



ESTUDO PRELIMINAR DA QUIMIOMETRIA E RMN DE BAIXO CAMPO: FERRAMENTAS PARA PREVISÃO DE QUALIDADE EM LARANJAS

D.W.M. Flores¹, S.Z. Hubinger², A. Labegalini³, M.D. Ferreira², M.H.F. Spoto¹, L.A. Colnago²

- (1) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Avenida Pádua Dias, 13418-260, Piracicaba, SP, douglasflores@usp.br, martaspoto@usp.br
- (2) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, silviane.hubinger@embrapa.br, marcos.david@embrapa.br, luiz.colnago@embrapa.br
- (3) Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Rodovia Washington Luís, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, amanda.labegalini@gmail.com

Resumo: Atualmente o método mais utilizado na determinação dos sólidos solúveis de diversos tipos de frutas utiliza a medida do índice de refração, que é um método destrutivo. Um sistema que pode ser alternativo ao índice de refração é o uso da técnica não invasiva de ressonância magnética nuclear (RMN) em baixo campo magnético. O objetivo deste trabalho é utilizar a RMN e construir modelos de correlações com o teor de sólidos solúveis de laranjas Pera Rio intactas, variando os métodos de pré-processamento (suavização por filtro de Savitsky-Golay e SNV - *Standard Normal Variate*) e os modelos de calibração (Mínimos Quadrados Parciais (PLS - *Partial Least Squares*) e (Regressão em Componentes Principais (PCR - *Principal Component Regression*)). Os resultados mostraram pequenas variações dentre os pré-processamentos, mas revelaram que a suavização de Savitsky-Golay removeu o ruído existente na RMN e foi preferida em relação a SNV. Os modelos avaliados e a técnica de RMN demonstraram promissores resultados para análise não invasiva do teor de sólidos solúveis, com ligeira vantagem do algoritmo PLS em relação ao PCR.

Palavras-chave: RMN, laranjas, quimiometria, qualidade, pré-processamento.

PRELIMINARY STUDY OF CHEMOMETRY AND LOW FIELD NMR: TOOLS FOR PREDICTION OF QUALITY IN ORANGES

Abstract: Nowadays, the most used method for measurements of soluble solids in fruit is based on refractive index, that is a destructive method. An alternative non-invasive technique to measure soluble solids is the Low Field Nuclear Magnetic Resonance. The aim of this work is to use NMR to build correlation models considering the soluble solids content of intact oranges (Pera Rio). It consists in to vary methods of preprocessing (filter Savitsky-Golay and SNV - *Standard Normal Variate*), calibration models (PLS - *Partial Least Squares*) besides Principal Component Regression (PCR - *Principal Component Regression*). The results showed a slight variation among the pre-processing, revealing the elimination of the noise in NMR by Savitsky-Golay treatment and is preferred over SNV. The evaluated models and NMR technique showed promising results for non-invasive analysis of soluble solids content, with some advantage in relation to PLS algorithm when compared to PCR.

Keywords: NMR, oranges, chemometry, quality, preprocessing.

1. Introdução

No ramo da fruticultura, a citricultura é a que mais se destaca mundialmente, sendo a cultura mais produzida no mundo. O suco mais consumido é o de laranja representando, em 2013, 48% do consumo mundial de sucos 100% natural, 20% do consumo de néctares e 30% do consumo de refrescos (ANESC, 2014).

Os sólidos solúveis totais desempenham um papel primordial para a sua qualidade, devido a influência nas propriedades físicas, químicas e biológicas da fruta (COSTA et al, 2004). Além disso, o teor dos sólidos solúveis (°Brix) nos frutos é muito importante para a indústria. Quanto maior a quantidade de sólidos solúveis existentes, maior será o rendimento de suco quando processado, diminuindo o custo de produção (ARAÚJO, 2001; SILVA, 2000).

O método mais utilizado na determinação dos sólidos solúveis de diversos tipos de frutas utiliza a medida destrutiva do índice de refração, que estima a quantidade dos sólidos solúveis pela diminuição da velocidade da luz quando esta passa através da amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Os usos de técnicas de medição não destrutivas são desejáveis para frutas e outros vegetais, pois auxiliam no acompanhamento dos parâmetros de qualidade sem a necessidade de se descartar o fruto, permitindo avanços em estudos relacionados à pós-colheita.

