**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Sistemas não invasivos para classificação de laranjas por meio de
parâmetros físico-químicos**

Douglas William Menezes Flores

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Douglas William Menezes Flores
Tecnólogo em Alimentos

Sistemas não invasivos para classificação de laranjas por meio de parâmetros físico-químicos

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof. Dra. **MARTA HELENA FILLET SPOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Flores, Douglas William Menezes

Sistemas não invasivos para classificação de laranjas por meio de parâmetros físico-químicos / Douglas William Menezes Flores. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

98 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Análises não invasivas 2. Análise sensorial 3. Classificação de laranjas
4. Quimiometria 5. RMN 6. NIR 7. MIR I. Título

CDD 634.31
F634s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico aos meus queridos pais, Valdir e Eva.

A meus familiares.

Ao meu amor, Marília Bizzani.

AGRADECIMENTOS

À professora Marta Helena Fillet Spoto da ESALQ e ao Dr. Marcos David Ferreira da Embrapa pela confiança, pareceria e orientação ao longo deste período.

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago da Embrapa, pela amizade, ensinamentos e conselhos sempre pertinentes.

Às analistas, estagiárias e técnicos da Embrapa Instrumentação e do grupo de extensão em frutas e hortaliças da ESALQ, pela amizade e contribuição na realização deste trabalho: Silviane, Viviane, Marcelo, Milene, Guilherme, Joana, Tatiane, Edilson, Amanda e Marina.

Aos meus colegas e amigos que conviveram comigo durante este período e que contribuíram de alguma forma, muito obrigado.

Aos voluntários provadores da análise sensorial de suco de laranja. Aos funcionários e produtores que colaboraram com as frutas para os experimentos.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida em 2013.

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

EPÍGRAFE

*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que
seja enfrentado.” Albert Einstein*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 Qualidade pós-colheita	29
3.2 Ressonância magnética nuclear	30
3.3 Espectroscopia na região do infravermelho	34
3.4 Quimiometria	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Colheita e recepção dos frutos	39
4.2 Análises não invasivas de referência	40
4.3 Análises invasivas de referência	40
4.4 Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo (RMN)	41
4.5 Espectroscopias de infravermelho	42
4.6 Quimiometria	43
4.7 Classificações físico-químicas dos frutos e análise sensorial	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Análises de referência	53
5.2 Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo (RMN)	56
5.3 Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)	69
5.4 Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)	75
6. Classificação físico-química dos frutos	79
7. Análise sensorial	85
7.1 Testes de comparação pareada para RMN-PLS	85
7.2 Testes de comparação pareada para NIR-PLS	87
8 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	95

RESUMO

Sistemas não invasivos para classificação de laranjas por meio de parâmetros físico-químicos

O controle de qualidade de laranjas desde a colheita até a comercialização é realizado com base em análises físico-químicas. Todavia, estas análises são destrutivas. Neste cenário, sistemas não invasivos para aferir a qualidade, são alternativas promissoras. O objetivo do trabalho foi avaliar os métodos de análises não destrutivas como a Ressonância Magnética em baixo campo (RMN) e espectroscopias de infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR), associadas à quimiometria, para analisar parâmetros de qualidade de laranjas de forma não invasiva. O experimento ocorreu na unidade da Embrapa Instrumentação em São Carlos, SP. Foram coletadas 470 laranjas, obtidas em cultivos comerciais no interior do estado de São Paulo. As frutas passaram pelas etapas de seleção, higienização e sanitização. Em seguida, foram submetidas à análise não invasiva pelos equipamentos de RMN, NIR e MIR. Os parâmetros de qualidade avaliados foram, massa fresca, diâmetros longitudinal e transversal do fruto, teor de sólidos solúveis (SST), pH, acidez total titulável (ATT), índice de maturação (*ratio*) e rendimento de suco. Para os sinais de RMN foi aplicada a suavização de *Savitzky-Golay* com largura de janela de 21 pontos. Para os sinais de NIR foi aplicado a variação normal padrão (SNV) e para os sinais de MIR foi aplicada a normalização (0-1), seguido da segunda derivada. O modelo de predição foi construído utilizando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para cada parâmetro de qualidade. Os modelos desenvolvidos por RMN-PLS validados para predição foram: massa fresca; coeficiente de Pearson da predição (r) = 0,97, erro padrão da predição (SEP) = 13,57. Diâmetro longitudinal; r = 0,91 e SEP = 3,37. Diâmetro transversal; r = 0,92 e SEP = 2,73. SST; r = 0,81 e SEP = 0,88. Rendimento de suco; r = 0,78 e SEP = 3,26 e pH r = 0,74 e SEP = 0,17. Os parâmetros de índice de maturação e ATT não puderam ser validados utilizando RMN-PLS. Os modelos de NIR-PLS validados foram: SST; r = 0,92 e SEP = 0,71. ATT; r = 0,92 e SEP = 0,30. Os demais parâmetros não puderam ser validados por NIR-PLS. Para os modelos de MIR-PLS, o melhor resultado encontrado foi para validação interna do modelo de pH, r Validação = 0,80 e erro padrão da validação (SEV) de 0,16. A classificação desenvolvida utilizando os modelos de parâmetros físicos de RMN-PLS apresentaram acurácia para diâmetro transversal de 80,00%. As classificações por parâmetros químicos, como teor de sólidos solúveis revelou acurácia de 81,10% e para pH de 61,11%. Para as classificações por PLS-NIR para o *ratio* a acurácia foi igual a 87,95%. Os frutos classificados de forma não invasiva para a análise sensorial no teste de comparação pareada, apresentaram respostas significativas para sucos classificados pelos modelos de RMN-PLS a nível de $p=0,05$. Para os frutos classificados pelo NIR-PLS de forma não invasiva, a resposta ao segundo teste sensorial foi significativa a nível de $p=0,05$. Estes resultados comprovam a aplicabilidade destas técnicas como análises não invasivas para mensurar a qualidade de laranjas e classifica-las por parâmetros físico-químicos percebidos por provadores.

