_1 (14). O B_0 faz com que μ precessione com uma frequência angular denominada frequência de Larmor (15).

Para a obtenção do sinal de RMN, o campo B_1, na frequência de Larmor faz com quem magnetização se desloque por angulo proporcional à duração do pulso e à intensidade do campo B_1 (15).

Após o pulso, a magnetização volta a precessionar em torno de B_0 e induz o sinal de RMN na bobina da sonda, denominado de decaimento livre da indução, FID (16). Após o pulso, o FID passa por dois processos de relaxação distintos: a relaxação longitudinal (T_1), que está envolvida no

retorno da magnetização ao equilíbrio térmico; e a relaxação transversal (T_2), que está relacionada com o desaparecimento do sinal (17).

O mecanismo de relaxação longitudinal, spin-rede ou T_1, está relacionado ao retorno da magnetização ao estado de equilíbrio térmico.

O tempo de relaxação transversal, spin-spin ou T_2 está relacionado à perda de coerência da magnetização após o pulso (16). Essa perda de coerência é atribuída às interações diretas entre os momentos magnéticos individuais dos spins em uma amostra. Ela é maior em moléculas com alta mobilidade e decresce com a redução da mobilidade molecular. A sequência usada para medir T_2, desenvolvida por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) consiste de um trem de pulsos de 180º, separados por um tempo 2τ, precedido de um pulso de 90º inicial separado por τ (18). O T_2 é utilizado para medida da qualidade de alimentos por RMN de baixo campo.

A espectroscopia na região do infravermelho é baseada no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Nesta espectroscopia determina se os níveis de energia entre transições de espécies atômicas e moleculares em nível vibracional e rotacional. Segundo Perkin (2007), no caso da espectroscopia na região do infravermelho a interação se dá por meio dos movimentos relativos dos átomos numa molécula, ou seja, de suas vibrações e rotações.

O espectro do infravermelho é dividido em radiação no infravermelho próximo (NIR), médio (MIR), e distante (FAR), sendo a maioria das aplicações relacionadas à identificação de compostos orgânicos, pois nessa

região ocorrem essencialmente transições fundamentais e existe uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital (1200 a 700 cm^{-1}).

Nesta região, as mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção são consequências de pequenas diferenças na estrutura e na constituição de uma molécula. Assim, a semelhança estreita entre dois espectros nesta região, bem como nas outras, representa forte evidência da identidade dos compostos que produziram o espectro. Desta forma, é possível analisar medidas de amostras em todos os estados e formas como gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários, assim como também amostras semisólidas, pastas, géis e outras, nas regiões do Infravermelho.

NIR avalia os componentes químicos com base em sobretons (*Overtone*) e na combinação de bandas específicas de grupos funcionais (19). E o MIR em particular possui bandas específicas sendo bastante sensível à composição química das amostras (20).

Entretanto, na obtenção de informações qualitativas e quantitativas a partir dos complexos espectros vibracionais, por se tratarem de dados multivariados, é imprescindível a utilização de métodos quimiométricos, assim como na análise de dados de RMN-DT. Estes métodos são desenvolvidos e disponibilizados em programas computacionais, e são responsáveis pela popularização do uso da espectroscopia vibracional, juntamente com os avanços tecnológicos dos instrumentos.

A quimiometria ou análise multivariada relaciona medidas instrumentais à composição química de uma substância e assim deduz o

valor de uma propriedade de interesse por meio de alguma relação matemática.

Análises quantitativas como, por exemplo, titulação, precipitação e reações específicas, são demoradas e muitas vezes pouco precisas, por isso, estão cada vez mais sendo substituídas por técnicas instrumentais, como: Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia no visível/ultravioleta, Espectroscopia de Massa, Cromatografia, Análise de Injeção em Fluxo, etc., que avaliam a velocidade de análise com uma boa qualidade de resultados. Entretanto, nessas técnicas instrumentais não são obtidas as informações diretas do resultado, mas sim uma grande quantidade de sinais (curvas, picos) que podem ser tratados para uma possível quantificação das várias espécies presentes.

Para facilitar a interpretação de informações extraídas de matrizes complexas, a quimiometria visa tratar dados de caráter multivariado retirando o máximo de informações. Sendo dividida em algumas áreas conforme o objetivo do estudo, como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, calibração multivariada, seleção de variáveis, reconhecimento de padrões e classificação de dados, monitoramento e modelagem de processos multivariados, dentre outras. Onde a principal linha de pesquisa da quimiometria aplicada à química analítica é percebida na construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados por meio de um vetor para cada amostra (21).

Em relação ao infravermelho próximo, a região espectral compreendida no intervalo de 770 a 3000 nm, as ligações C-H, O-H e N-H apresentam comprimentos de onda de absorção característicos. Assim muitas vezes ocorre a sobreposição destas absorções, pois não serem muito fortes (22). Como consequência, há necessidade da aplicação de métodos de calibração multivariada para as determinações quantitativas. Neste mesmo contexto, métodos como, Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês “Principal Component Analysis”) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês “Partial Least Square”), são ferramentas quimiométricas bastante utilizadas, as quais visam separar as informações, reduzindo as dimensões dos dados (23).

Em relação ao PCA, este método explica a variação máxima das variáveis estudadas com base nos componentes principais (PCs), as quais correspondem a um conjunto de variáveis não corrigidas (24–26). Desta forma, armazenando a variação máxima de PCs, este método também reduz a dimensão dos dados originais (27,28).

Por outro lado, o PLS é o método de regressão mais utilizado a partir de dados de primeira ordem para a construção de modelos de calibração multivariada. Na fase de calibração o PLS utiliza as informações espectrais e as informações das concentrações ao mesmo tempo.

Assim como o PCR (PCR, do inglês "Principal Component Regression") o PLS não necessita do conhecimento exato de todos os componentes constituintes da amostra, permitindo realizar a previsão de

amostras mesmo na presença de interferentes, devendo estes estarem também presentes por ocasião na construção do modelo (29).

Desta forma o objetivo do trabalho foi utilizar as técnicas espectrais de RMN-DT, infravermelho médio e próximo para quantificação de pectina total em laranjas intactas. Assim como utilizar as mesmas metodologias não destrutivas para determinação de parâmetros relacionados ao teor de pectina total da fruta, como textura, espessura da casca, massa da fruta, massa da casca, massa de suco, rendimento, viscosidade, sólidos solúveis e pH. Também foram utilizadas as mesmas metodologias não destrutivas para predição de pectina solúvel em suco de laranja.

Capítulo 1.

Non-invasive spectroscopic methods to estimate orange firmness, peel thickness and total pectin content

Artigo enviado para publicação em setembro de 2016 para a revista Microchemical Journal ISSN: 0026-265X

Non-invasive spectroscopic methods to estimate orange firmness, peel thickness, and total pectin content.

Marilia Bizzani[a], Douglas William Menezes Flores[b], Luiz Alberto Colnago[c], Marcos David Ferreira[c]

[a] Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" -UNESP, Rodovia Araraquara – Jaú, Km 1, Araraquara-SP, 14801-902, Brasil.
[b] Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição- LAN, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Avenida Pádua Dias, 11, Piracicaba-SP, 13418-900, Brasil.
[c] Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, São Carlos-SP, 13561-206, Brasil.

ABSTRACT

Partial least square regression (PLSR) models of time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) relaxometry as well as near- (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic data were used to predict firmness, peel thickness, and total pectin content of fresh Valencia oranges. Data obtained through standard destructive methods were used to calibrate and validate the PLSR models. NIR and MIR showed the best PLSR models for orange firmness, with Pearson correlation coefficients (r) of 0.92 and 0.84 and squared errors of prediction (SEP) equal to 6.22 and 9.05N, respectively. Orange peel thickness PLSR model was validated only by TD-NMR (r=0.72; SEP=0.49mm). TD-NMR and NIR also presented potential to predict total pectin in orange (r=0.76 and 0.70; SEP=5.76 and 5.04, respectively). Therefore, NIR presented a higher potential to predict orange firmness than MIR and TD-NMR. On the other hand, TD-NMR showed a higher prediction power concerning peel thickness than NIR and MIR. Both NIR and TD-NMR methods showed similar prediction powers for total pectin content.

Keywords: TD-NMR, NIR, MIR, orange, PLSR, quality.

1. Introduction

Both for industry processing and for fresh market purposes, citrus fruits must be harvested taking into account their physiological maturity, since ripening is brought to an end when they are separated from the tree [1]. However, many physical and chemical changes may take place throughout fruit storage, leading to decreased fruit quality [2][3]. Fruit firmness has been used as a useful indicator of quality decay in fruits [4–6]. Therefore, numerous studies have been performed in order to find the postharvest effects on orange firmness [7,8]. Orange firmness is associated to its ripening stage, total pectin content, and peel thickness. Firmness has been determined by total pectin content, peel thickness, and compression [9], the latter implying fruit destruction.

Pectin is a polysaccharide composed of partially methyl esterified α1-4 D-galacturonic acid and that can be found in orange peel and juice. Pectins comprising more than 50% of methyl ester groups have been classified as high-methoxyl (HM) pectin, where aslow-methoxyl (LM) pectin are those having less than 50% of methyl ester groups. This classification may be used to determine pectin quality and suitable destination. In addition, pectin content may change during ripening and storage [10][11][12][13][14]. The standard pectin quantification method is a destructive, laborious, and time-consuming process that generates high volumes of chemical residues [15]. Therefore, a fast, simple, and non-invasive method to measure orange firmness, peel thickness, and total pectin content may represent an efficient alternative to evaluate these quality attributes.

Non-invasive methods, such as time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) as well as near-(NIR), and mid-infrared (MIR) spectroscopies have been used to classify and determine quality parameters in intact fresh fruits[16][17][18–24]. NIR is a simple, low-cost method with potential for fresh fruit analysis, although it requires proper calibration and regression models. NIR has been used to quantify pectins and their constituents in Japanese pear [25] as well as firmness in mangoes [26]. MIR spectroscopy has been applied to determine sugar, organic acid, and polyphenol contents in apricot and apples [27][28]. NIR radiation has penetrates more than MIR and has been more suitable for analyses of both the bulk and intact samples [29]. However, the evaluation of orange soluble solid content using visible-

shortwave near infrared (VIS–SWNIR) spectroscopy has been demonstrated that fruit peel can be a removed or use transmittance modes to obtain better results [30]. In addition, the prediction models for apple firmness based on NIR were significantly influenced by peel [31]. However, the peel interference should be taken into account in different ways due to the limitation related to light penetration [30]. Peel might also be removed to improve prediction effectiveness, but this would not enable a non-invasive approach as well. Hence, citrus peel thickness can be a challenge for infrared spectroscopic analyses due to its composition that significantly absorbs light. However, such absorption can be correlated with important quality attributes, including firmness, peel thickness, and total pectin content [30]. TD-NMR relaxometry based on ^{1}H transverse relaxation time (T_2) can be applied to sample that have not been prepared and/or that present light diffusion hurdles, for which neither NIR nor MIR would be suitable. Thus, TD-NMR has been demonstrated as an interesting tool to classify oranges and plums in terms of their sensory attributes (*e.g.*, sweetness in fresh fruits)[16][32]. Changes in T_2 values could be associated with different water compartments on injured apples, indicating the potential of this technique for identifying internal fruit damage [33].

Given the above, the main goal of this work was to evaluate the prediction power of TD-NMR, NIR and MIR techniques associated with multivariate analyses to estimate, by a non-invasively fashion, orange firmness, peel thickness and total pectin content.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Valencia oranges (450 units) were harvested at the beginning, middle and end of the 2015 crop season at commercial farms located in São Paulo state, Brazil. In each harvest, fruits from the first and fourth flowering stages were collected.

2.2. Fruit characterization

Twenty fruits from each flowering stage and each harvest were characterized as to (1) peel color, in a Konica Minolta Sensing colorimeter (Tokyo, Japan) that expressed the results in L (lightness), a*,b*, Hue angle (tan-1= b*/a*), and

chromaticity $\sqrt{a^2 + b^2}$ values in the CIE Lab scale; (2) equatorial fruit diameter, which was measured with a manual caliper and expressed in millimeters; (3) total soluble solids (TSS), determined in the fresh juice with a refractometer (Atago Co, Brix-Meter, Tokyo) and expressed as ºBrix; and (4) pH, which was measured in the PHS-3B pH meter in 20 ml of juice. All samples were analyzed in triplicate.

2.3. TD-NMR measurements

Intact oranges were analyzed in a SLK-MRI-1400 spectrometer (Spinlock Magnetic Resonance Solution, Cordoba, Argentina) equipped with a 0.23-T (9 MHz for ^{1}H) Halbach permanent magnet and a 10-cm-diameter bore. Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence [34] was used for ^{1}H transverse relaxation time measurement (T_2), with 90^o and 180^o pulses of 32 and 64μ, echo time (τ) of 500μs, 1500 echoes, 8 scans, and a recycle time of 5s.

2.4. Infrared spectra acquisition

The NIR spectras were acquired in reflectance mode with a resolution of 16 cm^{-1} in a Spectrum 100N spectrometer (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT, USA). The MIR spectras were acquired in aCary 630 spectrometer (Agilent, Walnut Creek, CA, USA) equipped with an ATR accessory for acquiring data from 4000-700 cm^{-1}. In order to improve the signal-to-noise ratio, a resolution of 4cm^{-1} and 64 scans was used. The NIR and MIR measurements were performed at three spots within the equatorial region of the same fruit.

2.5. Reference analyses

2.5.1. Fruit firmness

Orange firmness was measured using a texture analyzer (XT-Plus, Stable Microsystems). The analyses were performed using a 4-mm-diameter cylindrical probe, at a speed of 5 mm s² and a compression depth of 18 mm. The maximum force (N) was recorded and as attributed to fruit firmness. The measurements were performed at the same equatorial region that had been used in NIR and MIR measurements.

2.5.2. Peel thickness

Peel thickness was measured at the aforementioned equatorial regions(*i.e.*, used in NIR and MIR measurements) of the sliced fruits, using a Mitutoyo manual caliper, model 500-197-30B, and expressed as millimeters [35].

2.5.3. Total pectin content

The total pectin content was measured in accordance with the method proposed by McCready and McComb (1952). One gram of fresh orange peel previously crushed and homogenized with 25 ml of ethyl alcohol 95% was stored under refrigerator for 30 minutes. Then, the samples were filtered to remove soluble sugars. The filter residue was washed twice with approximately 10 ml of ethanol 75%, transferred to Erlenmeyer containing 50ml of Versene solution and having pH adjusted to 11.5. The samples were stored under refrigerator for another 30 minutes before the pH was adjusted to 5-5.05. Once pH was corrected, 100mg of pectinase enzyme was added to the solution, which was stirred for 1h. Finally, samples were filtered and the volume was adjusted to 100 ml with the Versene solution. The filtrate was used to quantify the galacturonic acid content using the m-hydroxydiphenyl method [36]. Results were expressed as percentage of total pectin.

2.6. Data analysis

Origin8.1 (Origin Lab, Northampton, MA, USA) and Pirouette v. 4.5 (Infometrix, Inc. Bothell -WA) softwares were used for data processing. The average of triplicates was considered. The independent data (X) matrix was composed of instrumental data individually acquired for each instrument (TD-NMR, MIR, and NIR). Also, the dependent (Y) data matrix was contained the reference analysis. Matrices X and Y were mean-centered.