Um sistema não invasivo alternativo, é o uso da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) em baixo campo magnético, que já começou a ser utilizada na análise rápida de propriedades físico-químicas de frutos intactos e até mesmo embalados (RIBEIRO et al., 2010, PEREIRA et al., 2013). A RMN de baixo campo vem sendo empregada para investigar o amadurecimento de frutas intactas e parâmetros internos de qualidade (RAHMATALLAH, 2006). Em 2013, Pereira e colaboradores classificaram ameixas frescas intactas de acordo com a presença de sólidos solúveis em maior ou menor quantidade, usando RMN no domínio do tempo associado à quimiometria.

Com base nestes estudos, o objetivo do trabalho é utilizar a RMN de baixo campo através da técnica de CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill) e construir modelos quimiométricos de correlações com o teor de sólidos solúveis de laranjas intactas.

2. Materiais e Métodos

Foram utilizados neste experimento 70 laranjas *Citrus Sinensis L. Osbeck* da variedade Pera Rio (35) e Hamlin (35), obtidos em comércio local de São Carlos, SP.

As frutas foram selecionadas de tamanho médio entre 65 a 71 mm de diâmetro e com ausência de defeitos graves, higienizados e acondicionados em câmara fria a $10 \pm 1,5^\circ\text{C}$ e U.R. $80\% \pm 10$ na Embrapa Instrumentação de São Carlos, SP.

Para as análises foram utilizados 35 frutos por dia, totalizando 2 dias de testes. Antes das análises, as frutas foram condicionadas por doze horas a $21 \pm 1,0^\circ\text{C}$ e U.R. $50 \pm 15\%$, condições mantidas durante as análises. As frutas foram medidas no equipamento de RMN e depois realizou-se a extração do suco via extrator convencional para medidas do teor de sólidos solúveis totais.

2.1. Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo (RMN)

As medidas de relaxação transversal por RMN em baixa resolução foram realizadas em espectrômetro SLK com campo magnético estático (B_0) de 0,21 T (8,5 MHz para ^1H) e área útil de 10 cm de diâmetro por 10 cm de comprimento em condições controladas de laboratório. O método utilizado foi por CPMG, onde a sequência de pulsos gera um decaimento exponencial com o tempo de relaxação transversal (T_2). Os parâmetros de aquisição foram: pulso de $90^\circ = 32\mu$, tempo de eco de $\tau = 5000\mu\text{s}$, e número total de ecos igual a 1500 com 8 médias cada coletando apenas os ecos pares.

2.2. Teor de sólidos solúveis totais (SST)

Foram medidos em triplicata com refratômetro digital de bancada, modelo RX-5000 Atago, com ajuste de temperatura de amostra para $25^\circ\text{C} \pm 0,05$. O resultado foi expresso em $^\circ\text{Brix}$ (A.O.A.C., 1992).

2.3. Processamentos dos dados e Quimiometria

Os sinais da RMN foram tratados realizando a normalização (0-1) dos dados e posteriormente realizado a média dos decaimentos.

A matriz $n \times m$ (amostras = n e as variáveis = m) para as análises multivariadas foram composta pelos valores dos decaimentos médios da RMN como sendo variáveis independentes e os valores do teor de sólidos solúveis como variáveis dependentes. Para as análises de regressão os dados foram centrados na média (*mean-center*).

Diferentes mecanismos de pré-processamento dos dados da RMN foram usados: suavização de segundo grau (*Savitzky-Golay filter*) com 21 janelas devido ao melhor ajuste ao sinal de RMN evitando perdas de informação; Variação Normal Padrão (SNV - *Standard Normal Variate*); ausência de pré-processamento e a união da suavização com SNV.

Os modelos de calibração utilizados foram Mínimos Quadrados Parciais (PLS - *Partial Least Squares*) e Regressão em Componentes Principais (PCR - *Principal Component Regression*) utilizando validação interna. Para a validação interna dos modelos foi utilizado *cross validation* com *leave-one-out* interno no conjunto de dados de calibração.

O número de fatores foi fixado em 4 empiricamente através de pré-testes realizados baseados em seu desempenho, facilitando assim a comparação dos diferentes pré-processamentos.