Palavras-chave: Análises não invasivas; Análise sensorial; Classificação de laranjas; Quimiometria; RMN; NIR; MIR

ABSTRACT

Non-invasive systems for oranges classification by means of physical and chemical parameters

The quality control for oranges, after the harvest until commercialization are carried based on physical-chemical parameters. However, these analyzes are invasive. In this scenario, non-invasive systems to measure quality are promising options. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) at low field and infrared spectroscopy (mid-infrared – MIR and near-infrared - NIR) were associated with chemometrics to analyze quality parameters in intact oranges. The experiment was carried at Embrapa São Carlos, SP. Four hundred and seventy oranges were obtained from commercial crops in the state of São Paulo. Samples were selected, cleaned and sanitized and then were submitted to non-invasive analysis by NMR, NIR and MIR equipment's. The evaluated reference quality parameters were fresh weight, longitudinal and transversal diameter, total soluble solids (TSS), pH, titratable acidity (TA), maturation index (ratio) and juice yield (%). For the non-invasive methods was applied pre-processing techniques on the signal. In NMR signal was applied Savitzky-Golay smoothing with 21 points width of window. For NIR signal was applied standard normal variant (SNV) and on the MIR signal normalization was applied (0-1), followed by the second derivative. The prediction model was constructed using partial least squares regression (PLS) for each quality reference parameter. The models developed by NMR-PLS validated by prediction were: fresh weight; Pearson coefficient prediction (r) = 0.97, standard error of prediction (SEP) = 13.57. Longitudinal diameter; r = 0.91 and SEP = 3.37. Transverse diameter; r = 0.92 and SEP = 2.73. SST; r = 0.81 and SEP = 0.88. Juice yield; r = 0.78 and SEP = 3.26. pH r = 0.74 and SEP = 0.17. The maturation index and titratable acidity parameters could not be validated using PLS-NMR. The validated NIR-PLS models were: SST; r = 0.92 and SEP = 0.71. ATT; r = 0.92 and SEP = 0.30. The others reference quality parameters were not validated by NIR-PLS. For models using MIR-PLS, the best result was found for internal validation of the pH model, r = 0.80 and standard validation error (SEV) 0.16. The classification models developed using NMR-PLS physical parameters showed accuracy in transverse diameter of 80.00%. The classifications by chemical parameters such as soluble solids revealed accuracy of 81.10% and 61.11% for pH. For classifications by PLS-NIR for the accuracy ratio was equal to 87.95%. Fruit classified noninvasively for sensory analysis in paired comparison test, showed significant responses to juices classified by NMR-PLS models at the level of p = 0.05. For fruit classified by NIR-PLS noninvasively, the answer to the second sensory test was significant at the level of p = 0.05. These results demonstrate the applicability of these techniques as non-invasive tests to measure the quality of oranges and sorts them by physicochemical parameters perceived by tasters.

Keywords: Non-invasive analysis; Sensory analysis; Oranges rating; Chemometrics: NMR; NIR; MIR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Efeito da aplicação de B_1 em M_0 no referencial rotativo (RIBEIRO, 2008).	31
Figura 2: Sequência de pulsos CPMG (RIBEIRO, 2008).	32
Figura 3: Decaimento exponencial do sinal de uma laranja obtido por CPMG.	33
Figura 4: Colheita dos frutos	39
Figura 5: Equipamento de ressonância magnética nuclear em baixo campo (RMN).	41
Figura 6: Equipamento de infravermelho próximo (NIR).	42
Figura 7: Equipamento de infravermelho médio (MIR).	43
Figura 8: Efeito da aplicação do filtro Savitzky-Golay. Lado B da figura representa o zoom no sinal na figura A.	56
Figura 9: Potência de modelagem das variáveis de RMN obtidas por PCA.	57
Figura 10: Sinais de CPMG médios da RMN de 300 laranjas sem suavização, normalizados (0-1) com a marcação das variáveis excluídas.	58
Figura 11: Sólidos solúveis medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN.	59
Figura 12: Massa fresca dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN.	60
Figura 13: Potencial Hidrogeniônico dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN.	61
Figura 14: Diâmetro longitudinal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN.	61
Figura 15: Diâmetro transversal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN.	62
Figura 16: Rendimento de suco dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN.	63
Figura 17: Modelos não validados por PLS-RMN para acidez titulável e ratio.	64
Figura 18: Sólidos solúveis medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa.	65
Figura 19: Massa fresca dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa.	66
Figura 20: Potencial Hidrogeniônico dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa.	66
Figura 21: Diâmetro longitudinal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa.	67
Figura 22: Diâmetro transversal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa.	67
Figura 23: Rendimento de suco dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa.	68

Figura 24: Sinais das 300 laranjas obtidos por NIR, originais sem tratamento com as variáveis excluídas (valores médios).	69
Figura 25: Potência de modelagem das variáveis de NIR.	70
Figura 26: Sólidos solúveis dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação interna.	71
Figura 27: Acidez total titulável dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação interna.	72
Figura 28: Potencial Hidrogeniônico dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação interna.	72
Figura 29: Sólidos solúveis dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação externa.	73
Figura 30: Acidez total titulável dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação externa.	73
Figura 31: Sinais de MIR originais sem normalização (0-1) e segunda derivada com a marcação das variáveis excluídas e utilizadas.	75
Figura 32: Potência de modelagem das variáveis de MIR.	76
Figura 33: Sólidos solúveis dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-MIR no conjunto de validação interna.	77
Figura 34: Valores de pH dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-MIR no conjunto de validação interna.	78
Figura 35. Acurácia da classificação RMN-PLS de laranjas por diâmetro transversal.....	79
Figura 36: Classificação para 1ª análise sensorial RMN-PLS (n = 110).....	80
Figura 37: Classificação para 2ª análise sensorial RMN-PLS (n = 60).....	81
Figura 38. Histograma da acurácia dos modelos de PLS-RMN.....	82
Figura 39: Classificação para 1ª análise sensorial NIR-PLS (n = 110).....	83
Figura 40: Classificação para 2ª análise sensorial NIR-PLS (n = 60).....	84
Figura 41. Histograma da acurácia dos modelos de NIR-PLS.	84
Figura 42: Histograma da 1ª análise sensorial RMN-PLS (n = 50).	86
Figura 43: Histograma da 2ª análise sensorial RMN-PLS (n = 60).	86
Figura 44: Histograma da 1ª análise sensorial NIR-PLS (n = 50).....	88
Figura 45: Histograma da 2ª análise sensorial NIR-PLS (n = 60).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises de referência das laranjas Hamlin e Valência.	53
Tabela 2: Modelos de calibração PLS-RMN.....	59
Tabela 3: Modelos em conjunto de validação externa.	65
Tabela 4: Modelos de calibração PLS-NIR.....	71
Tabela 5: Modelos PLS-NIR em conjunto de validação externa.	73
Tabela 6: Modelos de PLS-MIR em conjunto de validação interna.....	77
Tabela 7: Modelos de PLS-MIR em conjunto de validação externa.	78
Tabela 8: Análises de referência após a classificação.	80
Tabela 9: Análises de referência dos sucos após a classificação.....	81
Tabela 10: Análises de referência dos sucos após a classificação.....	82
Tabela 11: Análises de referência dos sucos após a classificação.....	83
Tabela 12: Testes de comparação pareada (RMN).....	85
Tabela 13: Testes de comparação pareada (NIR).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR - Reflectância total atenuada

ATT - Acidez total titulável

°Brix – 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

Ratio – Índice de maturação (SST/ATT)

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 SÍMBOLOS

γ = Razão magnetogírica

B_0 - Campo magnético estático

B_1 - Campo magnético oscilante

P - Momento magnético de spin

T_1 - Constante de tempo de relaxação longitudinal

T_2 - Constante de tempo de relaxação transversal

B - Coeficientes de regressão

M_0 - Magnetização resultante

μ_{xy} - Magnetização projetada no plano xy do sistema referencial rotativo

μ_z - Magnetização no estado estacionário

μ - Momento magnético nuclear

θ - Ângulo entre μ e B_0

τ - Intervalo entre pulsos

ω_0 = Frequência angular

1 INTRODUÇÃO

No cenário mundial da produção de frutas e hortaliças as exportações globais estão constantemente crescendo, no intervalo de 2000 a 2010 o mercado mundial já ultrapassou os US\$ 400 bilhões (FAOSTAT&WORLD BANK, 2013). A China, a Índia e o Brasil continuam sendo os maiores produtores de frutas do mundo, somando aproximadamente 236 milhões de toneladas (FAO, 2013). No Brasil, o levantamento sistemático da produção agrícola revelou que a produção de laranjas em 2014, voltou a crescer em relação à produção da safra de 2013, sendo o Estado de São Paulo, o maior produtor do país, com 68,6% de participação na produção nacional de 14,9 milhões de toneladas de frutas (IBGE, 2014).