Principal component analysis (PCA) was used to reduce dimensionality of the X data.PCA was also applied to explain the correlations of ripening stage, flowering, and harvest seasons of orange fruits with their physicochemical parameters.

TD-NMR data were pre-processed through normalization by max (0-1) and then smothered by a second-order polynomial Savitzky-Golay algorithm with a 65-point window to improve the mathematical regression by reducing eventual noise.

NIR data were pre-processed by means of a standard normal variation (SNV), where as MIR data were normalized by max (0-1) followed by second derivative of a second-order polynomial with a 35-point window.

Signal-free MIR spectra regions (*i.e.*, from 4000 to 3750 $cm^{-1}$and between 2750 and 1780cm^{-1}) were not used in the models. Also, the first ten variables and variables after 1s of TD-NMR decay were excluded due to random instrumentation errors and noise, respectively.

The PLSR models for total pectin content considered 125 reference measurements and their respective spectral data. The PLSR model for firmness and peel thickness was built with standard and spectral data from 110 oranges. Calibration and external validation models were developed using 70% and 30% of the data, respectively. Calibration models were cross-validated by leave-one-out algorithm on the calibration set. Pearson correlation coefficient (r) and squared error of prediction (SEP) were used to evaluate the model performance on the prediction set (30% of the samples).

3. Results and discussion

3.1. PCA analysis

Table 1 shows the average values and standard deviations of physical and chemical data (diameter, color, TSS content, and pH) of the studied oranges, according to the first and fourth flowerings and harvest time.

Figures 1 and 2 present the score and loading plots using principal components 1 (PC1) and 2 (PC2) for oranges harvested in the first and fourth flowerings, with regard to the physicochemical data. Figure1 shows a very good separation between the two flowering stages. The PCA of the first and fourth flowerings showed69.2 and 13.3% of variance in PC1 and PC2, respectively. This discrimination was more influenced by PC1 due to the effects that Hue, diameter, pH, Chroma, L and TSS of flowerings played on PC weights, locating samples having low values on the left side of PC1 and those with high values on the right (Figure 2).

On the other hand, no significant differences were observed among the studied harvest times (beginning, middle, and end of crop season)(Figure3). This agreed well with the results shown in Table 1, assimilar ripening characteristics were obtained for all harvests, which in turn indicates a good variation distribution of harvest sampling.

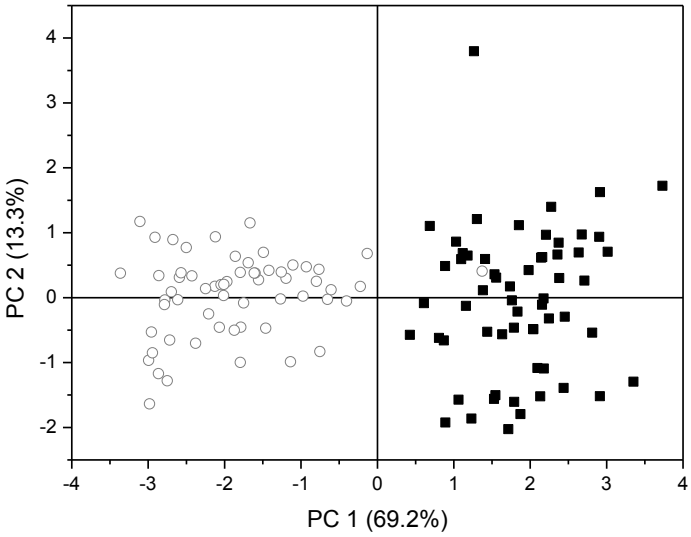


Figure 1. Scores of principal components 1 (PC 1) and 2 (PC 2), as obtained through principal component analysis based upon the physicochemical data of the first (■) and fourth (○) flowerings.

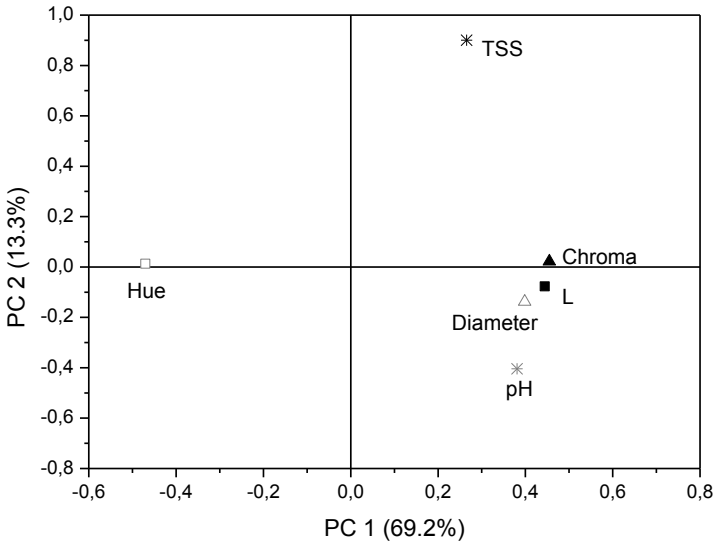


Figure 2. Principal component analysis loadings of the physic and chemical data of the first and fourth flowerings (Figure 1).

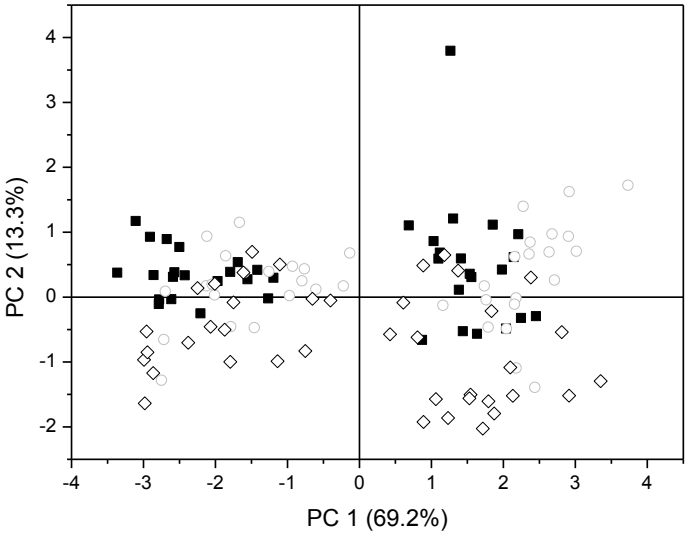


Figure3. Scores of principal components 1 (PC 1) and 2 (PC 2), as obtained through principal component analysis based upon the physicochemical data of harvests 1 (■), 2 (○) and 3(◊).

Table 1. Physicochemical characterization of oranges according to their flowering and harvest time.

	Harvest1		Harvest 2		Harvest 3	
Analysis/Flowering	1º	4º	1º	4º	1º	4º
Diameter (mm)	108.60±34.10	63.55±0.63	75.59±0.66	70.49±0.71	75.85±0.81	64.95±0.63
L	62.73±0.71	52.32±1.01	64.59±0.50	50.07±0.95	62.64±1.19	53.43±1.41
Hue	95.95±0.84	115.47±0.70	91.33±0.69	116.58±0.80	96.85±1.29	114.33±1.71
Chroma	58.72±1.15	41.31±0.90	59.79±0.86	39.18±1.01	53.43±1.48	42.20±1.57
TSS(ºBrix)	9.13±0.20	8.061±0.07	9.36±0.17	8.49±0.13	8.28±0.17	7.81±0.15
pH	3.32±0.02	2.84±0.01	3.59±0.02	3.23±0.03	3.78±003	3.18±0.03

Legend: 1º: first flowering; 4º: fourth flowering; L (Lightness); Hue (hue angle); Chroma (chromaticity); TSS (Total soluble solids, expressed as ºBrix); pH (hydrogenionic potencial).

3.2. Qualitative analyses using TD-NMR, NIR, and MIR spectra

Figure 4 shows TD-NMR signals obtained with CPMG sequence of two oranges with peel thicknesses of 3.37 (sample A) and 5.73mm (sample B). The same oranges revealed total pectin contents in peel equal to 32.62% and 44.14% as well as firmness of 35.20 (sample A) and 41.40N (sample B), respectively.

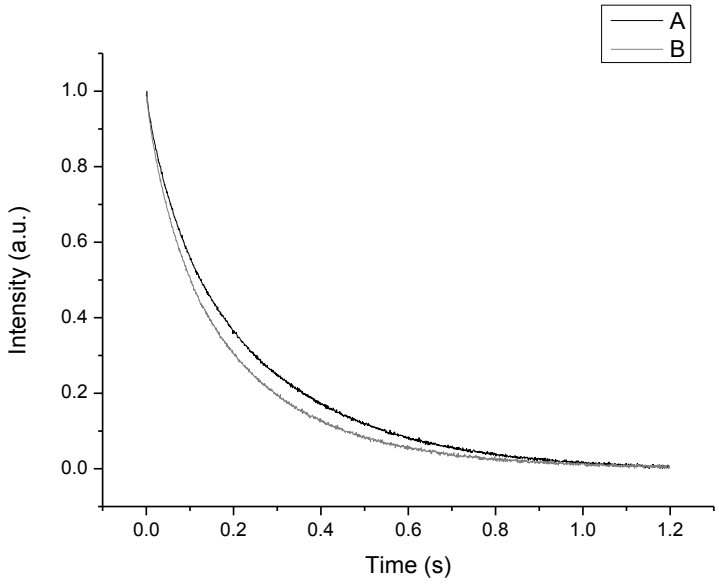


Figure4. Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) decays of two oranges with different firmness, peel thickness, and total pectin content.

Figure 5 shows NIR spectra of the same samples addressed in Figure 4. NIR spectrum A showed stronger O-H stretching peaks at 4545-5000 and 7143-6250cm^{-1}, which have been associated with the presence of water within the fruit. The peaks at 9000 and 8000cm^{-1} have been attributed to C-H stretching of polysaccharides and essential oils that were present in orange peel.

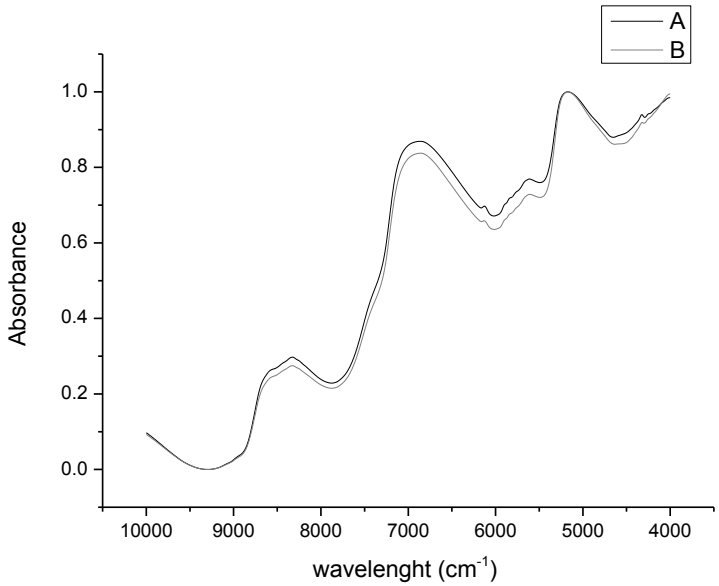


Figure. 5. Near-infrared spectra of two oranges with different firmness, peel thickness, and total pectin content.

Figure 6 shows MIR spectra of the same orange fruits shown in Figures 4 and 5. Such spectra showed the characteristic absorption of water O-H groups between 3500 and 3073cm^{-1}. The strong peaks from 3000 to 2800 cm^{-1} have been assigned to C-H bonds among organic compounds. The absorption peaks between 1790 and 1706cm^{-1} are related to C=O groups, whereas those at 1000-1200cm^{-1} are attributed to C-O groups. These peaks have been associated with polysaccharides and essential oils [37].

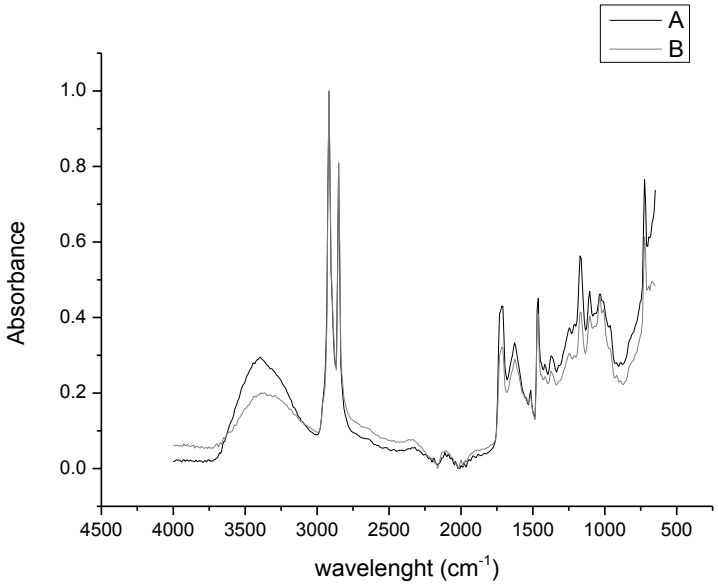


Figure 6. Mid-infrared spectra of two orange fruits featuring different firmness.

Therefore, by analyzing Figures 4,5, and 6 we may observe that all three methods were shown to potentially detect orange firmness, peel thickness, and total pectin content in a non-invasively fashion. These potentials were quantitatively evaluated using PLSR regression models.

3.3. TD-NMR PLSR models

TD-NMR data collected with CPMG pulse sequence are related to transverse relaxation time of water entrapped in oranges, which depends on their TSS content as well as on the pH of the their juices. Table 2 presents the calibration and internal validation PLSR models for firmness, peel thickness, and total pectin content using TD-NMR data. Both firmness and peel thickness calibration PLSR models were obtained using 734 variables of the original 1500. Firmness and peel thickness PLSR models showed the lowest values of squared error of validation (SEV; 8.86N and 0.51mm, respectively) as well as the highest rVal values (0.80 and 0.71, respectively) using 4 factors. Total pectin content PLSR model obtained from TD-NMR data showed the best performance using 1323 variables. Total pectin content results with

5 factors are characterized by the lowest SEV and rVal values (5.13% and 0.76, respectively) in the internal validation (Table 2).

Table 2. Partial least squares regression for calibration models using time-domain nuclear magnetic resonance data.

	SEV	rVal	SEC	rCal	n
Firmness (N)	8.86	0.80	8.09	0.85	75
Peel thickness (mm)	0.51	0.71	0.45	0.78	75
Total pectin content(%)	5.13	0.76	4.72	0.82	78

SEV and SEC = squared errors of validation and calibration, respectively; n = sample universe; rVal and rCal = Pearson correlation coefficients of validation and calibration, respectively.

Table 3 demonstrates the external validation PLSR models as to firmness, peel thickness, and total pectin content using TD-NMR data. Such results evidenced the potential of TD-NMR data in predicting these three physical parameters of Valencia oranges. However, the best prediction power was obtained for peel thickness because of the high r and small SEP.

Table 3. External validation of the partial least squares regression models based upon time-domain nuclear magnetic resonance data.

	SEP	r	n
Firmness (N)	8.27	0.64	31
Peel thickness (mm)	0.49	0.72	31
Total pectin content (%)	5.76	0.76	37

SEP = squared error of prediction; r = Pearson correlation coefficient; n = sample universe for validation.