Os modelos realizados (PLS, PCR), bem como as porcentagens de variância explicada, o erro padrão da calibração - SEC ($^\circ\text{Brix}$), os coeficientes de correlação de Pearson (r) da validação e o erro padrão da validação - SEV ($^\circ\text{Brix}$), foram obtidos através do software *Pirouette v. 4.5 Infometrix, Inc. Bothell - WA*.

3. Resultados e Discussão

A estatística das 70 amostras revelou valores médios de sólidos solúveis de 9,73, mínimo de 6,14 e máximo de 12,31 $^\circ\text{Brix}$ com desvio padrão amostral de 1,64. Esta variação no conjunto amostral é fundamental para se obter modelos com alto poder de predição, uma vez que os modelos precisam ser calibrados com amostras que representem a maior variação possível existente no conjunto de amostras estudadas.

A técnica de RMN apresenta um problema em relação a ruído das medidas, portanto o filtro por suavização de Savitzky-Golay com 21 pontos de alisamento, foi usado para remover o ruído aleatório ao longo do decaimento. A variação normal padrão (SNV) foi testada para avaliar a melhora nos decaimentos de RMN, uma vez que ela normaliza cada decaimento em relação à média e à variação individual (NICOLAÏ et al., 2007).

Sobre os modelos utilizados, a PCR faz a decomposição da matriz X dos decaimentos de RMN por uma análise de componentes principais (PCA) e, em seguida, encaixa um modelo de regressão linear múltipla (MLR), usando um pequeno número de componentes principais (PCs) ou variáveis latentes em vez de variáveis originais como preditores. No entanto, em regressão PLS uma base ortogonal de variáveis latentes é construída, uma por uma, de tal forma que elas são orientadas ao longo de direções de covariância máxima entre a matriz de decaimentos de RMN de X e o valor de resposta Y (Y tal como SST em °Brix) (NICOLAÏ et al., 2007). A Tabela 1 mostra os resultados e diferenças encontradas para os dois modelos utilizados e os diferentes pré-processamentos.

Tabela 1. Resultados de diferentes pré-processamentos nos modelos.

Modelo	*PLS					*PCR				
	<i>r</i> Cal	SEC	<i>r</i> Val	SEV	Var. (%)	<i>r</i> Cal	SEC	<i>r</i> Val	SEV	Var. (%)
Pré-processamento										
Suavização	0,923	0,648	0,905	0,692	99,95	0,915	0,680	0,903	0,697	99,16
SNV	0,988	0,266	0,894	0,733	95,07	0,891	0,764	0,877	0,779	95,31
Suavização + SNV	0,953	0,512	0,884	0,761	99,16	0,906	0,712	0,889	0,743	99,23
Sem pré-processamento	0,946	0,544	0,898	0,715	99,38	0,915	0,681	0,903	0,698	99,46

*Fatores fixados em 4 para comparação; Mínimos Quadrados Parciais (PLS - Partial Least Squares) e Regressão em Componentes Principais (PCR - Principal Component Regression); SNV (Standard Normal Variate).

Quando comparamos a aplicação da suavização de Savitzky-Golay com a SNV observa-se que, para os modelos de PLS, houve um maior valor no coeficiente de correlação de calibração e menor valor no erro padrão de calibração (SEC). Porém, quando observamos o SEV e *r* Val a suavização apresentou melhores resultados. Os valores de SEC e SEV devem ser próximos, isto é um indicativo de melhor ajuste do modelo aos dados. Assim, verificamos que a suavização foi melhor que a SNV para os modelos de PLS. Já a união do SNV e suavização não demonstrou eficiência quando comparada às demais e sem processamento.

Os modelos de PCR apresentaram respostas diferentes aos pré-processamentos quando comparados ao PLS. Observamos que a aplicação da suavização de Savitzky-Golay juntamente com SNV apresentou valores (*r* Cal, *r* Val, SEC e SEV) similares ou inferiores aos obtidos com a aplicação da SNV e com os dados sem pré-processamentos.

Os resultados indicaram que a RMN atrelada aos modelos PLS ou PCR tem o potencial para estimar o teor de sólidos solúveis em laranjas intactas. Embora os modelos de PCR e PLS com diferentes pré-processamentos apresentem variações nos valores de SEC, SEV e *r* esses são valores promissores quando analisamos a questão prática da aplicação da técnica.