No mercado global, a qualidade da fruta é um dos principais fatores que determinam o volume de exportação. Os parâmetros de qualidade da laranja, que são utilizados para aferir a qualidade dos frutos, são destrutivos e obtidos pela análise da composição química do suco extraído da fruta, como o teor de sólidos solúveis totais e a acidez total titulável. A indústria brasileira responde por mais da metade da produção mundial de suco de laranja, e utiliza estes parâmetros no controle das etapas de colheita e processos de fabricação dos sucos. Porém, para que o produto brasileiro apresente melhor rendimento e qualidade, há necessidade de um controle ágil, preciso e versátil, pois para exportação, é necessário que os produtos possuam qualidade compatível com o mercado internacional de destino (ROBARDS, 1995).

Neste cenário, vem crescendo a busca por sistemas não invasivos, que possibilitem medir a qualidade de frutos de forma não destrutiva. Equipamentos que não destruam a amostra para determinar os parâmetros internos de qualidade, com baixa frequência de manipulação e alta velocidade na medida, são alternativas promissoras para o aumento do rendimento industrial e o controle preciso de produção.

Desta forma, este trabalho visa avaliar métodos de análises não destrutivos, as quais possam ser utilizadas na cadeia produtiva de citros. Para tanto, as metodologias de Ressonância Magnética em baixo campo e espectroscopias de infravermelho foram pesquisadas. A espectroscopia de infravermelho é uma espectroscopia vibracional-rotacional que vem sendo constantemente estudada para aplicação como análises não destrutivas. As análises no infravermelho médio ocorrerem entre 200cm^{-1} e 4000cm^{-1} ; já o infravermelho próximo entre 4000cm^{-1} a 12500cm^{-1} . Estas propriedades permitem o estudo de diversos compostos, entre eles, os açúcares, vitaminas e ácidos presentes em frutos e seus respectivos sucos.

Alguns estudos utilizaram análises por espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR – *Near Infrared Spectroscopy*) para a determinação de açúcar em frutas (O'SHEA, 1985) e (OLIVEIRA, 2014) comparam modelos de detecção de carotenoides, ácidos orgânicos e açúcares no maracujá. Porém, para a espectroscopia na região do infravermelho ainda são necessários estudos que apresentem um modelo sólido, robusto, aplicável e testado para predição de açúcares e ácidos em laranjas de forma não invasiva e precisa.

Um sistema alternativo à espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR – *Mid Infrared Spectroscopy*), é o que emprega a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) em baixa resolução e em baixo campo magnético, cuja técnica traz benefícios em termos econômicos em relação ao RMN de alta resolução em alto campo magnético. Esta técnica já vem sendo estudada para na análise rápida de propriedades físicas e químicas de frutos intactos e até mesmo embalados (RIBEIRO et al., 2010, PEREIRA et al., 2013).

Diferentemente da espectroscopia de infravermelho, o equipamento de RMN é capaz de realizar a medida do fruto como um todo e apresenta características diferentes da espectroscopia de NIR e MIR. As análises pela RMN em baixo campo são baseadas nos tempos de relaxação dos sinais de RMN, conhecidos como tempo de relaxação longitudinal ou T_1 e tempo de relaxação transversal ou T_2 e na difusão molecular. A grande vantagem desses métodos é que se pode ter um aparelho de baixo custo em relação ao RMN de alto campo, que analisa amostras em grande volume e em alta velocidade, como frutas intactas, sem a necessidade de preparo da amostra e gasto com reagentes. Assim, a RMN tem sido empregada para investigar o amadurecimento de frutas intactas como uvas, ameixas, maçãs, peras, bem como, o efeito de injúrias mecânicas ocasionadas por exposição a baixa temperatura (RAHMATALLAH, 2006).

Em 2010, Ribeiro et al. verificaram que o efeito da variação dos níveis de oxigênio nos tecidos de bananas, que ocorre durante a maturação devido à respiração, tem ação sobre os sinais adquiridos pela técnica de *Carr-Purcell-Meibom-Gill* (CPMG) por RMN, o que indica a sensibilidade do equipamento em detectar mudanças químicas no ambiente interno de frutas. Em 2013, Pereira et al., 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.

Estes estudos indicam que as técnicas de RMN em baixo campo e de espectroscopias de infravermelho médio e próximo têm grande potencial para aplicação em frutas intactas,

gerando informações sobre a qualidade interna, de forma rápida e não invasiva quando comparado às atuais análises destrutivas, lentas e pouco eficientes da atualidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as técnicas de Ressonância magnética nuclear (RMN) em baixo campo e espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) associada à quimiometria na análise dos parâmetros de qualidade de frutos de forma não invasiva, utilizando a laranja como modelo.

2.2 Objetivos Específicos

Explorar e associar os sinais obtidos pelos equipamentos de RMN Baixo Campo, espectroscopia de infravermelho (NIR e MIR) com os parâmetros de qualidade, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, ratio, pH, massa fresca, diâmetros do fruto e rendimento de suco, utilizando ferramentas quimiométricas.

Avaliar o desempenho da aplicação de diferentes tipos de pré-processamento dos sinais de RMN, NIR e MIR, utilizando aplicação da normalização (0-1), segunda derivada, suavização *Savitzky-Golay* e variação normal padrão (SNV).

Aplicar a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para construir modelos de calibração, validação interna e avaliar a acurácia dos modelos de predição dos parâmetros de qualidade em laranjas de forma não invasiva.

Utilizar os modelos de PLS construídos para classificar frutos com base em intervalos de valores de teor de sólidos solúveis, acidez total titulável e pH. Em seguida, analisar o suco proveniente dos frutos classificados de forma não invasiva de diferentes classes por análise sensorial, empregando o teste de comparação pareada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Qualidade pós-colheita

A qualidade é definida como um conjunto de características que diferenciam as unidades individuais de um produto e possuem significância no grau de aceitabilidade pelo consumidor e que envolvem propriedades sensoriais, valor nutritivo e constituintes químicos. Os requisitos de qualidade se relacionam com o destino e armazenamento, consumo *in natura* ou processamento (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os parâmetros sensoriais que influem na qualidade de frutas e hortaliças são textura, sabor e aroma. A aparência é fundamental na valorização do produto, e compreende tamanho e cor. A coloração corresponde ao principal critério para a identificação do amadurecimento de frutos. E acontece pela degradação de pigmentos tais como a clorofila e a formação de novos, como, carotenoides e antocianinas. Fatores como variedade, maturação e tipo de processamento, desempenham papel importante na cor final do produto (SPOTO, 2006).