The correlation coefficients of validation model showed a small decay when compared to the calibration model (Table 2) concerning fruit firmness, peel thickness, and total pectin content. SEV and SEC values were similar for firmness and peel thickness, but SEV was fivefold increased for total pectin content when compared to SEC.

The thickness of Valencia orange peel of internal canopies was significantly higher than those of external fruits. This variation is a result of the mineral nutrition of the tree [38]. During fruit ripening, juice mass increases while peel thickness decreases. Therefore, there is a greater percentage of free water in orange. These

results suggest that the percentage of free water in oranges of different flowerings and harvests denote an important variable to approximate the correlation between TD-NMR and fruit peel thickness, corroborating which has been discuss at the end of item 3.2.

Orange peel thickness variations as induced by fruit ripening stage or tree mineral nutrition were detected using TD-NMR.

According to Table 3, TD-NMR also performed well when predicting orange total pectin content. A paramagnetic ion, such as iron contained in orange juice [38], may have played an important role in achieving this out come because it can reduce water relaxation time in some oxidation states [39]. The production of galacturonic acid (HGal) through pectin hydrolysis throughout ripening may reduce ferric ions to ferrous ions, leading to Fe^{2+} solutions featuring longer water relaxation times than their Fe^{3+} counterparts. Studies suggested that the major mechanism for T_1 and T_2 increased during banana ripening is a reduction of Fe^{3+} ions to Fe^{2+} ions by the galacturonic acid resulting of pectin hydrolysis [39].

3.4. PLS prediction models by NIR

Table 4 shows the PLSR models obtained for firmness, peel thickness, and total pectin content using mean center and SNV NIR data. NIR spectra presented high correlations with firmness and total pectin content (*i.e.*, r= 0.87 and r=0.68, respectively)using 6 and 9 factors respectively, but poor a correlation with peel thickness (*i.e.*, r=0.39) for calibration models with 7 factors (Table 4).

Table 4. Partial least squares regression for calibration models adjusted to near-infrared data.

	SEV	rVal	SEC	rCal	n
Firmness (N)	7.13	0.87	6.41	0.91	73
Peel thickness (mm)	0.63	0.39	0.55	0.62	73
Total pectin content (%)	5.12	0.68	4.48	0.79	80

SEV and SEC = squared errors of validation and calibration, respectively; n = sample universe; rVal and rCal = Pearson correlation coefficients of validation and calibration, respectively.

Table 5 presents external validation PLSR models for firmness and total pectin content. The correlation coefficients increased while the SEP decreased for this parameter, maintaining the validation.

Table 5. External validation of partial least squares regression models using near-infrared data.

	SEP	R	n
Firmness(N)	6.22	0.92	31
Total pectin content (%)	5.04	0.70	37

SEP = squared error of prediction; r = Pearson correlation coefficient; n = sample universe for validation.

The low penetration of NIR in the thick tissues of orange peel, which act as a barrier, may explain the lack of correlation between peel thicknesses and NIR data. Although NIR is not able to determine peel thickness directly, it can provide an indirect measurement of such property, which is associated with fruit firmness [40].

NIR has also been used to predict fruit firmness based on differences among scattering and absorption caused by changes in cell wall composition (*i.e.*, pectin and cellulose) during ripening [41]. Changes like cell collapse or the creation of air-filled pores that occur due to the decrease of moisture content during ripening affect the light scattering in fruit tissues [26], resulting in secondary correlations that improve the prediction performance of NIR as for firmness [42,43]. Using two portable NIR spectrometers (Labspec and Luminar) to predict the quality of intact oranges, were found an accuracy level for flesh firmness of 83.9% and 79%, coefficient of cross validation (Rcv) of 0.72 and 0.66, and root mean square error of prediction (RMSEP) equal to 1.05 and 1.39, respectively [18].

Concerning total pectin content, the absorption of methoxyl groups at 4448.40cm^{-1} that was clearly observed in previous NIR spectra of pectin [44] may explain the total pectin prediction in intact oranges. Good results were also obtained when evaluating pectin constituents in Japanese pear by NIR [25]. In this case, for the intact fruit spectra, the alcohol-insoluble solids in the fresh weight (AIS in the FW) as well as the oxalate-soluble pectin content in the AIS (OSP in the AIS) were accurately predicted (for intact fruit spectra: r= 0.93, SEP = 0.62 for AIS in the FW;R = 0.95, SEP = 8.48 for OSP in the AIS).

3.5. PLS prediction models by MIR

Initially, the data ranging from 4000 to 3030 cm^{-1} and from 2750 to 1780cm^{-1} were not used in PLS-MIR analysis because they did not provide any useful information.

Table 6 shows the PLSR models for firmness, peel thickness, and total pectin content using MIR data. The best results for these attributes were obtained with mean center second derivative. MIR spectra presented a high correlation with firmness (r=0.74)(6 factors) but low correlations with peel thickness (r=0.33) (11 factors) and total pectin content (r=0.57) (6 factors) as for calibration models (Table 6).

Table 6. Partial least squares regression for calibration models using mid-infrared data.

	SEV	rVal	SEC	rCal	n
Firmness(N)	9.13	0.74	7.79	0.84	73
Peel thickness (mm)	0.72	0.33	0.52	0.72	73
Total pectin content (%)	6.11	0.57	5.50	0.69	83

SEV and SEC = squared errors of validation and calibration, respectively; n = sample universe; rVal and rCal = Pearson correlation coefficients of validation and calibration, respectively.

The external validation shows that PLSR models for firmness maintained suitable correlation coefficients SEP values (Table 7).

Table 7. External validation partial least squares regression models using mid-infrared data.

	SEP	R	n
Firmness(N)	9.05	0.84	32

SEP = squared error of prediction; r = Pearson correlation coefficient; n = sample universe for validation.

Carbohydrates show a high absorbance between 1200 and 950 cm^{-1} in the MIR spectra, which is the fingerprint for polysaccharide [45]. Additionally, MIR spectroscopy is sensitive to the functional groups of these polysaccharides, *i.e.*, hydroxyls, carboxyls, esters, and amides [46]. In this sense, it is possible to explain the high correlation between MIR data and firmness in intact orange, despite having

the largest SEP (9.05N), which in turn may have resulted from the lower penetration of MIR radiation. Even if PLSR model for pectin has not been validated, pectin is one of the polysaccharides that are responsible for orange firmness, making MIR analysis a good methodology to investigate polysaccharides.

Change in pectin methyl esterification degree (MED) during fruit ripening [47] stand out as an important parameter to understand some aspects related to the softening process [45]. Pectin MED features differential localization of absorption bands originated by specific vibrational modes of atom groups in galacturonic acid and its methyl ester. Therefore, MIR spectroscopy is a suitable means of characterizing pectins [45]. Pectin MED determination in peaches has been correlated with fruit firmness using MIR data [48].

3.5. Observations concerning TD-NMR, NIR, and MIR methods

In this study, NIR models for firmness (r=0.92 and SEP=6.22N) were better than those based upon TD-NMR data (r=0.64 and SEP=8.27N). MIR was also efficient to predict orange firmness, but showed a lower Pearson correlation coefficient as well as a higher SEP than NIR. Despite the lower resolution of NIR spectrum than that of MIR, the greater NIR penetration allowed better correlations with fruit firmness.

TD-NMR allows one to observe the inner environment of fruits. In this context, sugars are the main responsible for viscosity changes in oranges. In this case, the more remarkable effect of sugars over relaxation times may have affected the correlation between firmness variations and TD-NMR signals.

On the other hand, orange peel thickness is related to sugar content. Thus, it provides indirect information on ripening, provided that fruits tend to have higher sugar contents together with thinner peels [49]. This is a possibility explanation for the correlation between TD-NMR signals and orange peel thickness.

TD-NMR showed a higher prediction power than NIR for total pectin content, as indicated by the higher r. TD-NMR has also advantage over NIR because the measurements are performed in intact fruits whereas NIR measurements require the analyses of three regions within the fruit.

4. Conclusion

The applicability of TD-NMR, NIR, and MIR spectroscopic techniques combined with PLSR was evaluated for the determination of firmness and other properties related to firmness in intact oranges. The calibration and external validation models developed in this work covered different flowerings and harvests of Valencia orange and, hence, a wide composition range.

NIR and MIR spectroscopies were more efficient in determining orange firmness, where as TD-NMR decay presented a better prediction capacity as for peel thickness. The penetration of NIR and MIR radiations as well as typically thick orange peel may have interfered in peel thickness prediction models. The prediction of total pectin content in oranges was carried out through different measurement methods, namely: the intact fruit by TD-MNR as well as specific fruit points by NIR. Regardless of the method, the models were validated for the prediction of total pectin content.

In this work, non-invasive techniques were effectively used to determine properties related to orange quality, which are currently determined by destructive, time-consuming methodologies that involve the use of chemicals. Overall, TD-NMR and NIR PLSR models were more validated compared with MIR model. Nevertheless, all of the non-invasive techniques studied here presented good potential application to determine orange quality attributes, encouraging future studies as well as further exploitation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully thank the Brazilian agencies FAPESP (project grant 13/23479-0), CNPq (project grants 303837-2013-6 and 403075/2013-0), and CAPES for their financial support to this work.

REFERENCES

[1] C.B. Watkins, Postharvest ripening regulation and innovation in storage

technology, in: 2008: pp. 51–58.
[2] Z. Herman, C.H. Fong, S. Hasegawa, Biosynthesis of limonoid glucosides in navel orange, Phytochemistry. 30 (1991) 1487–1488. doi:10.1016/0031-9422(91)84193-V.
[3] R. Storey, M.T. Treeby, Seasonal changes in nutrient concentrations of navel orange fruit, Sci. Hortic. (Amsterdam). 84 (2000) 67–82. doi:10.1016/S0304-4238(99)00093-X.
[4] J.M. Delong, R.K. Prange, P.A. Harrison, K.B. McRae, Comparison of a new apple firmness penetrometer with three standard instruments, Postharvest Biol. Technol. 19 (2000) 201–209. doi:10.1016/S0925-5214(00)00097-1.
[5] K.K. Singh, B.S. Reddy, Post-harvest physico-mechanical properties of orange peel and fruit, J. Food Eng. 73 (2006) 112–120. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.010.
[6] F. Pallottino, C. Costa, P. Menesatti, M. Moresi, Assessment of the mechanical properties of Tarocco orange fruit under parallel plate compression, J. Food Eng. 103 (2011) 308–316. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.10.029.
[7] H.K. M. Mazidi, H. Sadrnia, Evaluation of orange mechanical damage during packaging by study of changes in firmness, 23 (2016) 899–903.
[8] R. Porat, B. Weiss, L. Cohen, A. Daus, R. Goren, S. Droby, Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of "Shamouti" oranges, Postharvest Biol. Technol. 15 (1999) 155–163. doi:10.1016/S0925-5214(98)00079-9.
[9] M. Zude, B. Herold, J.M. Roger, V. Bellon-Maurel, S. Landahl, Non-destructive tests on the prediction of apple fruit flesh firmness and soluble solids content on tree and in shelf life, J. Food Eng. 77 (2006) 254–260. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.06.027.
[10] C. Batisse, M. Buret, P.J. Coulomb, Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 453–457. doi:10.1021/jf950227r.
[11] S. Ketsa, S. Chidtragool, J.D. Klein, S. Lurie, Firmness, pectin components and cell wall hydrolases of mango fruit following low-temperature stress, J. Hortic. Sci. Biotechnol. 74 (1999) 685–689. doi:10.1080/14620316.1999.11511173.
[12] P. Sirisomboon, M. Tanaka, S. Fujita, T. Kojima, Relationship between the texture and pectin constituents of Japanese pear, J. Texture Stud. 31 (2000) 679–690. doi:10.1111/j.1745-4603.2000.tb01028.x.
[13] M.A. Taylor, E. Rabe, G. Jacobs, M.C. Dodd, Effect of harvest maturity on pectic substances, internal conductivity, soluble solids and gel breakdown in cold stored "Songold" plums, Postharvest Biol. Technol. 5 (1995) 285–294. doi:10.1016/0925-5214(94)00040-Y.
[14] L. Yu, C. a. Reitmeier, M.H. Love, Strawberry Texture and Pectin Content as Affected by Electron Beam Irradiation, J. Food Sci. 61 (1996) 844–846. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb12216.x.
[15] R.. McCready, E.. McComb, Extraction and determination of total pectic materials in fruits, Anal. Chem. 24 (1952) 1986–1988. doi:10.1021/ac60072a033.
[16] D.W.M. Flores, L.A. Colnago, M.D. Ferreira, M.H.F. Spoto, Prediction of

Orange juice sensorial attributes from intact fruits by TD-NMR, Microchem. J. 128 (2016) 113–117. doi:10.1016/j.microc.2016.04.009.
[17] F.M.V. Pereira, S. Bertelli Pflanzer, T. Gomig, C. Lugnani Gomes, P.E. De Felício, L. Alberto Colnago, Fast determination of beef quality parameters with time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics, Talanta. 108 (2013) 88–91. doi:10.1016/j.talanta.2013.02.070.
[18] J.A. Cayuela, C. Weiland, Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers, Postharvest Biol. Technol. 58 (2010) 113–120. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.06.001.
[19] R. Karoui, A.M. Mouazen, É. Dufour, L. Pillonel, E. Schaller, D. Picque, J. De Baerdemaeker, J.O. Bosset, A comparison and joint use of NIR and MIR spectroscopic methods for the determination of some parameters in European Emmental cheese, Eur. Food Res. Technol. 223 (2006) 44–50. doi:10.1007/s00217-005-0110-2.
[20] M.M. Paradkar, J. Irudayaraj, Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques : 1 . FTIR spectroscopy, Int. J. Diary Technol. 55 (2002) 127–132.
[21] M.M. Paradkar, J. Irudayaraj, Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques : 1 . FTIR spectroscopy, Int. J. Diary Technol. 55 (2002) 127–132.
[22] L.M. Reid, T. Woodcock, C.P. O'Donnell, J.D. Kelly, G. Downey, Differentiation of apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data, Food Res. Int. 38 (2005) 1109–1115. doi:10.1016/j.foodres.2005.03.005.
[23] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, Analysis of potato chips using FTIR photoacoustic spectroscopy, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 1805–1810. doi:10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1805::AID-JSFA710>3.0.CO;2-L.
[24] M.S.S. Tavakolian, F.A. Silaghi, A. Fabbri, G. Molari, A. Giunchi, A. Guarnieri, Differentiation of post harvest date fruit varieties non-destructively using FT-NIR spectroscopy, Int. J. Food Sci. Technol. 48 (2013) 1282–1288. doi:10.1111/ijfs.12088.
[25] P. Sirisomboon, M. Tanaka, S. Fujita, T. Kojima, Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy, J. Food Eng. 78 (2007) 701–707. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.009.
[26] P. Rungpichayapichet, B. Mahayothee, M. Nagle, P. Khuwijitjaru, J. Müller, Robust NIRS models for non-destructive prediction of postharvest fruit ripeness and quality in mango, Postharvest Biol. Technol. 111 (2016) 31–40. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.07.006.
[27] S. Bureau, D. Ruiz, M. Reich, B. Gouble, D. Bertrand, J.M. Audergon, C.M.G.C. Renard, Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit, Food Chem. 115 (2009) 1133–1140. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.100.
[28] S. Bureau, I. Ścibisz, C. Le Bourvellec, C.M.G.C. Renard, Effect of sample preparation on the measurement of sugars, organic acids, and polyphenols in apple fruit by mid-infrared spectroscopy, J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 3551–3563. doi:10.1021/jf204785w.
[29] G.A. de Oliveira, F. de Castilhos, C.M.G.C. Renard, S. Bureau, Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual

sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit, Food Res. Int. 60 (2014) 154–162. doi:10.1016/j.foodres.2013.10.051.