Ainda, os modelos de PLS atrelados ao pré-processamento de suavização Savitzky-Golay obtiveram resultados ligeiramente melhores para a validação do que os modelos de PCR. O fato do PLS ser ligeiramente melhor do que o PCR pode estar na diferença de transformação dos dados de entrada. Para que os resultados do PCR sejam similares ao PLS, é necessário que a variação das variáveis de entrada seja correlacionada com a variável de saída. Do contrário, se houver variações sem correlação com a variável de saída, os componentes principais não ajudarão a construir bons modelos de regressão.

Em 2006 GÓMEZ e colaboradores, compararam a eficiência desses modelos quanto a calibração e validação. E o fato do PLS obter um melhor desempenho pode estar relacionado ao inconveniente de que o modelo PCR utiliza os primeiros componentes principais em que alguns casos não contribuem de maneira positiva para a construção de bons modelos de regressão (WOLD et al., 2001).

4. Conclusões

A técnica de CPMG por ressonância magnética nuclear de baixo campo apresentou alta correlação entre seu decaimento e o teor de sólidos solúveis em laranjas intactas.

Dentre os diferentes pré-processamentos estudados, a suavização de 21 janelas Savitzky-Golay apresentou melhorias na criação de modelos de calibração utilizando a RMN de baixo campo. Entre os modelos estudados, o PLS atrelado a suavização de Savitzky-Golay apresentou melhores valores de SEV e *r* de validação, desta forma reduz o erro de aferição para novas amostras.

Estes resultados são promissores para a criação de modelos com maior número de amostras, incluindo uma nova etapa de validação externa para estimar os erros de predição e futura aplicação desta tecnologia como um sistema não invasivo para aferição de qualidade de laranjas.

Agradecimentos

Fapesp projetos nº 2013/23479-0 e 2012/20247-8 e Capes e pelo apoio financeiro.

Referências

- ARAÚJO, J. L. Propriedades termofísicas da polpa do cupuaçu. 2001. 85f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2001.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS - ANESC. Consumo de Sucos em Geral nos 40 principais mercados – Detalhado. Dados 2014. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com.br/exportadores-citricos/consumo/suco-de-laranja-detalhado-264758-1.asp>>. Acesso em: 25 ago. 2014.
- COSTA, W. S.; SUASSUNA FILHO, J.; MATA, M. E. R. M. C.; QUEIROZ, A. J. Influência da concentração de sólidos solúveis totais no sinal fotoacústico de polpa de manga. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 6, n. 2, p. 141-147, 2004.
- COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, supl.1, p. 15-19, 2010.
- GÓMEZ, A.H., HE, Y., PEREIRA, A.G., 2006. Nondestructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using VIS/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* 77, 313–319.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
- NICOLAÏ, B.M., BEULLENS, K., BOBELYN, E., PEIRS, A., SAEYS, W., THERON, K.I., LAMMERTYN, J., 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 46, 99–118.
- PEREIRA, F.M.V.; CARVALHO, A.S.;CABEÇA, L.F.;COLNAGO, A.C. Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Microchemical Journal* 108 (2013) 14–17.
- RIBEIRO, Z. F.; MARCONCINI, L. V.;TOLEDO, I. B.;AZEREDO, R. B. V.;BARBOSA, L. L.;COLNAGO, L. A. Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in banana during ripening: a new mechanism. *Journal of the science of food and agriculture*, London, v. 90, p.2052-2057, 2010.
- S. RAHMATALLAH, Y. Li, H. C. Seton, J. S. Gregory and R. M. Aspden, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, 222, 298.
- SILVA, L. D.; COSTA, R. C.; SUASSUNA FILHO, J.; CARVALHO, L. H. Espectroscopia fotoacústica de alguns polímeros na região do espectro. Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 26., 2003, Caxambu, Resumo... UFMG/ENFMC, 2003. v.1, p. 243.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP. Citros colorem Sudeste brasileiro de verde e laranja. *Visão Agrícola*, v. 1, n. 2, p. 90-99, 2004.
- WOLD, S., SJÖSTRÖM, M., ERIKSSON, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58, 109–130.