A textura é associada ao grau de amadurecimento dos frutos e à aceitação do consumidor. O amadurecimento causa amolecimento nos frutos, devido à solubilização das protopectinas em pectinas ou ácido pécico. Os frutos sofrem alterações devido ao amadurecimento, onde, ocorre o aumento na proporção de açúcares e diminuição dos ácidos orgânicos. Os componentes voláteis, como ésteres, aldeídos, óleos essenciais e cetonas, quando associados adequadamente a açúcares (glicose, frutose e sacarose) e ácidos orgânicos (cítrico, málico, tartárico e succínico), são responsáveis pelo sabor e pelo aroma das frutas (SPOTO, 2006).

O grau de doçura em frutas não climatéricas é definido pelo ponto de colheita, atributo determinado pelo teor de sólidos solúveis. Quanto menor este teor a fruta apresentar, mais ácida e não agradável ao paladar será, o inverso é também, verdadeiro. A relação entre teor de sólidos solúveis e o teor de ácidos orgânicos, expresso em acidez titulável, é também um critério de avaliação do sabor da fruta, podendo representar o grau de maturação, comumente denominado *ratio* (SPOTO, 2006).

Estes fatores, associados à laranja e seu suco obtido, são resultado de complexa combinação entre água, carboidratos, ácidos orgânicos, polpa, carotenoides, antocianinas e óleos essenciais. Encontram-se na laranja para processamento comercial teores de sólidos solúveis na faixa de 10 a 13°Brix, diretamente relacionados com os açúcares presentes, que conferem o sabor relativamente adocicado do suco. As relações acima de 15°Brix denotam sucos bastante doces. Os requisitos de qualidade são baseados em cor, teor de suco, teor de

sólidos solúveis, acidez total titulável, e proporção sólidos solúveis/acidez titulável denominada *ratio*.

Processadores na Flórida, Estados Unidos, convertem cerca de 85% da safra de citros em suco concentrado congelado, suco pasteurizado e outros produtos. Os frutos da mais alta qualidade são destinados para elaboração de suco concentrado e congelado, uma vez que, além de apresentar melhor sabor e aroma, tem melhor rentabilidade. Sucos com elevado teor de sólidos solúveis impulsionam a razão da rentabilidade (WARDOWSKI, 1999).

A maioria das fábricas de processamento de frutas comercializa a fruta com base no seu teor de sólidos solúveis, sendo lucrativo tanto para o produtor quanto para o processador, visto que, a indústria também comercializa o suco com base na relação entre o teor de sólidos solúveis e a acidez total (*ratio*). (WARDOWSKI, 1999).

Porém, os métodos atuais por amostragem são destrutivos e tem sua margem de erro, geralmente somente 85% dos sólidos solúveis lidos por um refratômetro é açúcar, por isso, a importância de boa padronização e classificação de laranjas é fundamental para garantia de qualidade e melhoria da remuneração nesta cadeia. Para isto, técnicas não invasivas, rápidas, e precisas com base em parâmetros de qualidade internos (*ratio*) unitariamente é a promessa nas linhas de processamento.

3.2 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que se fundamenta no registro da interação da rádio frequência com núcleos atômicos colocados sob a influência de um campo magnético (RAHMAN, 1995). Permite a observação de núcleos atômicos que possuam momento magnético nuclear ou spin $\neq 0$, como os núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , entre outros (GIL, 1987). Quando esses isótopos são submetidos a um campo magnético estático denominado B_0 , eles se orientam num movimento de precessão em relação ao eixo B_0 com velocidade angular igual a $\omega_0 = \gamma B_0$, onde γ = razão magnetogírica e ω_0 = velocidade angular de precessão (rad/s).

Para observar os sinais de RMN, é necessário perturbar a condição de equilíbrio térmico (vetor de magnetização resultante M_0 na direção Z). Tal perturbação é obtida quando um campo magnético oscilante, B_1 , gera um torque sobre a magnetização resultante M_0 fazendo com que ela se desloque para o plano xy, conforme a Figura 1.

Figura 1 - Efeito da aplicação de B_1 em M_0 no referencial rotativo (RIBEIRO, 2008)

O ângulo do deslocamento da magnetização (θ) depende de γ , da intensidade de B_1 e do tempo de duração do pulso (τ), onde $\theta = \gamma B_1 \tau$. Logo após o campo B_1 ser desligado inicia-se o restabelecimento do equilíbrio térmico. Esse fenômeno é conhecido como relaxação (CLARIDGE, 1999).

Após a perturbação do sistema, a magnetização retorna ao estado de equilíbrio térmico, onde $M_{xy} = 0$ e $M_z = M_0$. Essa relaxação, denominada relaxação longitudinal tem uma constante de tempo exponencial T_1 . Além disso, a magnetização pode perder coerência e desaparecer no plano xy, através da relaxação spin-spin ou transversal, com uma constante de tempo T_2 . Esses dois processos são usados para separação dos constituintes de uma amostra heterogênea, como uma fruta, em experimentos de RMN no domínio do tempo (RMN-DT). Esse método também é conhecido por RMN em baixa resolução, de bancada ou RMN em baixo campo (RUSHWORTH, 1973).

As aplicações da RMN podem ser divididas em tomográficas e espectroscópicas. Nas aplicações tomográficas normalmente são obtidas informações da distribuição espacial da água em tecidos biológicos, desde em seres humanos até alimentos. As aplicações espectroscópicas podem ser subdivididas em aplicações em alta e baixa resolução. A maioria dos experimentos de RMN de alta resolução usa espectrômetros de campo magnético alto (B_0 de 5 a 20 Teslas, equivalentes a frequência de ressonância de 200 a 900 MHz para o núcleo de ^1H), baseados em ímãs supercondutores (COLNAGO et al, 1996). O sinal de RMN obtido com a técnica pulsada, o decaimento livre induzido, (FID, do inglês *Free Induction Decay*) é processado com a Transformada de Fourier (TF) que gera um espectro no domínio da

frequência de onde se obtém os valores dos deslocamentos químicos, acoplamento spin-spin e outros parâmetros espectrais (GIL, 1987).

Os equipamentos de RMN-DT (baixa resolução) normalmente operam com campos magnéticos inferiores a 2 Teslas (80 MHz para o núcleo de ^1H). Esses espectrômetros, quando baseados em ímãs permanentes de pequeno porte (NORDON, 2001). Nestes tipos de aparelhos, o deslocamento químico praticamente não é observado e as medidas são baseadas principalmente nas diferenças de tempo de relaxação longitudinal, T_1 , e transversal, T_2 , dos vários componentes das amostras (RUTLEGDE et al, 1992).