[30] A. Wang, D. Hu, L. Xie, Comparison of detection modes in terms of the necessity of visible region (VIS) and influence of the peel on soluble solids content (SSC) determination of navel orange using VIS-SWNIR spectroscopy, J. Food Eng. 126 (2014) 126–132. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.11.011.

[31] B. Shi, L. Zhao, H. Wang, W. Liu, D. Zhu, Z. Tu, J. Yin, Study on interference from the peel to predict apple firmness by near infrared spectroscopy, 8 (2010) 128–133. doi:10.1166/s1.2010.1214.

[32] F.M.V. Pereira, A. de S. Carvalho, L.F. Cabeça, L.A. Colnago, Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics, Microchem. J. 108 (2013) 14–17. doi:10.1016/j.microc.2012.12.003.

[33] B.K. Cho, W. Chayaprasert, R.L. Stroshine, Effects of internal browning and watercore on low field (5.4 MHz) proton magnetic resonance measurements of T2 values of whole apples, Postharvest Biol. Technol. 47 (2008) 81–89. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.05.018.

[34] F.D. De Andrade, A.M. Netto, L.A. Colnago, Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles, Talanta. 84 (2011) 84–88. doi:10.1016/j.talanta.2010.12.033.

[35] K.T. Morgan, R.E. Rouse, F.M. Roka, S.H. Futch, M. Zekri, Leaf and Fruit Mineral Content and Peel Thickness of " Hamlin " Orange, Proc. Fla. State Hort. Soc. 118 (2005) 19–21.

[36] T. Bitter, H.M. Muir, A modified uronic acid carbazole reaction., Anal. Biochem. 4 (1962) 330–334. doi:10.1016/0003-2697(62)90095-7.

[37] B.M. Schulz H., Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Fruits and vegetables, 1st ed., Elsevier Inc., 2009. doi:10.1016/B978-0-12-374136-3.00012-2.

[38] M.S. Ladaniya, Fruit Biochemistry, Citrus Fruit Biol. Technol. Eval. (2008) 150, 193–197. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-012374130-1.50008-5.

[39] F.Z. Ribeiro, L.V. Marconcini, I.B. de Toledo, R.B. de Vasconcellos Azeredo, L.L. Barbosa, L.A. Colnago, Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: A new mechanism, J. Sci. Food Agric. 90 (2010) 2052–2057. doi:10.1002/jsfa.4051.

[40] B.M. Nicolaï, K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K.I. Theron, J. Lammertyn, Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review, Postharvest Biol. Technol. 46 (2007) 99–118. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.06.024.

[41] E.D. Louw, K.I. Theron, Robust prediction models for quality parameters in Japanese plums (Prunus salicina L.) using NIR spectroscopy, Postharvest Biol. Technol. 58 (2010) 176–184. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.07.001.

[42] E. Bobelyn, A.S. Serban, M. Nicu, J. Lammertyn, B.M. Nicolai, W. Saeys, Postharvest quality of apple predicted by NIR-spectroscopy: Study of the effect of biological variability on spectra and model performance, Postharvest Biol. Technol. 55 (2010) 133–143. doi:10.1016/j.postharvbio.2009.09.006.

[43] V.A. McGlone, S. Kawano, Firmness, dry-matter and soluble-solids assessment of postharvest kiwifruit by NIR spectroscopy, Postharvest Biol.

Technol. 13 (1998) 131–141. doi:10.1016/S0925-5214(98)00007-6.

[44] C. Boeriu, C.G., Stolle-Smits, T., Van Dijk, Characterisation of cell wall pectins by near infrared spectroscopy, J. Near Infrared Spectrosc. 6 (1998) 299–301. https://www.scopus.com/results/results.uri?sort=plfdt-f&listId=myList&src=s&imp=t&sid=F3DB22752B9B2620835E26293B6710ED.WXhD7YyTQ6A7Pvk9AlA%3a160&sot=ml&sdt=ml&sl=0&origin=mylist&txGid=0.

[45] G.D. Manrique, F.M. Lajolo, FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit, Postharvest Biol. Technol. 25 (2002) 99–107. doi:10.1016/S0925-5214(01)00160-0.

[46] A. Synytsya, J. Čopíková, P. Matějka, V. Machovič, Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins, Carbohydr. Polym. 54 (2003) 97–106. doi:10.1016/S0144-8617(03)00158-9.

[47] I.M. Bartley, M. Knee, The chemistry of textural changes in fruit during storage, Food Chem. 9 (1982) 47–58. doi:10.1016/0308-8146(82)90068-1.

[48] a. . Chatjigakis, C. Pappas, N.Proxenia, O.Kalantzi, P.Rodis, M. Polissiou, FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes, Carbohydr. Polym. 37 (1998) 395–408. doi:10.1016/S0144-8617(98)00057-5.

[49] Carvalo L. M., Lorena moreira carvalho, Universidade Federal de Miçosa, 2010.

Capítulo 2.

Determinação de propriedades físico-químicas de laranja e suco por meio de espectroscopia de RMN-DT e NIR

Determinação de propriedades físico-químicas de laranja e suco por meio de espectroscopia de RMN-DT e NIR

Marilia Bizzani[1]
Douglas William MenezesFlores[2]
Luiz Alberto Colnago[3]
Marcos David Ferreira[3]

[1]Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" -UNESP, Rodovia Araraquara – Jaú, Km 1, Araraquara-SP, 14801-902, Brasil.
[2]Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição- LAN, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Avenida Pádua Dias, 11, Piracicaba-SP, 13418-900, Brasil.
[3]Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, São Carlos-SP, 13561-206, Brasil.

Resumo

Objetivos: Utilizar a técnica de RMN-DT para determinação de parâmetros como massa da fruta, massa da casca, massa de suco e rendimento de suco utilizando a medida da fruta intacta. E também utilizar as medidas de RMN-DT e NIR do suco de laranja para determinação da viscosidade, sólidos solúveis e pH. **Métodos:** Foram coletadas duzentos e cinquenta laranjas, obtidas em cultivos comerciais no interior de São Paulo. As frutas intactas inicialmente foram submetidas à análise não invasiva de RMN-DT, em seguida o suco de cada laranja foi extraído e medido individualmente pelos equipamentos de RMN-DT e NIR. As análises destrutivas de referências realizadas foram, massa da fruta, massa da casca, massa de suco, rendimento, viscosidade, teor de sólidos solúveis (SST) e pH. Para os sinais de RMN-DT foi aplicada normalização entre (0-1) e suavização de segundo grau *Savitzky–Golay* com 21 janelas. Para os espectros de NIR aplicou-se a variação normal padrão (SNV). **Resultados:** Os modelos desenvolvidos com as medidas de RMN-DT das laranjas intactas, foram validados para predição dos seguintes parâmetros: massa da fruta r=0.96 SEP=13.84g; massa da casca r=0.96 SEP=7.25g; massa de suco r=0.92 SEP=9.75g e pH r=0.83 SEP=0.14. Os espectros adquiridos pela análise de NIR apresentou alta correlação com sólidos solúveis do suco de laranja (r=0.91) e baixo erro de predição (SEP=0.31). Ambos métodos avaliados não foram capazes de prever a viscosidade do suco de laranja. **Conclusão:** As metodologias não destrutivas utilizadas no estudo apresentam grande potencial na avaliação de parâmetros de qualidade tanto em frutas intactas como no suco, necessitando assim de maiores estudos para viabilização em grande escala destas novas tecnologias.
Palavras-chave: qualidade;laranja; suco; RMN-DT; NIR.

Abstract

Objectives: Use TD-NMR technique for determining parameters such as weight of the fruit, the shell pasta, juice pasta and juice yield using a measure of intact fruit. And also use the DT-NMR and NIR measurements orange juice for determination of viscosity, soluble solids and pH. **Methods:** Two hundred and fifty collections oranges, obtained in commercial crops in São Paulo. Intact fruits were initially submitted to non-invasive analysis of NMR-DT, then the juice of each orange was extracted and measured individually by NMR-DT and NIR equipment. Destructive analysis of references made were, fruit mass, shell mass, juice mass yield, viscosity, soluble solids (TSS) and pH. For the NMR signals DT was applied standardization between (0-1) smoothing and Savitzky-Golay second 21 degree windows. For the NIR spectra applied to standard normal variation (SNV). **Results:** The models developed with DT-NMR measurements of intact oranges were validated for the prediction of the following parameters: Fruit mass SEP r = 0.96 = 13.84; peel mass r = 0.96 SEP = 7.25; juice mass r = 0.92 SEP = 9.75 and pH r = 0.83 SEP= 0.14. The spectra acquired by NIR analysis showed high correlation with soluble solids of orange juice (r = 0.91) and low prediction error (SEP = 0.31). Both methods evaluated were not able to predict the viscosity of orange juice. **Conclusion:** The non-destructive methods used in the study have great potential in the evaluation of quality parameters both in intact fruit as in juice, thus requiring more studies to feasibility on a large scale of these new technologies.

Key-words: quality; orange; juice; TD-NMR; NIR.

1. Introdução

Em frutas cítricas o conhecimento de propriedades físicas são importantes para a formulação de sistemas mecânicos para a colheita ideal assim como para manipulação com danos mínimos à fruta (1). O peso da fruta e o rendimento de suco em frutas cítricas indicam a qualidade e são importantes do ponto de vista de comercialização (1). Da mesma forma, os sólidos solúveis totais (SST) e o pH encontram-se relacionados a propriedades de qualidade em laranjas e no suco. Por ser bastante estável antes e depois da colheita, a relação do teor de açúcares/ácidos em frutas cítricas é determinante para a aceitabilidade da fruta (2).

A viscosidade de sucos de laranja está relacionada com a presença de polissacarídeos como pectina que encontra-se em suspensão, evitando a separação das fases e por consequência deposição de material coloidal em suspensão. Sendo assim também é considerada uma propriedade de interesse no que se refere à qualidade do suco.

Entretanto as análises destes parâmetros são realizadas por métodos destrutivos que permitem ser aplicados a um pequeno conjunto representativo para se obter apenas valores médios, como na determinação de SST (3). Como alternativas não destrutivas para determinação de SST, métodos como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e de infravermelho próximo (NIR) foram propostos para estimar a doçura em frutos intactos relacionados à maturação (4).

A espectroscopia de NIR já demonstrou ser uma técnica adequada para avaliação rápida de qualidade interna de frutos (5). E técnicas como a de ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN-DT) já vêm sendo utilizadas para avaliação da qualidade e comportamento da água durante o armazenamento em laranja Bahia (6).

No campo das ciências de alimentos a técnica de RMN-DT adquiriu ampla aceitação, por ser um método poderoso que apresenta vantagens em relação a outras técnicas analíticas (7). A RMN-DT encontra-se baseada nas medidas de decaimento livre (FID) e amplitude de eco, ou sobre medidas de tempo de relaxação, longitudinal (T_1) e transversal (T_2) (8). Entre as técnicas conhecidas de ressonância magnética nuclear, a análise por imagem (RMI)

quando aplicada para avaliação de frutas revela vários tipos de tecidos pela obtenção de tempos de relaxação bastante distintos (9), entretanto a RMI possui um elevado custo de análise e manutenção que impossibilita sua execução em grande escala.

Diferentemente a espectroscopia está baseada no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, de modo a determinar os níveis de energia e transição de espécies atômicas e moleculares. Como método não destrutivo o NIR avalia os componentes químicos com base em sobretons (*Overtone*) e na combinação de bandas específicas de grupos funcionais (10).

Em citros o monitoramento por meio de NIR pode fornecer dados objetivos da qualidade e fase de maturação dos frutos em relação ao SST (11). Em contrapartida, a análise não invasiva por RMN-DT é capaz de distinguir laranjas de alto e baixo SST, permitindo agrupar laranjas em Classes 1 e 2, respectivamente. Posteriormente observou-se que a classificação realizada por RMN-DT foi confirmada por meio de análise sensorial (12).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi utilizar técnicas de RMN-DT e NIR para determinação de parâmetros físico-químicos relacionados a qualidade da laranja e do suco. O estudo também objetivou a construção de modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) para predição da massa da fruta, massa da casca, massa de suco, rendimento utilizando a medida de RMN-DT da laranja intacta. Assim como modelos de PLSR para predição da viscosidade, sólidos solúveis totais e pH, utilizando os sinais RMN-DT medidos na laranja intacta e no suco, e também os espectros de NIR na medição do suco de laranja.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras

Duzentos e cinquenta laranjas do cultivar "Valência" foram colhidas em fazendas comerciais da região de Matão-SP, Brasil. As frutas selecionadas no meio da safra da variedade foram colhidas em duas floradas distintas de laranjas, primeira e quarta florada. Após higienização dos frutos, os mesmo foram secos e armazenados em câmara fria a 12ºC±1.5 com U.R. 80%±10.

2.2. *Ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT)*

As laranjas foram medidas em espectrômetro SLK-MRI-1400 (Malgueño Córdoba, Argentina) equipado com um ímã permanente de 0,23 T (9 MHz para ^{1}H) Halbach, com 10 centímetros de diâmetro. Utilizou-se seqüência de pulsos CPMG (13,14), com os seguintes parâmetros: pulso de 90º =32µ e 180º =64µ, tempo de eco de τ = 5000µs, e número total de ecos igual a 1500 com 8 scans cada.O suco de laranja foi medido em espectrômetro equipado com ímã de 5 centímetros de diâmetro utilizando tubos falcon de 25mL.

2.3. Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

Os espectros de refletância na região do infravermelho próximo foram adquiridos em um espectrômetro modelo *Spectrum* 100N (*Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT*), equipado com um acessório de refletância difusa e com auxílio de reflector para análise de líquidos. Utilizou-se resolução de 16cm^{-1} sendo os sinais expressos em log (1/R).

2.4 *Análises de referência*

2.4.1. Massa fresca

Utilizou-se balança eletrônica de precisão de 0,1g para pesagem individual das laranjas e das cascas após a extração do suco. Em seguida os resultados foram expressos em gramas (g).

2.4.2. Rendimento de suco (%)

Realizada a medida de RMN-DT na laranja intacta, o suco individual de cada fruta foi extraído e armazenado para próximas análises instrumentais (RMN-DT e NIR) e para análises destrutivas de referência. Para o rendimento em suco, a primeira analise destrutiva realizada foi baseada na massa do suco extraído (g) dividida pela massa fresca do fruto (g) e multiplicada por 100. O resultado é expresso em porcentagem.

2.4.3. Viscosidade

A viscosidade do suco de laranja foi determinada em viscosímetro Brookfield LV DV-I PRIME, em temperatura controlada a 23ºC, mesma temperatura utilizada na análise de RMM-DT, em 100 rpm por 1 minuto cada amostra.

2.4.4.Sólidos solúveis totais (SST)

Os sólidos solúveis totais do suco de laranja foram medidos em triplicata com auxilio de refratômetro digital de bancada, RX-5000 Atago, com ajuste de temperatura da amostra para 25ºC±0.05. O resultado foi expresso em °Brix (15).