As principais vantagens da RMN em relação aos métodos tradicionais são: técnica não invasiva, não destrutiva, rápida, mede uma fruta por inteiro não apenas um ponto como nas espectroscopias de infravermelho e não usa radiação ionizante como as técnicas raios X.

Relaxação Transversal T_2

A relaxação transversal (T_2) resulta da perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos individuais obtidos, com o pulso de rádio frequência, correspondendo a um processo entrópico. O método mais usado para a medida de T_2 é conhecido como CPMG, que traz as iniciais de seus autores: Carr-Purcell-Meibom-Gill. As sequências de eco como a CPMG (Figura 2) recuperam o sinal de RMN na forma de eco de spin, independente da não homogeneidade do campo. A sequência CPMG consiste de um pulso de rádio frequência de 90° , aplicado no eixo x' , seguido de um intervalo de tempo entre os pulsos (τ) e de um trem de pulsos de 180° , aplicado no eixo y' .

Figura 2 - Sequência de pulsos CPMG (RIBEIRO, 2008)

Inicialmente um pulso de $90^\circ x'$ é aplicado na magnetização resultante fazendo com que ela se desloque ao plano $x'y'$. Ao longo do tempo de intervalo τ , entre os pulsos, os spins

dispersam-se no plano $x'y'$. Com aplicação do pulso de $180^\circ y'$, ocorre a refocagem dos spins a um tempo τ , após esse pulso. Na sequência CPMG usa-se os ecos obtidos com pulsos pares para que as imperfeições da largura de pulso sejam canceladas. Com essa sequência obtêm um sinal como o da Figura 3, onde se obtêm um decaimento exponencial, cuja constante de tempo é T_2 (RIBEIRO, 2008).

Figura 3 - Decaimento exponencial do sinal de uma laranja obtido por CPMG

A RMN aplicada em produtos de origem animal e vegetal

Atualmente frutas, hortaliças e grãos desafiam as indústrias e produtores com relação à manutenção da qualidade durante toda a cadeia, desde o campo (ou estufa), passando pelo beneficiamento, até o consumidor final. Dentro desta cadeia de suprimentos, existe uma forte necessidade para ferramentas de inspeção rápida, de baixo custo, robusta e de qualidade.

A associação de RMN em baixo campo com análise multivariada abriu a possibilidade para avaliação não invasiva da qualidade de produtos hortícolas. Estudo realizado com maçãs mostrou que a mudança nos valores de T_2 associada com o vacúolo de maçã injuriada, indica a possibilidade de identificação de danos internos no fruto (CHO, 2008). Outra descoberta foi sobre os efeitos de variação em valores de T_1 e T_2 em vesículas de sucos de laranja que apresentaram detecção de danos por congelamento, devido às alterações nos tempos de relaxação (GAMBHIR, 2005).

A capacidade de espectroscopia de RMN para análise de lipídeos em diferentes alimentos inclui, não apenas a determinação dos teores, mas também identificação da composição de ácidos graxos desses lipídeos. Até a data, a técnica por RMN tem sido dedicada à quantificação de lipídeos em uma variedade de produtos agro-alimentares (animal e vegetal). Colnago et al. (2011) também demonstraram relevantes teorias e conceitos. Um método de RMN ^1H de pré-saturação de suprimir o sinal de H_2O determinou com sucesso o conteúdo de lipídeos em leite de $3,6 \pm 0,1\%$ (HU et al., 2007). O valor obtido por RMN estava em concordância com a determinada pelo método de Rose-Gottlieb, que determina o conteúdo de lipídeos por análise gravimétrica, após extração com éter dietílico (etoxietano) (HU et al., 2007).

Desde 1993, a RMN tornou-se um método oficial AOCS (*American Oil Chemical Society*, 2004), para determinar o conteúdo de gordura sólida (SFC) de óleos e gorduras na indústria de alimentos, especialmente na padaria, confeitaria e indústrias de margarina. O conteúdo de gordura sólida (SFC) refere-se à razão sólido / líquido do lipídeo a várias temperaturas. Muitas propriedades de alimentos contendo lipídeos, tais como o espalhamento, a firmeza, sensação na boca, processabilidade e estabilidade da margarina e manteiga, estão associados ao SFC.

3.3 Espectroscopia na região do infravermelho

O termo espectroscopia designa métodos analíticos, em que se estuda a interação de radiações eletromagnéticas com as moléculas. A ligação de dois átomos em moléculas envolve diferentes tipos de energia, tais como energia translacional, vibracional e eletrônica. No caso da espectroscopia na região do infravermelho, a interação se dá através dos movimentos relativos dos átomos numa molécula, isto é, de suas vibrações e rotações (PERKIN ELMER, 2007). Assim, a espectroscopia no infravermelho detecta a radiação que é absorvida pelas ligações moleculares.

No espectro eletromagnético a região do infravermelho encontra-se entre o espectro na faixa da luz visível e das micro-ondas, e subdivide-se em infravermelhos próximos ($4000 - 12500 \text{ cm}^{-1}$), médios ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) e distante ($10 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Assim, a região espectral do infravermelho próximo compreende o intervalo entre 800 e 2500 nm, para leituras em comprimentos de onda. Para que ocorra absorção por uma molécula é necessário que a radiação incidente nessa molécula provoque a excitação dos modos vibracionais de modo a que a sua energia corresponda à diferença de dois níveis energéticos vibracionais. Assim, as

absorções ocorrem a um determinado comprimento de onda, que corresponda à energia que permite a transição (HOLLAS, 2002).

A espectroscopia NIR gera espectros complexos, devido às sobreposições das absorções das ligações dos vários grupos funcionais como CH, OH e NH. Portanto, é necessário recorrer a métodos estatísticos multivariados para realizar a calibração, usando vários comprimentos de onda (HOLLAS, 2002). Sendo as ligações OH, CH, NH as que mais influenciam no espectro NIR, isso leva à possibilidade de determinação de múltiplos componentes de uma amostra, como a umidade, teor de lipídeos, proteínas e carboidratos.

Em relação à espectroscopia utilizando a região do médio MIR, uma das principais vantagens está relacionada à velocidade da análise e ao potencial de seleção e possibilidade de correlacionar diretamente com os dados de quimiometria, com o uso para diferenciações de amostras de alimentos, em especial para aspectos qualitativos e com eficiência e rapidez nas análises (REID et al, 2005; Downey et al., 1997).

Evoluções da Espectroscopia de Infravermelho

O desenvolvimento da espectroscopia do NIR passou por cinco etapas. Na primeira etapa, o processo de medição era conduzido fora de linha (*off-line*) com uma amostra retirada manualmente e transportada até o instrumento de medição. Na segunda etapa, o instrumento foi instalado nas proximidades do processo (*at line*), reduzindo o tempo de análise, o custo por análise e o uso de solventes perigosos. Na terceira etapa um sistema automático de amostragem foi utilizado para retirar a amostra, condicioná-la e levá-la ao instrumento analítico para medição (*on line*). O processo era conduzido de forma intermitente, requerendo a injeção de amostra no instrumento ou de forma contínua, permitindo o fluxo contínuo pelo instrumento.

A medição em linha permitiu obter informações analíticas a respeito do processo em tempos bem menores, possibilitando a otimização e controle do processo de maneira mais rápida. Na quarta etapa houve um avanço significativo no desenvolvimento da espectroscopia do NIR, uma vez que se tornou possível a medição *in situ*, isto é, na própria linha ou equipamento da planta, com auxílio de uma sonda instalada na linha do processo (*on-line*). A sonda deve ser quimicamente inerte e o espectrofotômetro de NIR pode ser instalado em um local seguro, de maneira que fibras ópticas sejam utilizadas para levar a informação da planta, onde a sonda está instalada, até o espectrofotômetro. Finalmente, o desenvolvimento de

técnicas de medição não invasiva complementou o avanço da espectroscopia do NIR. Análises não invasivas são aquelas realizadas sem o contato físico entre a sonda e a amostra, como as realizadas com auxílio de janelas de medição (WORKMAN, 1993).

3.4 Quimiometria

É uma área de estudo onde se aplicam métodos matemáticos/estatísticos de modo a delinear procedimentos experimentais para encontrar a máxima informação química relevante, através dos dados obtidos. Assim, esta técnica permite desenvolver modelos que estimem propriedades, por análise de outras propriedades. As análises quantitativas, realizadas em laboratório são na maioria das vezes demoradas e pouco precisas, assim, estão cada vez mais propícias a serem substituídas por técnicas instrumentais, como as espectroscopias de infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

Com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, e o acoplamento a computadores dedicados, tornaram-se possíveis novos tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático/estatístico, para relacionar os sinais obtidos com os resultados desejados. No caso da espectroscopia NIR, as bandas presentes nos espectros surgem de sobreposições e combinações de bandas de absorção, que geram um elevado número de sinais, sendo necessário recorrer a técnicas de quimiometria por análise multivariada para a determinação de concentrações dos componentes pretendidos. No caso da ressonância magnética nuclear (RMN), técnicas de análise de multivariadas podem ser usadas para analisar todo o decaimento gerado pelo equipamento e correlacioná-lo com propriedades físico-químicas e sensoriais. Dentre as técnicas mais utilizadas na quimiometria estão a análise de componentes principais (PCA) e o método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

A PCA é um método de redução e visualização de dados que constitui a base para o tratamento de dados multivariados. A aplicação mais importante da PCA é a redução do número de variáveis e a representação de uma tabela de dados multivariada em um espaço dimensional pequeno (MARTEENS, 2001). Em geral, o método de PCA é uma técnica multivariada capaz de realizar a compressão de dados e reduzir a dimensionalidade. Desta forma, o conjunto de dados pode ser utilizado para estudos de correlações entre os sinais obtidos por espectroscopias de infravermelho ou de ressonância magnética com análises de referência em uma dimensão reduzida e objetiva (LI, 2014).

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) tem objetivo de estabelecer um elo de ligação linear entre duas matrizes, os dados espectrais X e os valores de referência

(geralmente análises físico-químicas) Y . Esta técnica modela matematicamente as matrizes X e Y , a fim de descobrir as variáveis presentes em X que melhor descrevem Y . Por exemplo, a representação dos espectros de infravermelho no espaço de comprimentos de onda (matriz X), a fim de encontrar combinações lineares de comprimentos de onda que descrevem melhor a propriedade estudada (matriz Y) que pode ser, por exemplo, sólidos solúveis ou acidez titulável, pH entre outras análises de referência (WOLD, 2001; ADAMS, 1995).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Colheita e recepção dos frutos

As laranjas utilizadas durante o experimento foram colhidas manualmente em cultivos comerciais no interior do estado de São Paulo, Brasil (Figura 4).

Figura 4 - Colheita dos frutos

Após as colheitas os frutos foram transportados até a unidade da Embrapa Instrumentação de São Carlos, SP., Brasil, onde foram selecionadas por ausência de defeitos, doenças, higienizadas e sanitizadas por imersão em soluções cloradas de 200ppm por 5 minutos, formuladas a partir do produto comercial Sumaveg® (*Johnson Diversey*, São Paulo, Brasil) em seguida foram secas e armazenadas em câmara fria a $10^{\circ}\text{C} \pm 1,5$ com U.R. $85\% \pm 10$ por 5 dias até o início das avaliações, as quais foram realizadas em 12 dias, sendo utilizadas 25 laranjas por dia de medidas e realizadas em triplicata.

Para a construção dos modelos de calibração com validação interna e validação teste (externa) foram utilizadas 300 laranjas das variedades Hamlin (200) e Valência (100). Para a predição, classificação e análise sensorial foram colhidas outras 340 amostras, totalizando 640 frutos utilizados.

4.2 Análises não invasivas de referência

Massa fresca

Os frutos foram pesados individualmente em balança eletrônica de precisão de 0,1 g. Todas as massas foram expressas em gramas (g).

Diâmetros longitudinal e transversal do fruto.

Com auxílio de um paquímetro digital foram tomadas as medidas externas dos frutos, com resultados expressos em milímetros. O diâmetro longitudinal ou altura refere-se à medida que vai do pedúnculo ao ápice do fruto e o transversal, à medida na posição equatorial do fruto.

4.3 Análises invasivas de referência

As laranjas foram higienizadas e posteriormente cortadas na região equatorial. As duas metades de cada fruta foram espremidas em extrator convencional. Entre uma extração e outra de suco de cada laranja o extrator foi lavado e seco, para que não houvesse mistura entre os sucos das amostras. Após a extração individual de cada amostra, o suco resultante foi transferido a potes de 65 ml previamente esterilizados até a próxima análise.

Teor de sólidos solúveis (SST)

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

Acidez Total Titulável (ATT)

A análise da acidez total titulável foi obtida por titulação de 10ml de suco homogeneizado em 50 mL de água destilada, com solução de NaOH 0,1 N previamente padronizada com biftalato de potássio. Os resultados foram expressos em g de ácido cítrico por 100 g de polpa. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Potencial Hidrogeniônico (pH)

Representa a intensidade das condições ácidas ou alcalinas do meio líquido por meio da medição da presença de íons hidrogênio (H⁺). A medida foi realizada com o completo mergulho do eletrodo do equipamento pHs-3B pH meter em 20 ml de suco sob agitação.

Índice de maturação (ratio)

O índice de maturação foi calculado pela divisão do teor de sólidos solúveis (°Brix) pela acidez total titulável.

Rendimento de suco (%)

Para se obter o rendimento de suco, utiliza-se o peso da massa do suco extraído (g) dividido pela massa fresca do fruto (g) multiplicado por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem.