2.4.5. Potencial Hidrogeniônico (pH)

A análise foi realizada com equipamento pHS-3B pH meter em 20 ml de suco em triplicata (15).

2.5. *Análise multivariada*

2.5.1 Pré-processamento dos dados de RMN, NIR

Para as repetições da mesma amostra foi calculada a média dos sinais de RMN-DT e NIR. As análises multivariadas foram realizadas com auxílio de softwares Origin8.1 (Origin Lab, Northampton, MA, USA) e Pirouette v. 4.5 (Infometrix, Inc. Bothell –WA).

Com objetivo de reduzir ruídos nas medidas de RMN-DT realizou-se como pré-processamento de normalização dos sinais entre (0-1), onde é

dividida a maior variável pelas demais para padronização dos sinais e aplicada suavização de segundo grau Savitzky–Golay com 21 janelas. Os sinais de RMN-DT que se apresentavam em colunas foram transpostos em linhas.

No pré-processamento dos sinais de NIR aplicou-se a variação normal padrão (SNV). Por fim as colunas foram transpostas em linhas, onde cada linha representa uma amostra diferente e as colunas representam as variáveis correspondentes ao comprimento de onda.

2.5.2. Construção e composição das matrizes

Os dados espectrais referentes aos equipamentos de RMN-DT e NIR compuseram a matriz X, contendo nesta as variáveis independentes. As análises de referência compuseram a matriz Y, contendo as variáveis dependentes. A regressão por mínimos quadrados parciais foi aplicada nas matrizes X e Y a fim de descobrir as correlações existentes entre os espectros e as análises de referência, utilizando o software *Pirouette* v.4.5. O conjunto de dados foi subdividido em calibração com teste de validação interna cruzada *leave-one-out* contendo 70% dos dados e em conjunto de validação externa contendo 30% dos dados.

Todas as matrizes de calibração interna de RMN e NIR foram submetidas à análise de PCA para melhor avaliar a correlação das variáveis ao longo dos sinais com as medidas de referência e selecionar as de maior influência.

2.5.3. Matrizes de calibração e validação

Após inserir as matrizes no software *Pirouette v. 4.5* I*nfometrix*, Inc. *Bothell - WA*, para análise de regressão, foi aplicada a centralização dos dados na média (*mean-center*). A regressão por mínimos quadrados parciais (*PLS –Partial Least Squares*) foi executada com a validação cruzada (*cross-validation*) com *leave-one-out* interno no conjunto de dados.

Como resultado a análise de PLSR demonstrou as porcentagens de variância total conforme os fatores escolhidos, os coeficientes de correlação

de Pearson (r), da calibração(r Cal), validação (r Val) e da predição. Assim como os erros padrão de calibração (SEC), validação(SEV) e predição (SEP).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises de Referência

Os resultados obtidos na análise de parâmetros físico-químicos apresentaram grande variação entre as amostras analisadas (Tabela 1). Entretanto, esta variação já era esperada pelo fato de duas floradas terem sido colhidas (primeira e quarta), sendo assim apresentavam desde o momento da colheita características físicas bastante distintas.

Em frutas cítricas como lima 'Kagzi' e laranjas 'Mosambi' o aumento do peso e do volume do fruto foi observado juntamente com redução da espessura da casca durante o desenvolvimento e maturação (1). Para a cultivar 'Kagzi' o aumento da porcentagem de suco, de 28.92 para 47.93% na última etapa de desenvolvimento foi observado entre 120 e 160 dias após a floração. Da mesma forma em laranjas 'Mosambi' a porcentagem de suco quase duplicou entre 180 e 240 dias de floração. No presente estudo também foram observadas em laranjas de primeira e quarta florada, grandes variações em relação à massa da fruta, massa da casca e massa do suco. Os valores encontrados para o rendimento de suco variaram de 42.8 a 61.3%.

Referente à viscosidade, a caracterização reológica do suco natural de laranja é descrita segundo Varshney e Kuambar (1978) com um comportamento praticamente newtoniano. Estes são caracterizados por apresentar uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação. Os valores encontrados para a viscosidade variaram de 1.47 a 20.4cp, onde os maiores valores devem-se à contribuição de compostos como a pectina e grande quantidade de material em suspensão, gerando o aumento da viscosidade.

Durante o período de crescimento dos frutos o conteúdo de SST aumenta enquanto que o teor de ácidos diminui. Portanto, para indústria processadora de suco a avaliação de parâmetros como, SST e pH são importantes para controlar e monitorar a qualidade do produto. Devido a medida de SST pelo refratômetro representar parâmetros não somente relacionados ao teor de sacarose, mas também vitaminas, pigmentos, ácidos e outros sólidos solúveis (12) a cultivar Valência apresentou maior variação para os sólidos solúveis totais (7.06 a 11,2%) em relação ao pH (2.84 a 4.03%).

Tabela 1- Análises de referência laranjas da cultivar Valência.

Análises	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Amostras
Massa da casca (g)	45.64	138.6	83.37	1.89	130
Massa da fruta (g)	98.67	289.88	183.19	3.82	130
Massa de suco (g)	53.03	153.61	99.82	2.07	130
Rendimento (%)	42.8	61.3	54.6	0.26	130
Viscosidade (cp)	1.47	20.4	8.19	0.29	130
SST (ºBrix)	7.06	11.2	8.91	0.07	130
pH	2.84	4.03	3.39	0.02	130

3.2. Desempenho de modelos de PLS-RMN

A tabela 2 mostra a calibração dos modelos de PLS utilizando os decaimentos de RMN-DT obtidos por CPMG medidos em laranjas intactas. A análise de regressão PLS utilizando sinais de RMN-DT validou os modelos para os parâmetros referentes à massa da fruta, massa da casca, massa do suco e pH de forma não destrutiva, utilizando a medida da laranja intacta. Já os modelos de PLS, utilizando as medidas de RMN-DT do suco para predição da viscosidade e SST do suco de laranja, não puderam ser validados, pois obtiveram $r<0.7$.

Tabela 2. Desempenho do conjunto de calibração em modelos de PLS-RMN para parâmetros físico-químicos do suco de laranja.

Parâmetros	Fatores	SEV	r Val	SEC	r Cal	N
Massa da fruta (g)	7	16.28	0.92	9.58	0.97	91
Massa da casca (g)	7	10.58	0.85	5.64	0.96	91
Massa de suco (mL)	7	10.29	0.89	7.14	0.95	91
Rendimento (%)	1	2.88	0.26	2.85	0.32	91
Viscosidade (cp)	1	3.60	-0.15	3.56	0.08	91
SST(°Brix)	3	0.76	0.22	0.73	0.39	91
pH	1	0.16	0.79	0.10	0.93	91

SEV: Erro padrão da validação; r Val e r Cal: coef. de Pearson para validação e calibração; N: universo amostral.

Ainda na tabela 3 verifica-se o desempenho dos modelos validados em conjuntos de validação externa. Os valores acima de 0.7 sugerem que os modelos para predição da massa da fruta, massa da casca, massa de suco e pH podem ser aplicados para classificar laranja e o suco de forma não invasiva e sem a necessidade de realizar a medida manualmente por análise de referência.

Tabela 3. Desempenho de modelos PLS-RMN em conjunto de validação externa.

Parâmetro	SEP	r	N
Massa fruta (g)	13.84	0.96	39
Massa casca (g)	7.25	0.96	39
Massa suco (mL)	9.75	0.92	39
pH	0.14	0.83	39

SEP: Erro padrão da predição; r:coef. de Pearson; N: universo amostral

Para as indústrias processadoras de suco de laranja, o rendimento do suco é um parâmetro importante a ser analisado, pois diferentes cultivares apresentam grande variação no rendimento. Destaca-se na indústria de sucos a cultivar Pêra-Rio pelo seu elevado rendimento em suco de 52%, em seguida estão as cultivares Natal e Valência que possuem cerca de 50% do peso em suco. Por fim, com frutos menores a laranja Hamlin fornece menor rendimento em comparação as demais, em média 41% de suco (16).

Relacionada ao rendimento de suco, a porcentagem de água livre é uma variável de grande influência no sinal de RMN-DT, por esta razão pode-

se explicar a relação entre o decaimento e a massa da fruta, massa da casca e massa de suco. Conforme a redução da espessura do albedo, a laranja apresenta maior porcentagem de água livre, sendo facilmente detectada pela análise de RMN-DT. Ainda, o modelo de PLS-RMN para massa de suco (r=0.92) está de acordo com estudos referentes à predição do rendimento de suco de laranja por meio de RMN-DT (17), onde foi observado coeficiente de Pearson igual a 0.78 na validação externa e erro padrão de predição de 3.26%.

Para predição dos valores de pH em laranjas intactas por meio de RMN-DT, obteve-se alto coeficiente de Pearson (r=0.83), tornando possível a validação do modelo de PLS para este parâmetro. Comparados com os resultados obtidos neste estudo, Ribeiro (2008) obteve coeficientes de Pearson inferiores (r= 0.29) quando correlacionou os sinais de CPMG obtidos por RMN-DT de frutos não climatéricos como 'uva itália' com os respectivos valores de pH. Entretanto variações de T_1 e T_2 em diferentes faixas de pH foram observadas em estudo referente ao comportamento de íons paramagnéticos complexos em solução. Entre pH 1 e 5 observou-se aumento de 71 para 1150 ms nos valores de T_1 e de 59 para 890 ms para T_2 (18).

Ainda na figura 1 verifica-se a correlação negativa encontrada entre os tempos de relaxação T_2 e o pH medido no suco de laranja. Sucos com pH entre 3.03-3.17 apresentaram T_2 superiores, entre 0.20-0.22ms, em relação aos sucos com pH mais elevado (3.53-4.03) com T_2 próximos de 0.17ms.

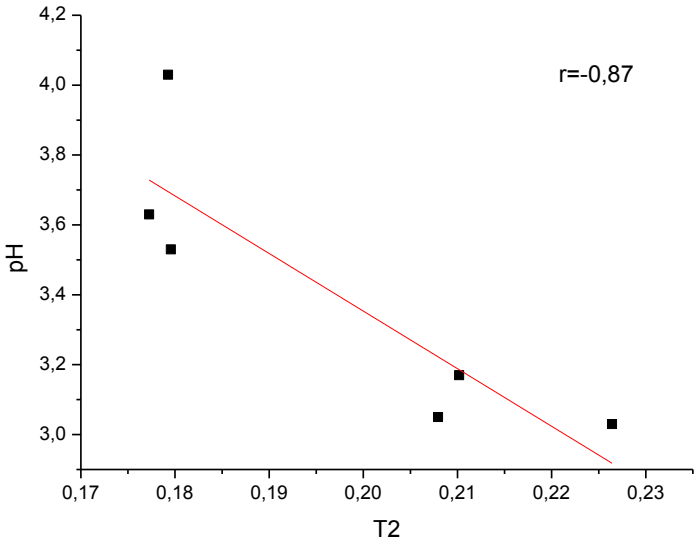


Figura 1. Correlação entre pH com os tempos de relaxação T_2.

Diferente deste estudo, a correlação entre os sinais de RMN-DT e a viscosidade de óleos vegetais de sementes de mamona foi encontrada com coeficiente de correlação igual a -0.79 (19). No caso da baixa relação observada entre os sinais de RMN-DT e a viscosidade do suco de laranja acredita-se que o viscosímetro utilizado não tenha sido compatível para amostra analisada.

3.3. Desempenho de modelos de PLS-NIR

A tabela 4 mostra que o modelo de PLS para predição dos sólidos solúveis foi validado por meio da validação cruzada, ainda, apresentou coeficiente de correlação superior a 0.7, indicando uma boa correlação entre os sinais de NIR com a análise de referência. Para o modelo de PLS de viscosidade e pH, não foi possível correlacionar o espectro com os valores de referência ($r < 0.7$).

Tabela 4. Desempenho do conjunto de calibração em modelos de PLS-NIR para parâmetros físico-químicos do suco de laranja.

Parâmetro	Fatores	SEV	r Val	SEC	r Cal	N
Viscosidade (cp)	7	3.42	0.21	3.06	0.47	91
SST (Brix)	6	0.39	0.87	0.35	0.91	91
pH	5	0.21	0.62	0.18	0.74	91

SEV: Erro padrão da validação; r Val e r Cal: coef. de Pearson para validação e calibração; N: universo amostral.

Ainda é possível verificar (Tabela 5) o desempenho dos modelos em validação externa, confirmando a predição dos valores de sólidos solúveis (r>0.7).

Tabela 5. Desempenho da validação externa dos modelos de PLS-NIR.

Parâmetro	SEP	r	N
SST(°Brix)	0.30	0.94	39

SEP: Erro padrão da predição; r :coeficiente. de Pearson; N: universo amostral.

O desempenho do modelo de PLS-NIR para predição de SST foi melhor em relação aos demais modelos para predição de viscosidade e pH em suco de laranja. Por ser uma molécula orgânica SST contém ligações C-H, O-H, C-O, C-C, pode ser possível utilizar métodos como NIR para determinação de SST, como já relatado em estudo referente a predição de SST em laranja Bahia (20).

Os resultados referentes ao erro padrão da predição (SEP) obtidos neste estudo para predição de SST são inferiores em relação aos valores encontrados por Cen et. al. (2006), na qual obteve RMSEP=0.73° Brix em suco de laranja. Ainda, bons desempenhos do uso NIR em citros, tal como a cultivar mandarim, são relatados na literatura por McGlone et. al. (2003) e Hernández et. al. (2006) na qual obtiveram SEP igual a 0.32 e 0.16, respectivamente. Entretanto, a cultivar Valência utilizada neste estudo apresenta frutos de maiores tamanhos e possuem estruturas diferentes em relação a outras frutas cítricas (21). Desta forma diferenças histológicas podem influenciar os resultados e medições de NIR em citros (21).

No conjunto de calibração e validação externa dos modelos de predição de pH não foi obtido coeficiente de correlação suficiente para validação do modelo. Cayuela et. al. (2008) atribui a baixa correlação encontrada (r=0.49 e 0.44) para predição de pH em laranjas intactas por NIR devido aos níveis relativamente baixos de ácidos orgânicos nas laranjas no que diz respeito às concentrações de sólidos solúveis.

4. Conclusão

As análises não destrutivas de RMN-DT e espectroscopia de NIR aliadas à análise multivariada demonstraram potencial para avaliação de parâmetros de qualidade em laranjas intactas assim como no suco. Utilizando os sinais de RMN-DT foi possível validar os modelos para predição de massa da fruta, massa da casca, massa de suco e pH.

Contudo, devido à análise de RMN-DT ser um método que permite avaliar o fruto inteiro e medir seu ambiente interno, observou-se uma alta eficiência no método para predição de parâmetros físicos de qualidade. A análise de PLS utilizando sinais de infravermelho próximo foi capaz de validar apenas um parâmetro físico de qualidade, provavelmente, devido ao menor poder de penetração da análise, e ao fato do fruto analisado apresentar maior espessura na casca, dificultando assim a predição dos demais parâmetros analisados. Mesmo assim a espectroscopia de NIR possibilitou a construção de modelos de PLS para predição de sólidos solúveis no suco de laranja.