4.4 Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo (RMN)

As medidas de CPMG por RMN em baixa resolução foram realizadas em espectrômetro SLK-MRI-1400 (*Malagueño Córdoba, Argentina*) (Figura 5).

Figura 5 - Equipamento de ressonância magnética nuclear em baixo campo (RMN)

O equipamento de RMN possui 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.

A sequência CPMG utilizada, foi elaborada por Carr-Purcell-Meibom-Gill (CARR; PURCELL, 1954; MEIBOOM; GILL, 1958), onde a sequência de pulsos gera um decaimento exponencial com o tempo de relaxação transversal (T_2). Os parâmetros de aquisição foram: pulso de $90^\circ = 32\mu$ e $180^\circ = 64\mu$, tempo de eco de $\tau = 5000\mu\text{s}$, e número total de ecos igual a

1500 com 8 *scans* cada obtidos em duplicata para cada amostra. As medidas de RMN foram obtidas em laboratório com temperatura controlada a $21^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ e U.R. $50\% \pm 10$.

4.5 Espectroscopias de infravermelho

Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

As laranjas foram analisadas por reflectância em espectrômetro de infravermelho próximo comercial, modelo *Spectrum 100N* (*Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT*)(Figura 6).

Figura 6 - Equipamento de infravermelho próximo (NIR)

Foram espectros, com resolução de 16 cm^{-1} , de cinco pontos diferentes na região equatorial das frutas e utilizada a média de cada amostra para as análises quimiométricas.

Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)

As medidas na região do infravermelho médio foram realizadas no equipamento *Cary 630* (*Agilent, Walnut Creek, CA, EUA*), adquirido neste projeto, utilizando o acessório de reflectância total atenuada (ATR) (Figura 7).

Figura 7 - Equipamento de infravermelho médio (MIR)

Os espectros foram coletados na região $700\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ com resolução de 4 cm^{-1} e 64 *scans* cada para melhorar a relação sinal-ruído. Três espectros foram adquiridos através do contato do lado equatorial da fruta inteira com casca, com o cristal do acessório ATR. Cada laranja foi medida em três regiões diferentes e o sinal médio foi utilizado para as análises estatísticas.

4.6 Quimiometria

Pré-processamento dos dados de RMN, NIR e MIR

Para cada sinal dos equipamentos de RMN, NIR e MIR, foi calculada a média das aquisições como descrito nos itens 2.4 e 2.5.

Os procedimentos quimiométricos com os dados foram trabalhados nos *softwares* *Origin* 8.1 (*OriginLab, Northampton, MA, USA*) e *Pirouette* v. 4.5 (*Infometrix, Inc. Bothell – WA*).

Pré-processamentos em geral visam melhorar e eliminar ruídos e perturbações aleatórias na eletrônica presentes em sinais de RMN que podem dificultar os procedimentos de análise e calibrações. Com isso, os filtros digitais realizam a suavização dos sinais, na tentativa de minimizar ruídos nas medidas analíticas. Um dos filtros digitais mais utilizados pelos químicos analíticos é o filtro de *Savitzky-Golay* (BROWN, 2002; CHAU, 2004).

Após a aquisição dos sinais de RMN foi realizada a normalização dos sinais entre (0-1) dividindo a maior variável pelas demais para a padronização dos sinais e aplicada a

suavização de segundo grau *Savitzky–Golay* com 21 janelas, devido ao melhor ajuste ao sinal de RMN com base em pré-testes realizados. Realizada a normalização entre (0-1) e suavização dos dados, os decaimentos médios foram transpostos de colunas para linhas com a finalidade de construir a matriz geral para análise estatística.

O pré-processamento nos sinais de infravermelho é importante para minimizar possíveis flutuações nas linhas de base, espalhamento de luz entre a troca de amostras. Ainda é essencial para podermos exercer cálculos que sejam comparáveis e garantam repetibilidade e reprodutibilidade de modelos construídos. A aplicação da variação normal padrão (SNV) nos sinais de NIR apresentou resultados satisfatórios em relação a outras metodologias de pré-processamento em pré-testes realizados resultando em modelos com baixos valores de SEC, SEV e SEP para modelos validados.

Para o NIR os sinais médios obtidos referentes a cada amostra foram tratados com os pré-processamentos de variação normal padrão (SNV). Em seguida houve a transposição de colunas para linhas, para que cada amostra seja representada em uma linha diferente e as colunas sendo as variáveis correspondentes ao número de onda.

Para os sinais médios do MIR foi aplicada a normalização (0-1) e segunda derivada com 35 pontos de tamanho da janela, os dados também foram transpostos de linhas para colunas como realizado para o NIR.

Construção e composição das matrizes

A matriz “Y”($n \times m$) dos dados de referência foi composta por 300 linhas (n , amostras) e 8 colunas (m , análises). Cada linha representa a média de uma amostra diferente e cada coluna representa a média da variável dependente (análises de referência).

A matriz com os sinais de RMN “X”($n \times m$) foi construída, onde n representa o número de amostras em linhas e m as variáveis correspondentes aos decaimentos médios obtidos por CPMG em colunas. Cada decaimento da RMN contém 1500 colunas (m), desta forma cada amostra (n) possui 1500 variáveis independentes provenientes do sinal da RMN.

Da mesma maneira as matrizes “X”($n \times m$) para o infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR), foram construídas com as amostras sendo as linhas (n). O MIR apresenta 1798 colunas (m) que são as variáveis referentes ao intervalo do número de onda de 700 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Já o NIR apresenta 3001 colunas (m) que são as variáveis referentes ao intervalo do comprimento de onda de 12500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

Desta forma, a matriz geral dos dados de referência (matriz Y) foi inserida separadamente à cada matriz de dados com os sinais de RMN, NIR e MIR (matrizes X).

Individualmente para cada equipamento foram estabelecidas, três matrizes separadas (RMN, NIR e MIR) com 100% dos dados médios dos sinais e com os dados de referência (matriz Y) para cada equipamento.

Restando assim uma matriz para os dados de RMN e dados de referência. Uma matriz para os dados de NIR e dados de referência e uma matriz para os dados do MIR e dados de referência.

Para estas matrizes gerais de RMN, NIR e MIR contendo 100% dos dados médios de 300 laranjas (200 Hamlin e 100 Valências), foi aplicada uma divisão (70 - 30%) em dois conjuntos de dados. Um primeiro conjunto chamado de calibração e validação interna contendo 210 dados médios das laranjas (140 Hamlin e 70 Valências). Ainda, um segundo conjunto chamado de conjunto teste contendo 90 dados médios das laranjas (60 Hamlin e 30 Valências), com objetivo de validar externamente os modelos e aferir o erro de predição.

Análise exploratória dos dados

A análise de componentes principais (PCA) é uma poderosa ferramenta de visualização dos dados. Esta análise pode representar as relações entre amostras e variáveis graficamente. Além disso, proporciona a redução da dimensão dos dados. A PCA encontra as combinações lineares das variáveis independentes que representam as variações máximas existentes nos conjuntos analisados.