Utilizando a medida não invasiva da laranja intacta por RMN-DT e a medida não destrutiva do suco por RMN-DT e NIR não foi possível prever a viscosidade do suco de laranja. Os resultados obtidos podem ser atribuídos à incompatibilidade do equipamento utilizado na análise de referência com a amostra analisada.

Metodologias não destrutivas utilizadas no estudo apresentam grande potencial na avaliação de parâmetros de qualidade tanto em frutas intactas

como no suco, necessitando assim de maiores estudos para viabilização em grande escala destas novas tecnologias.

Referências

1. Ladaniya MS. Fruit Biochemistry. Citrus fruit Biol Technol Eval. 2008;150, 193–7.
2. Cayuela JA, Weiland C. Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers. Postharvest Biol Technol. 2010;58(2):113–20.
3. Marigheto N, Wright K, Hills BP. Applled Magnetic Resonance. 2006;23:13–23.
4. Belton PS, Colquhoun IJ, Hills BP. Applications of NMR to Food Science. Annu Reports NMR Spectrosc. 1993;26(C):1–53.
5. Wang A, Hu D, Xie L. Comparison of detection modes in terms of the necessity of visible region (VIS) and influence of the peel on soluble solids content (SSC) determination of navel orange using VIS-SWNIR spectroscopy. J Food Eng [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;126:126–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.011
6. Zhang J, Liu Y, Wang N, Ruan R. NMR technique application in evaluating the quality of navel orange during storage. Procedia Eng [Internet]. 2012;37:234–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2012.04.233
7. Ribeiro R de OR, Máralém ET, Carneiro C da S, Monteiro MLG, Júnior CC, Jesus EFO de. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). J Food Eng [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;135:39–43. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414001228

8. Colnago LA, Andrade FD, Souza AA, Azeredo RB V, Lima AA, Cerioni LM, et al. Why is Inline NMR Rarely Used as Industrial Sensor? Challenges and Opportunities. Chem Eng Technol. 2014;37(2):191–203.

9. Ribeiro FZ, Marconcini LV, de Toledo IB, de Vasconcellos Azeredo RB, Barbosa LL, Colnago LA. Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: A new mechanism. J Sci Food Agric. 2010;90(12):2052–7.

10. Fischer WB, Eysel HH, Nielsen OF, Bertie JE. Corrections to the Baseline Distortions in the OH-Streach Region of Aqueous solution. App Spec. 1994;48(1):107–12.

11. Zude M, Pflanz M, Kaprielian C, Aivazian BL. NIRS as a tool for precision horticulture in the citrus industry. Biosyst Eng. 2008;99(3):455–9.

12. Flores DWM, Colnago LA, Ferreira MD, Spoto MHF. Prediction of Orange juice sensorial attributes from intact fruits by TD-NMR. Microchem J [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;128:113–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.009

13. Carr H, Purcell E. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. Phys Rev [Internet]. 1954;94(3):630–8. Available from: http://prola.aps.org/abstract/PR/v94/i3/p630_1\nhttp://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.94.630

14. Meiboom S, Gill D. Modified spin-echo method for measuring nuclear

relaxation times. Rev Sci Instrum. 1958;29(8):688–91.

15. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. In: Association of Official Analysis Chemists International. 1990. p. 1058–9.
16. Vieira Machado T. Avaliação sensorial e físico-química dosuco de laranja proveniente das etapas do processamento do suco concentrado e congelado [Internet]. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2010. Available from: http://www.fcfar.unesp.br/.../2010/TALITAVIEIRAMACHADOME.PDF
17. Flores DWM. Sistemas não invasivos para classificação de laranjas por meio de parâmetros físico-químicos. Universidade São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; 2015.
18. Kock FVC, Colnago LA. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ion complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. Microchem J [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;122:144–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.003
19. Toma D. Análise da qualidade de óleos vegetais em sementes intactas por RMN de baixa resolução. 2009;
20. Liu Y, Sun X, Ouyang A. Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible-NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. LWT - Food Sci Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;43(4):602–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.10.008

21. Cayuela JA. Vis/NIR soluble solids prediction in intact oranges (Citrus sinensis L.) cv. Valencia Late by reflectance. Postharvest Biol Technol. 2008;47(1):75–80.

Capítulo 3.

Determinação do conteúdo de pectina solúvel em água em suco de laranja por métodos não destrutivos

Predição do conteúdo de pectina solúvel em suco de laranja por métodos não destrutivos

Marilia Bizzani[1]
Douglas William MenezesFlores[2]
Luiz Alberto Colnago[3]
Marcos David Ferreira[3]

[1]Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" -UNESP, Rodovia Araraquara – Jaú, Km 1, Araraquara-SP, 14801-902, Brasil.
[2]Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição- LAN, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Avenida Pádua Dias, 11, Piracicaba-SP, 13418-900, Brasil.
[3]Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, São Carlos-SP, 13561-206, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o uso de medidas não destrutivas por RMN-DT e MIR para predição de pectina solúvel em suco de laranja**. Métodos:** Os espectros de RMN-DT e MIR obtidos dos sucos de laranja analisados foram correlacionados com os resultados da análise destrutiva de determinação de pectina solúvel em água por meio de modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR). Foi avaliado o desempenho do modelo de PLSR com base no coeficiente de correlação de Pearson (r) e nos valores de erro padrão de predição (SEP) obtidos na calibração e validação externa. **Resultados:** As predições por PLSR de pectina solúvel em suco de laranja utilizando RMN-DT e MIR obtiveram logo na etapa de calibração baixos coeficientes de correlação de Pearson (r=0.48 e 0.51) e elevado SEC de 7.63mg/L e 7.49mg/L, respectivamente. Desta forma, não puderam ser feitas as validações externas dos dados. Por outro lado, diferentes concentrações de pectina cítrica comercial isolada medidas pelos mesmos métodos de RMN-DT e MIR, apresentaram espectros bastante distintos, permitindo distinguir as diferentes concentrações analisadas. As absorbâncias dos grupos funcionais ácido carboxílico e carbonila dos espectros de MIR apresentaram alta correlação (r=0.97 e 0.98), respectivamente com as concentrações de pectina cítrica comercial. Ainda, conforme a redução da concentração de pectina cítrica isolada foram observados decaimentos de RMN-DT mais longos e vice-versa. **Conclusão:** Desta forma, a combinação dos métodos não destrutivos avaliados neste estudo com quimiometria, podem apresentar potencial para análise de parâmetros de qualidade de suco de laranja, necessitando de maiores estudos para remoção de interferentes no desempenho da análise.

Palavras-chave: pectina solúvel; suco de laranja; qualidade; RMN-DT; MIR;quimiometria.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the use of non-invasive measurements by NMR-TD and MIR for prediction of water-soluble pectin in orange juice. **Methods:** DT-NMR and MIR spectra obtained from the orange juice analyzed were correlated with the results of destructive analytical determination of water-soluble pectin by partial least squares regression (PLSR) analysis. It evaluated the performance of the PLSR model based on the Pearson correlation coefficient (r) and standard error values of prediction (SEP) obtained from calibration and external validation. **Results:** Predictions by PLSR soluble pectin in orange juice using NMR-DT and MIR obtained low Pearson correlation coefficient (r = 0.48 and 0.51) and high SEP of 7.63mg/L and 7.49mg/L, respectively. Thus, it could not be made external validation data. In the other hand, different concentrations of commercial isolated citrus pectin measured by the same methods DT-NMR and MIR spectra showed very different allowing to distinguish the different samples concentrations. The absorbance of the carboxylic acid functional groups and carbonyl of MIR spectra showed high correlation (r = 0.97 and 0.98), respectively with commercial citrus pectin concentrations. Furthermore, as the reduction of the concentration of citrus pectin alone were observed NMR DT decays longer and vice versa. **Conclusion:** Thus, the combination of non-destructive methods in this study with chemometrics, may have potential for analysis of orange juice quality parameters, requiring further studies for removing interfering in the assay performance.

Key-words: soluble pectin; orange juice; quality; TD-NMR; MIR; chemometrics.

1. Introdução

O suco de laranja é o suco predominante entre as bebidas processadas pela indústria em todo mundo, sendo responsável por mais de 50% do comércio internacional de suco (1). Seu destaque entre as demais bebidas processadas deve-se à sua combinação de atributos sensoriais, como cor, aroma, sabor e valor nutricional (2). Entretanto, métodos de controle de qualidade de propriedades que conferem ao suco de laranja, atributos sensoriais desejáveis são demorados, destrutivos de difícil execução, permitindo a análise somente de uma amostragem do produto. Algumas alternativas para controle de qualidade de frutas que é invasivo e demorado vêm sendo propostas por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (3)(4). Por outro lado, é de grande importância a avaliação também de componentes específicos presentes em sucos (5).

Os sucos de frutas são suspensões complexas heterogêneas de partículas grandes não solúveis, materiais supra-coloidais e coloidais, os quais encontram-se dispersos em uma forma rica de compostos solúveis, como açúcares, ácidos orgânicos, pectinas solúveis, compostos fenólicos e sais (6). Uma mistura de proteínas, pectina, lipídios, hemicelulose, celulose é responsável pela turbidez característica de sucos cítricos (7). A perda da turbidez no suco de laranja é associada pelos consumidores à deterioração e considerada um defeito de qualidade, visto que partículas retidas em suspensão encontram-se relacionadas à cor, sabor, textura e aroma do suco de laranja (7).

A melhor explicação para perda de turbidez em sucos é baseada na desmetilação de pectina pela ação de enzimas pectinametilesterase (PME) (7) onde a atividade enzimática de PME gera cargas negativas na qual forma géis de pectato de cálcio insolúveis com íons de cálcio presentes no suco (7). Os géis de pectato formados podem precipitar levando a turbidez do suco com eles, causando a clarificação do suco de laranja pela perda de turbidez (8). Desta forma, em sucos de laranja, para inativação da PME

assim como evitar deterioração microbiana, é realizado tratamento térmico a 90ºC durante 1 minuto (9).

Da mesma forma que a preservação da molécula de pectina é necessária para manutenção da turbidez desejada do suco de laranja, é importante monitorar seu conteúdo visto que a adição de pectina ao suco de laranja pode causar alteração na distribuição do tamanho das partículas da suspensão (10). Entretanto os métodos atuais para determinação de pectina solúvel em água consistem em análises demoradas, de difícil execução e que geram grande volume de resíduos químicos.

O desenvolvimento de metodologias qualitativas e quantitativas não destrutivas pelo avanço de novas tecnologias, automação e aliadas a análise multivariada, vêm apresentando alternativas inovadoras para análise e controle de qualidade de alimentos (11).

Entre elas a ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT) vendo sendo utilizada em muitas áreas da ciência e tecnologia de alimentos (4). O baixo custo de equipamentos de RMN-DT com tecnologia de imã permanente quando comparado aos de espectrômetros de alta resolução que são caros e sofisticados, além de não possuírem nenhum tipo de preparo de amostra, procedimentos de análise simples e rápidos, são fatores que vêm contribuindo para o crescente uso de técnica de RMN-DT na análise de alimentos (12). A técnica de RMN-DT vem demonstrando ser uma importante ferramenta para análise de controle de qualidade de diversas matrizes alimentícias como leite (13), queijo (14), mel (15), batata (16) e frutas intactas (17,18).

No mesmo contexto, a espectroscopia de infravermelho vem sendo uma técnica com destaque por ser um método não invasivo para avaliação da qualidade de frutos (19). A espectroscopia de infravermelho é capaz de identificar compostos, baseada na propriedade das moléculas de absorver luz infravermelha e apresentar grande variedade de movimentos vibracionais os quais são característicos de sua composição (20). Em particular os espectros de infravermelho médio (MIR) possuem bandas específicas sendo bastante sensível à composição química das amostras (21). Sendo assim a

metodologia de MIR vem sendo utilizada para determinação de açúcares, ácidos orgânicos e polifenóis em damasco e maçã (22)(23).

Para a indústria propriedades relacionadas à qualidade do suco, como perda de turbidez, representam atuais dificuldades e desafios (24). A perda da turbidez pode eliminar o suco da comercialização gerando um impacto negativo sobre os produtores e indústrias de suco, tornando importante a avaliação de propriedades estruturais de turbidez e sua pectina incorporada (24). Da mesma forma que estudos referentes à aplicação de metodologias não destrutivas para controle de qualidade de suco de laranja são de grande valia.

Neste trabalho foi avaliado o potencial do uso de medidas não destrutivas RMN-DT e MIR por meio de modelos de mínimos quadrados parciais de regressão (PLSR) para predição de pectina solúvel em água em suco de laranja.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras

Duzentos e cinquenta laranjas da cultivar Valencia foram colhidas em fazendas comerciais da região de Matão-SP, Brasil. Foram realizadas duas colheitas distintas da safra da cultivar, sendo uma colheita feita no mês de novembro de 2015 e outra no mês de abril de 2016. Após higienização dos frutos, os mesmos foram secos e armazenados em câmara fria a 12ºC±1,5 com U.R. 80%±10.

2.2. *Ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT)*

O suco extraído de cada laranja foi acondicionado em eppendorf de 2mL e medido individualmente em espectrômetro SKL-100 (SpinLock) equipado com ímã permanente de 0,23 T (10 MHz para ^{1}H) com 5 centímetros de diâmetro. Utilizou-se software CONDOR IDE e sequência de pulsos CPMG (Carr; Purcell, 1954; Meiboom; Gill, 1958).

2.3. Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)

O suco de cada laranja foi analisado por infravermelho médio em triplicata com equipamento Cary 630 (Agilent, Walnut Creek, CA, EUA) com acessório (ATR). Inicialmente, 10µl de suco foram colocados em contado com cristal do equipamento e aplicado vácuo com auxilio de bomba a vácuo por 3 minutos e 30 segundos com objetivo de secar a amostra e remover a interferência da água no sinal. Posteriormente a este tempo o vácuo foi desligado e o espectro foi adquirido. Foram coletados espectros na região entre 4000-700 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} com 64 scans cada para melhorar a relação sinal-ruído.

2.4 *Análises de referência*

2.4.1.Determinação de pectina solúvel em água

O teor de pectina solúvel em água no suco de laranja foi determinado segundo Rouse e Alkins (1955), pelo método do Carbazol. Foi analisado em duplicata o suco individual de cada laranja, conforme a mesma medida individual do fruto realizada na análise instrumental. Utilizando a curva padrão foi calculada a quantidade de pectina solúvel em água encontrada nas amostras de suco de laranja.

2.5 Análise de pectina cítrica isolada comercial por RMN-DT e MIR

Conforme os resultados de predição de pectina solúvel em suco de laranja por RMN-DT e MIR (Item 3.3), os mesmos métodos instrumentais foram utilizados para medir amostras com diferentes concentrações de pectina cítrica comercial. Utilizaram-se as concentrações de 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 e 1% de pectina cítrica isolada comercial marca Dinâmica, adicionadas a água milli-Q. As medidas de RMN-DT foram realizadas sob temperatura controlada nas mesmas condições de medida das amostras de suco de laranja. Da mesma forma, a análise de MIR das soluções de pectina utilizou as mesmas condições de vácuo, volume e tempo de secagem utilizadas nas medidas de suco de laranja.

2.6 *Análises de dados*

No processamento dos dados foram utilizados os sofwares Origin 8.1 (Origin Lab, Northampton, MA, EUA) e Pirouette v. 4.5 (Infometrix, Inc. Bothell –WA), onde foram calculadas as médias de medidas realizadas em duplicata de RMN-DT e em triplicata de MIR. Inicialmente foi realizada análise de componentes principais (PCA) afim de obter uma visão global da variação dos dados de RMN-DT e MIR e melhor avaliar as variáveis de melhor correlação ao longo dos sinais com a medida destrutiva de referência

Para os 109 sinais de RMN-DT foi aplicada normalização (0-1), suavização de Savitzky–Golay (ordem 3; largura de janela de 15 pontos) e *mean center* como pré-processamento para predição por PLSR.

Como pré-processamento das 109 medidas espectrais de MIR foi aplicada segunda derivada (polinômio de terceiro grau, 15 pontos) e *mean-center*. A fim de excluir ruídos para a construção dos modelos, uma seleção de variáveis dos espectros foi realizada incluindo as variáveis entre 417-1515 e 2403-3486cm^{-1} de absorbância.

Para a construção dos modelos de PLSR os dados foram divididos em 70 e 30%, para composição dos conjuntos de calibração e validação externa, respectivamente. Os dados espectrais referentes aos equipamentos de RMN-DT e MIR comporão a matriz X, contendo nesta as variáveis independentes. A análise de pectina solúvel em água compôs a matriz Y, contendo as variáveis dependentes. A análise de PLSR foi aplicada nas matrizes X e Y a fim de descobrir as correlações existentes entre os espectros e a análises de referência. Sobre o conjunto de calibração foi observado seu desempenho com teste de validação cruzada *leave-one-out* e sobre o conjunto de validação externa (30%) avaliou-se os coeficientes de correlação de Pearson (r) e erro quadrático médio (SEP).

3. Resultados e discussão

3.1. Características espectrais: RMN-DT

Na figura 1 observa-se a variação amostral de 109 sinais normalizados de sucos de laranja obtidos por CPMG. Estas variações observadas nos decaimentos encontram-se relacionadas com diferenças nos tempos de relaxação transversal (T_2), a qual são dependentes das características amostrais. Desta forma, diferentes composições dos sucos em relação ao conteúdo de açúcar, viscosidade, ácidos e vitaminas são refletidas nos decaimentos de RMN-DT.

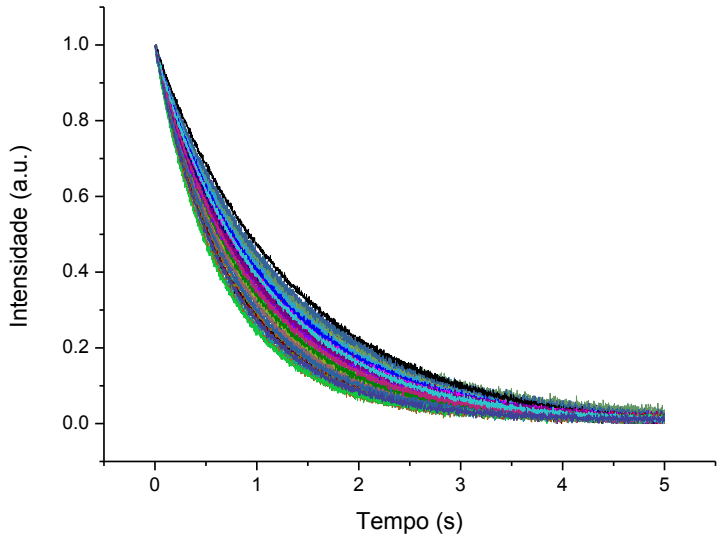


Figura 1. Decaimentos de RMN-DT de sucos de laranja obtidos por CPMG.

3.2. Características espectrais: MIR

O perfil espectral de 109 amostras de suco de laranja é observado na figura 2. Bandas características de grupos O-H foram observados entre 3500cm^{-1} e 3073cm^{-1} e foram mantidas para construção do modelo. Ainda são observados bandas entre 1790cm^{-1} e 706cm^{-1} a qual são associadas a grupos C=O e C=C e também bandas em um intervalo entre 1000 e 1500cm^{-1} associadas a polissacarídeos e ligações simples, importantes para construção do modelo de pectina solúvel.

A investigação do estado de grupamentos carboxílicos, por meio de infravermelho possibilita a determinação de alguns grupos funcionais dos derivados pécticos em regiões entre 1900cm^{-1} e 1500cm^{-1} (25,26), região as qual aparece em destaque nos espectros de suco de laranja.

Outras regiões do espectro de MIR importante para este trabalho são observadas entre 1745cm^{-1} e 1606-1639cm^{-1}, estas regiões podem determinar o grau de esterificação de grupos carbonila da molécula de pectina e a região do éster e carboxilato respectivamente (26).

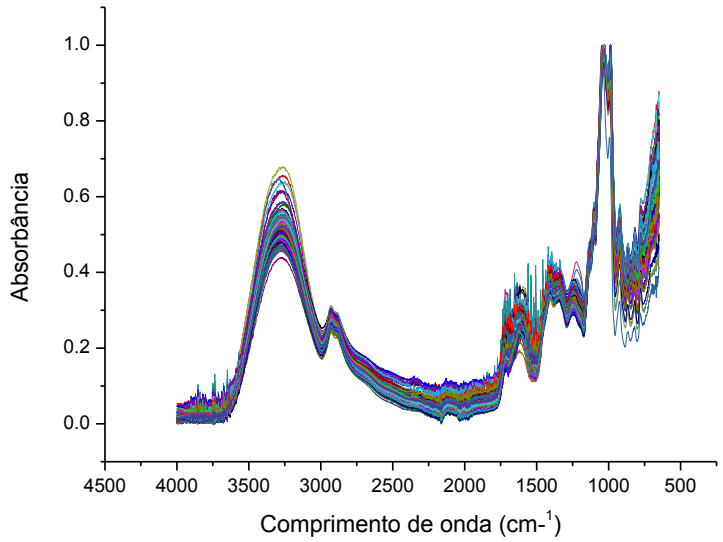


Figura 2. Espectros de suco de laranja obtidos por infravermelho médio.

3.3 Modelos de predição por PLSR: pectina solúvel em água

O modelo de PLSR para pectina solúvel em suco de laranja por meio de RMN-DT logo na etapa de calibração não apresentou desempenho satisfatório, pois obteve baixo coeficiente de determinação (r=0.47) e elevado erro padrão da calibração (7.63mg/L). Da mesma forma, os resultados obtidos na análise de PLSR executada com os dados espectrais de MIR não foram satisfatórios, na qual apresentou coeficiente de determinação e erro padrão da calibração bastante semelhante ao modelo

de RMN-DT. Desta forma, em ambos os modelos não pode ser feitas validação externa dos dados.

Tabela 1. Desempenho do conjunto de calibração em modelos de PLSR desenvolvidos por RMN-DT e MIR para o conteúdo de pectina solúvel em suco de laranja.

Método	r	SEC	N
RMN-DT	0.48	7.63	109
MIR	0.51	7.49	109

r: coeficiente de correlação de Pearson; SEC: Erro padrão da validação; N: universo amostral.

Com base na equivalência dos valores de pectina solúvel das amostras, os sucos de laranja analisados foram classificadas com conteúdo de pectina solúvel inferior a 35mg/L, entre 35 e 40mg/L e superior a 40mg/L. Em seguida foram plotados os espectros de RMN-DT e MIR das amostras de cada classificação, onde notou-se que a variação do conteúdo de pectina solúvel não influenciou na variação das medidas instrumentais, permanecendo os espectros praticamente inalterados. Está demonstração confirma o mau desempenho dos métodos instrumentais utilizados na predição de pectina solúvel por PLSR.

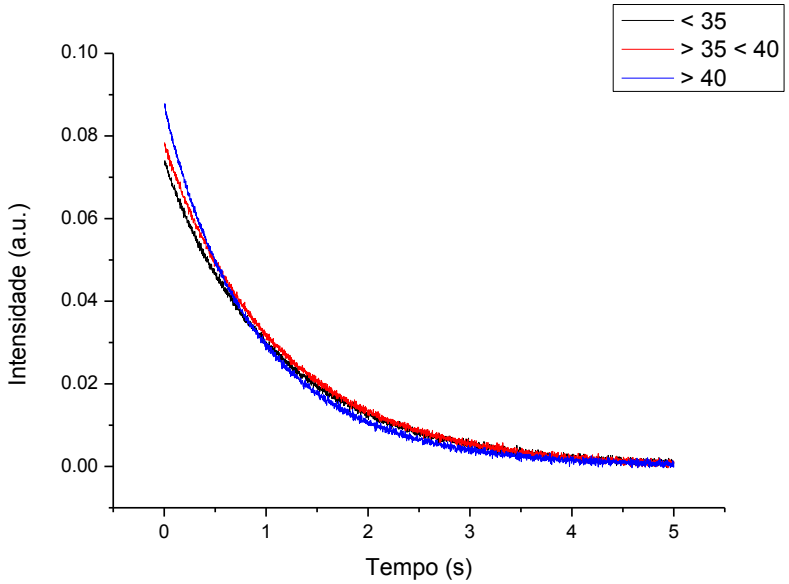


Figura 3. Decaimentos de RMN-DT de sucos de laranja com valores extremos e médios de pectina solúvel.

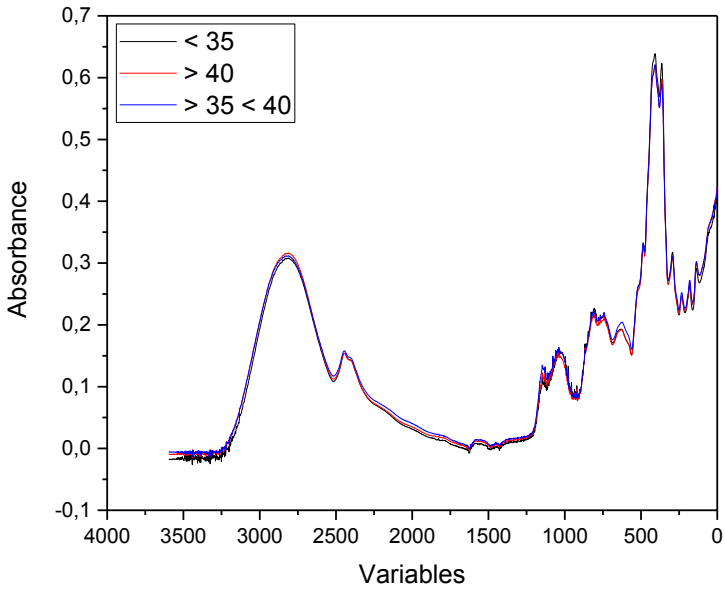


Figura 4. Perfil espectral obtido por MIR de sucos de laranja com valores extremos e médios de pectina solúvel.

O efeito de substâncias pécticas sobre a estabilidade da turbidez de sucos é inegável, entretanto sua porção é muito pequena (27), principalmente sucos naturais de laranja apresentam pequeno conteúdo de pectina. Foram encontrados entre as amostras analisadas neste estudo valores máximos de 58,81mg/L de pectina solúvel em água.

Neste contexto, é importante salientar a maior proporção de açúcares contidos em sucos de laranja fresco. Em alguns casos, como em suco de laranja Bahia a porcentagem total de açúcares atinge um total de 8.6%, destes 4.05% de glicose e 4.55% de frutose (28). Além disso, o teor de ácidos orgânicos também possui destaque na composição do suco de laranja, visto que ácidos orgânicos, como ácido ascórbico, são encontrados em abundancia em citros.

3.4. Análise de pectina cítrica isolada comercial por RMN-DT e MIR

Foi testado o potencial de distinção de amostras com quantidades diferentes de pectina cítrica isolada por meio de RMN-DT e MIR para observar se a pectina solúvel possui influência na variação dos dados instrumentais. Para esta avaliação concentrações conhecidas de pectina cítrica isolada comercial foram adicionadas à água milli-Q e medidas sob temperatura controla em equipamento de RMN-DT e MIR.

Para as menores concentrações de pectina cítrica isolada os decaimentos de RMN-DT ficaram mais longos e conforme o aumento da sua concentração houve redução dos decaimentos. O aumento nos valores de T_2 (Tabela 2) pode ser observado conforme a redução da concentração de pectina cítrica comercial das amostras analisadas.

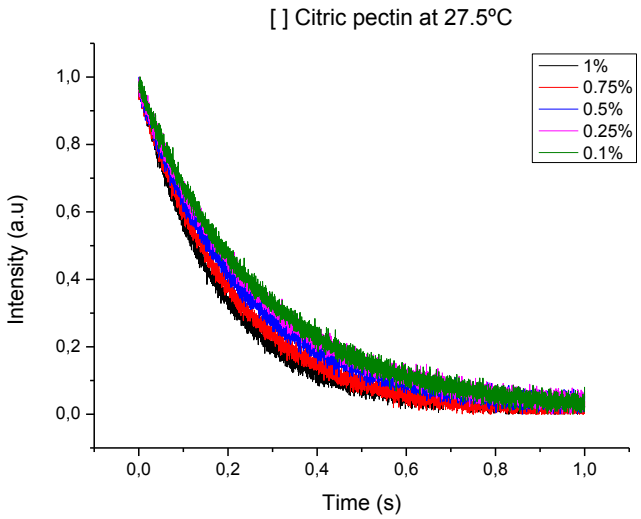


Figura 5.Decaimentos RMN-DT para diferentes concentrações de pectina cítrica.

Tabela 2. Correlação entre concentrações de pectina cítrica e T_2.

[ ]Pectina Cítrica	T_2(s)
1	1.8
0.75	2.08
0.5	2.3
0.25	2.59
0.1	2.68

T_2= tempo de relaxação transversal.

Da mesma forma, a análise de infravermelho médio de amostras com concentrações conhecida de pectina cítrica isolada adicionada à água milli-Q sob condições de vácuo e tempo controlado, revelou espectros bem resolvidos, o que permitiu uma discriminação das amostras por diferentes concentrações de pectina (Figura 5). Os grupamentos funcionais carbonila e ácido carboxílico, específicos da molécula de pectina apresentam-se em bandas típicas nas regiões 832cm^{-1} e 1736cm^{-1} respectivamente (29) e aparecem em evidência nos espectros conforme o aumento da % de pectina (Figura 5).

A relação entre o comprimento de onda dos grupos funcionais carbonila e ácido carboxílico e a concentração de pectina, ainda foi avaliada com a construção de uma curva padrão selecionando a absorbância dos grupos funcionais conforme a concentração de pectina (Tabela 3). Observou-se aumento da absorbância nos respectivos comprimentos de onda selecionados (Ácido Carboxílico 1736cm^{-1} e Carbonila 832 cm^{-1}) com o aumento da concentração de pectina. A análise de correlação entre a concentração de pectina e absorbância em 1736cm^{-1} e 832 cm^{-1} apresentou alta correção (r=0.97 e 0.98), indicando potencial no uso destas regiões para determinação do teor de pectina solúvel utilizando a espectroscopia de infravermelho médio. Porém é importante salientar que, para amostras como grandes quantidades de açúcares, como suco de laranja, é necessário executar alguma prévia preparação da amostra para remoção destes açúcares.

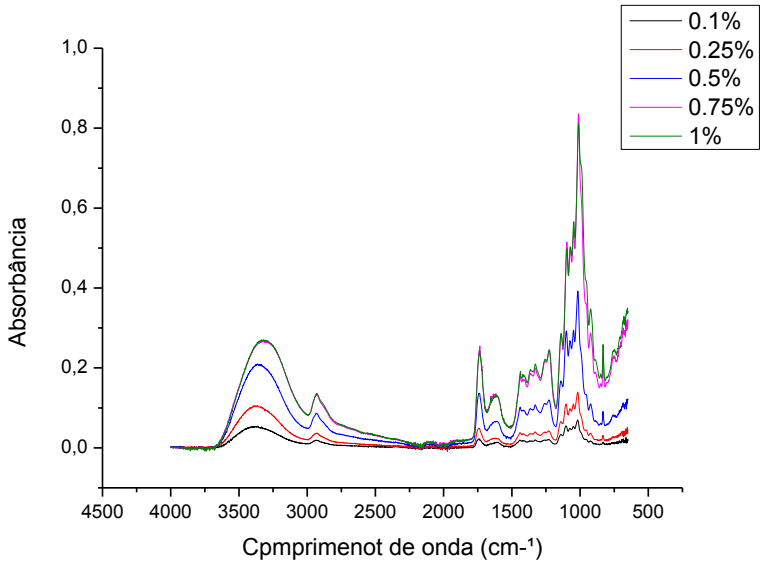


Figura 6.Espectro de MIR para diferentes concentrações de pectina cítrica.

Tabela 3. Relação entre concentração de pectina cítrica comercial e absorbância do Ácido Carboxílico e Carbonila.

[ ]Pectina	1736cm^{-1}	832 cm^{-1}
0,1	0,02	0,01
0,25	0,05	0,03
0,5	0,14	0,09
0,75	0,22	0,20
1	0,23	0,27

Desta forma, acredita-se que a pequena porção de pectina solúvel encontrada em sucos de laranja natural influenciou no mau desempenho dos modelos de PLSR por RMN-DT e MIR. Ainda a influencia dos demais componentes presentes no suco de laranja, como açúcares e ácidos orgânicos, também podem ter interferido na influência da variação de pectina sobre os espectros.

4. Conclusão

Os dois modelos de PLSR com elevados valores de erro e baixo coeficiente de determinação não demonstraram bom desempenho na predição de pectina solúvel. Entretanto, na análise de pectina isolada, os métodos não destrutivos obtiveram melhor desempenho em relação aos modelos de PLSR obtidos com as medidas do suco de laranja.

Para os dois modelos de PLSR desenvolvidos, acredita-se que a baixa proporção de pectina solúvel em água contida no suco de laranja e a interferência de componentes majoritários, como açúcares e ácidos orgânicos tenham interferido no desempenho da técnica para determinação do componente estudado.

Desta forma, as metodologias não destrutivas avaliadas neste estudo podem apresentar potencial para avaliação de parâmetros de qualidade de suco de laranja, entretanto necessitam de maiores estudos e viabilização em grande escala destas novas tecnologias.

Agradecimentos

Estamos gratos a FAPESP pelo apoio financeiro (concessão do projeto 13/ 23479-0), ao CNPq (bolsas projeto 303837-2013- 6, 403075/ 2013-0) e CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Referências

1. Tiwari BK, O' Donnell CP, Muthukumarappan K, Cullen PJ. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. LWT - Food Sci Technol [Internet]. Swiss Society of Food Science and Technology; 2009;42(3):700–4. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.009

2. Vervoort L, Van Der Plancken I, Grauwet T, Timmermans RAH, Mastwijk HC, Matser AM, et al. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. Innov Food Sci Emerg Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;12(4):466–77. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.06.003

3. Belton PS, Colquhoun IJ, Hills BP. Applications of NMR to Food Science. Annu Reports NMR Spectrosc. 1993;26(C):1–53.

4. van Duynhoven J, Voda A, Witek M, Van As H. Time-domain NMR applied to food products [Internet]. 1st ed. Vol. 69, Annual Reports on NMR Spectroscopy. Elsevier Ltd.; 2010. 145-197 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0066-4103(10)69003-5

5. Kim MK, Kim MY, Lee K-G. Determination of furan levels in commercial orange juice products and its correlation to the sensory and

quality characteristics. Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;211:654–60. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616308032

6. Dahdouh L, Wisniewski C, Ricci J, Vachoud L, Dornier M, Delalonde M. Rheological study of orange juices for a better knowledge of their suspended solids interactions at low and high concentration. J Food Eng. 2015;174:15–20.

7. Briongos H, Illera AE, Sanz MT, Melgosa R, Beltrán S, Solaesa AG. Effect of high pressure carbon dioxide processing on pectin methylesterase activity and other orange juice properties. LWT - Food Sci Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2016; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643816304807

8. Ellerbee L, Wicker L. Calcium and pH influence on orange juice cloud stability. J Sci Food Agric. 2011;91(1):171–7.

9. Oulé KM, Dickman M, Arul J. PROPERTIES OF ORANGE JUICE WITH SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE TREATMENT. 2013;(July 2011):1693–710.

10. Croak S, Corredig M. ARTICLE IN PRESS The role of pectin in orange juice stabilization : Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. 2006;20:961–5.

11. Chen Q, Zhang C, Zhao J, Ouyang Q. Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. TrAC - Trends Anal Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;52:261–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.007

12. Santos PM, Pereira-Filho ER, Colnago LA. Detection and quantification of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR). Microchem J [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;124:15–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X15001502

13. Salomonsen T, Sejersen MT, Viereck N, Ipsen R, Engelsen SB. Water mobility in acidified milk drinks studied by low-field 1H NMR. Int Dairy J. 2007;17(4):294–301.

14. Castell-Palou A, Rossell?? C, Femenia A, Bon J, Simal S. Moisture profiles in cheese drying determined by TD-NMR: Mathematical modeling of mass transfer. J Food Eng [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;104(4):525–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.01.010

15. Ribeiro R de OR, Máralém ET, Carneiro C da S, Monteiro MLG, Conte Júnior CA, Mano S, et al. Classification of Brazilian honeys by physical and chemical analytical methods and low field nuclear magnetic resonance (LF 1H NMR). LWT - Food Sci Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;55(1):90–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.004

16. Povlsen VT , Rinnan Å , Van Den Berg F, Andersen HJ, Thybo AK. Direct decomposition of NMR relaxation profiles and prediction of sensory attributes of potato samples. LWT - Food Sci Technol. 2003;36(4):423–32.

17. Rodríguez Ó, Eim VS, Simal S, Femenia A, Rosselló C. Validation of a Difussion Model Using Moisture Profiles Measured by Means of TD-NMR in Apples (Malus domestica). Food Bioprocess Technol. 2013;6(2):542–52.

18. Pereira FMV, Carvalho A de S, Cabeça LF, Colnago LA. Classification

of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. Microchem J [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;108:14–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.12.003

19. Viegas TR, Mata ALML, Duarte MML, Lima KMG. Determination of quality attributes in wax jambu fruit using NIRS and PLS. Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;190:1–4. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.063

20. de Oliveira GA, de Castilhos F, Renard CMGC, Bureau S. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. Food Res Int [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;60:154–62. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.051

21. Bellon-Maurel V, McBratney A. Near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic techniques for assessing the amount of carbon stock in soils - Critical review and research perspectives. Soil Biol Biochem [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;43(7):1398–410. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.019

22. Bureau S, Ruiz D, Reich M, Gouble B, Bertrand D, Audergon JM, et al. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;115(3):1133–40. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.100

23. Bureau S, Ścibisz I, Le Bourvellec C, Renard CMGC. Effect of sample

preparation on the measurement of sugars, organic acids, and polyphenols in apple fruit by mid-infrared spectroscopy. J Agric Food Chem. 2012;60(14):3551–63.

24. Galant AL, Widmer WW, Luzio GA, Cameron RG. Characterization of molecular structural changes in pectin during juice cloud destabilization in frozen concentrated orange juice. Food Hydrocoll [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;41:10–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.013

25. Visser J, Engelsen SB, Veterinary TR, Science F. Quantitative Vibrational Spectroscopy on Pectins. Prediction of the Degree of Esterification by Chemometrics. 1996;541–8.

26. Filippov MP. Practical infrared spectroscopy of pectic substances. Food Hydrocoll [Internet]. Elsevier Ltd.; 1992;6(1):115–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80060-X

27. Aghajanzadeh S, Ziaiifar AM, Kashaninejad M, Maghsoudlou Y, Esmailzadeh E. Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice. J Food Eng [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;185:72–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.04.004

28. Ladaniya MS. Fruit Biochemistry. Citrus fruit Biol Technol Eval. 2008;150, 193–7.

29. Kacŭráková M, Wilson RH. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. Carbohydr Polym. 2001;44(4):291–303.

Considerações Finais

Os métodos analíticos avaliados por RMN-DT, NIR e MIR aliados à quimiometria demonstraram potencial para avaliação de parâmetros de qualidade em laranjas intactas assim como no suco de laranja.

Utilizando os sinais de RMN-DT obtidos de laranjas intactas associados à análise de PLSR, foi possível prever a espessura da casca, pectina total, massa da fruta, massa da casca, massa de suco e pH. Entretanto, para predição de pectina solúvel em suco de laranja este método não demonstrou-se eficiente. Onde o mau desempenho pode ser atribuído à baixa proporção de pectina solúvel encontrada no suco de laranja ou também à interferência de componentes majoritários no suco.

A análise de PLSR utilizando sinais de infravermelho próximo (NIR) foi capaz de validar parâmetros de qualidade como, textura, pectina total e SST. Neste caso, o menor poder de penetração da luz da análise e a espessura da casca do fruto analisado podem ter dificultado a predição dos demais parâmetros de qualidade analisados.

Para o infravermelho médio (MIR) obteve-se a validação de modelos de PLSR para textura de laranjas intactas. Entretanto, a análise de MIR possui um poder de penetração da luz mais reduzido que o método de NIR, desta forma o modelo validado para predição da textura apresentou o erro mais elevado de predição em comparação aos demais métodos não invasivos utilizados.

Para predição de pectina solúvel em sucos de laranja, os métodos de RMN-DT e MIR não demonstraram sensibilidade suficiente para análise de componentes minoritários. Ainda, acredita-se que componentes majoritários presentes no suco de laranja, como açúcares e ácidos orgânicos, tenham sobreposto a influência da pectina nas variações espectrais. Entretanto,os métodos não destrutivos avaliados apresentaram espectros bastante distintos nas medidas de diferentes concentrações de pectina cítrica comercia isolada, permitindo suas distinções. As absorbâncias dos grupos funcionais do ácido carboxílico e carbonila observadas nos dados espectrais

de MIR apresentaram alta correlação com a concentração de pectina cítrica comercial. Ainda, a redução da concentração de pectina comercial influenciou nos tempos de relaxação transversal, onde concentrações inferiores de pectina apresentaram decaimentos de RMN-DT mais longos e vice-versa.

Contudo,os métodos analíticos utilizados neste estudo apresentam grande potencial na avaliação de parâmetros de qualidade tanto em laranjas intactas como no suco, necessitando, assim, de maiores estudos para viabilização em grande escala destas novas tecnologias.

Referências

1. IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola [Internet]. Vol. 29, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. p. 83. Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publ_completa.shtm
2. FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations [Internet]. The Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Available from: http://faostat.fao.org
3. Ladaniya MS. Fruit Biochemistry. Citrus fruit Biol Technol Eval. 2008;150, 193–7.
4. Belitz HD, Grosch W. Química de los alimentos. 1988. 91 p.
5. Coelho MT. Pectina : Características e Aplicações em Alimentos. Universidade Federal de Pelotas; 2008.
6. Ros JM, Schols H a., Voragen AGJ. Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic hairy regions. Carbohydr Polym. 1998;37:159–66.
7. Walstra, P; Van Vliet T. Quimica de Alimentos de Fennema. In: Quimica de Alimentos de Fennema. 2010. p. 611–60.
8. De Roeck A, Sila DN, Duvetter T, Van Loey A, Hendrickx M. Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. Food Chem. 2008;107(3):1225–35.
9. Mirhosseini H, Tan CP, Hamid NSA, Yusof S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ??-potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. Colloids Surfaces A Physicochem Eng

Asp. 2008;315(1–3):47–56.

10. Cerdán-Calero M, Izquierdo L, Sentandreu E. Valencia Late orange juice preserved by pulp reduction and high pressure homogenization: Sensory quality and gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatiles. LWT - Food Sci Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;51(2):476–83. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.016
11. Sentandreu E, Gurrea MADC, Betoret N, Navarro JL. Changes in orange juice characteristics due to homogenization and centrifugation. J Food Eng [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;105(2):241–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.027
12. Cho BK, Chayaprasert W, Stroshine RL. Effects of internal browning and watercore on low field (5.4 MHz) proton magnetic resonance measurements of T2 values of whole apples. Postharvest Biol Technol. 2008;47(1):81–9.
13. Synytsya A, Čopíková J, Matějka P, Machovič V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. Carbohydr Polym. 2003;54(1):97–106.
14. Atta-ur-Rahman, Choudhary MI, Atia-tul-Wahab. Solving Problems with NMR Spectroscopy [Internet]. Solving Problems with NMR Spectroscopy. 2016. 431-494 p. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124115897000103
15. Ribeiro FZ. Avaliação da qualidade de frutas por Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução. Universidade de São Paulo; 2008.
16. Gil VMS, Geraldes CF de GC. Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações. 1987.
17. Claridge TDW. High-resolution NMR techniques in organic chemistry.

Tetrahedron Org Chem Ser ; 1999;19:xiv, 382 .

18. De Andrade FD. Desenvolvimento de sequências de pulso de eco de spin de baixa potência para RMN on-line. Universidade de São Paulo; 2011.
19. Fischer WB, Eysel HH, Nielsen OF, Bertie JE. Corrections to the Baseline Distortions in the OH-Streach Region of Aqueous solution. App Spec. 1994;48(1):107–12.
20. Bellon-Maurel V, McBratney A. Near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic techniques for assessing the amount of carbon stock in soils - Critical review and research perspectives. Soil Biol Biochem [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;43(7):1398–410. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.019
21. Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. 25 Years of Chemometrics in Brazil. 2006;29(0):1401–6.
22. Alamar PD, Caramês ETS, Poppi RJ, Pallone JAL. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. Food Res Int [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;85:209–14. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916301673
23. Chen Y. Reference-related component analysis: A new method inheriting the advantages of PLS and PCA for separating interesting information and reducing data dimension. Chemom Intell Lab Syst [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;156:196–202. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016974391630137X
24. Divya O, Mishra AK. Combining synchronous fluorescence spectroscopy with

multivariate methods for the analysis of petrol-kerosene mixtures. Talanta. 2007;72(1):43–8.

25. Daszykowski M, Walczak B, Massart DL. A journey into low-dimensional spaces with autoassociative neural networks. Talanta. 2003;59(6):1095–105.
26. Rajalahti T, Kvalheim OM. Multivariate data analysis in pharmaceutics: A tutorial review. Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;417(1–2):280–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.019
27. Jaumot J, Eritja R, Navea S, Gargallo R. Classification of nucleic acids structures by means of the chemometric analysis of circular dichroism spectra. Anal Chim Acta. 2009;642(1–2):117–26.
28. Ribeiro JS, Teófilo RF, Augusto F, Ferreira MMC. Simultaneous optimization of the microextraction of coffee volatiles using response surface methodology and principal component analysis. Chemom Intell Lab Syst. 2010;102(1):45–52.
29. Beebe KR, Pell RJ, Beth M, Wiley SJ. Book reviews. 2001;95–6.