As matrizes de calibração dos sinais de RMN, NIR e MIR foram analisadas pela análise de componentes principais (PCA), para avaliar o poder de modelagem das variáveis ao longo dos sinais.

O potencial de modelagem aponta as variáveis importantes na construção de modelos de correlação. A contribuição de uma variável para construção de modelos de calibração é importante para otimizar o conjunto de dados que será utilizado reduzindo seu tamanho. Quando o valor do potencial de modelagem se aproxima de 1 a variável apresenta alta influência na correlação para o modelo. Já quando o valor diminui e se aproxima de 0 a variável não apresenta correlações, e ainda, em alguns casos pode apresentar correlações negativas.

Modelos de regressão e processamento das matrizes

Regressão Linear Múltipla

Para prever o valor y de análises de referências a partir de um conjunto de variáveis independentes x provenientes de medidas instrumentais x_j (onde $j = 1, 2, \dots, m$), é preciso primeiro estabelecer uma relação entre os dois conjuntos de medidas. Assim, se assume que y é linear a x :

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_mx_m + e \quad (1)$$

Onde, (b) representa os coeficientes de regressão para especificar a relação que se procura e (e) representa o componente de erro aleatório. Para um conjunto de amostras n ($i = 1, 2, \dots, n$):

$$y_i = b_0 + b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_mx_{im} + e_i \quad (1.2)$$

Na forma matricial (com os dados centrados na média), se obtém:

$$Y = XB + E; \text{ onde } E \sim N(0; \sigma^2 I) \quad (1.3)$$

Na equação 1.3 o erro possui distribuição normal com média zero e variância= σ^2 , onde, I é a matriz identidade. Já B será encontrado de forma a minimizar a soma de quadrados dos erros.

$$E'E = (Y - XB)'(Y - XB) \quad (1.4)$$

Assim:

$$Y - XB = 0 \quad (1.5)$$

Para satisfazer essa condição:

$$\hat{B} = (X'X)^{-1} X'Y \quad (1.6)$$

O processo de estimação dos parâmetros do modelo de regressão requer a inversão de uma matriz $n \times m$, assim se as colunas de X são linearmente dependentes ou possuem alta

correlação, então a matriz será singular ou quase singular e isto implica em uma estimação imprecisa dos parâmetros.

Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A regressão PLS representa uma alternativa para resolver o problema da multicolinearidade entre as variáveis independentes ou ainda quando o número de variáveis é superior ao número de amostras. Este método consiste na extração de um número pequeno de fatores ortogonais, que são combinações lineares das variáveis independentes originais e contém o máximo possível de sua variabilidade, e de forma a obter correlação com a variável dependente. Estes fatores são definidos como:

$$T=XW \quad (1.7)$$

T é a matriz de fatores ($t_1, t_2, \dots, t_a$) e W a matriz de pesos ($w_1, w_2, \dots, w_a$). As matrizes são então decompostas da seguinte forma:

$$X=TP'+F \quad (1.8)$$

$$Y=UC'+G \quad (1.9)$$

T e U são as matrizes de fatores de X e Y respectivamente, P' e C' são matrizes de cargas fatoriais e F e G são as matrizes de erros. Com a dimensão reduzida das variáveis, pode-se obter a regressão de Y sobre T na forma:

$$Y=TC'+E \quad (2.0)$$

$$Y=TC'+E=XWC'+E=XB+E \quad (2.1)$$

Assim:

$$B=WC' \quad (2.2)$$

O estimador de C é obtido por mínimos quadrados:

$$\hat{C}'=(T'T)^{-1} T'Y \quad (2.3)$$

E finalmente obtêm-se:

$$\hat{B} = W\hat{C}' \quad (2.4)$$

Crterios para avaliao dos modelos

Para o conjunto de amostras de validao, a soma de quadrados dos resduos da previso foi calculada:

$$PRESS = E^T E \quad (3)$$

O erro padro de previso (SEP, tambm chamada de erro quadrtico mdio de previso ou RMSEP), que est na mesma unidade de medida que a varivel y:

$$SEP = (PRESS/n_v)^{1/2} \quad (3.1)$$

Nas amostras do conjunto de calibrao, o erro padro denominado de erro padro de calibrao (SEC), que corrigido para o nmero de fatores k no modelo;

$$SEC = (PRESS/n_v - k)^{1/2} \quad (3.2)$$

Matrizes de calibrao e validao

As matrizes gerais descritas no item 2.6 com as anlises de referncia e com os sinais dos equipamentos de RMN, NIR e MIR foram inseridas e trabalhadas no *software Pirouette v. 4.5 Infometrix, Inc. Bothell - WA*.

Aps as matrizes inseridas no *software*, foi aplicada a centralizao dos dados na mdia (*mean-center*) para as anlises de regresso.

O modelo de regresso por mnimos quadrados parciais (PLS - *Partial Least Squares*) foi aplicado nas matrizes. Ainda, foi aplicada a validao interna dos modelos de calibrao, a validao cruzada (*cross-validation*) com *leave-one-out* interno.

O modelo de PLS, apresenta como resultados as porcentagens de varincia total explicada pelos fatores escolhidos, os coeficientes de correlao de Pearson (r), da calibrao (r Cal), validao (r Val) e da predio. Ainda, os erros padro de calibrao (SEC), validao (SEV) e predio (SEP), obtidos atravs do *software Pirouette v. 4.5 Infometrix, Inc. Bothell - WA*.

4.7 Classificações físico-químicas dos frutos e análise sensorial

Classificação de RMN-PLS por parâmetros físicos

Os frutos foram classificados seguindo o padrão de classificação de laranjas do CODEX Alimentarius. A norma classifica laranjas para o mercado conforme o calibre, onde este é determinado pelo diâmetro máximo da secção equatorial do fruto (Apêndice C. CODEX STAN 245, 2004).

Segundo a norma de classificação de citros da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP, 2011), laranjas acima de 71 mm são consideradas grandes, entre 65 e 71 mm médias e menores que 65 mm pequenas. Já o código estipulado pelo CODEX STAN 245 para laranjas acima de 71 mm compreende uma faixa de código entre 0-6, frutos entre 65 e 71 mm a faixa de código de 8-10 e para frutos menores que 65 mm a faixa de código é de 11-13. Com base nessas normas de classificação, foi determinado realizar a seleção para 3 classes de laranjas e então aplicar as respectivas faixas de códigos da norma CODEX-STAN 245.

Desta forma, para frutos com diâmetro latitudinal superior a 71 mm o código foi 0-6, para laranjas entre 65 mm e 71 mm o código foi 8-10 e para laranjas menores que 65 mm o código foi 11-13. Estas faixas de classificação foram escolhidas pelo fato de separar frutos pequenos de médios e de grandes, possibilitando representar uma seleção significativa em relação ao tamanho das laranjas. Assim, os frutos que apresentaram o valor de diâmetro latitudinal que compreendem as faixas de valores conforme os códigos foram separados.

Os valores medidos dos diâmetros longitudinais de referência foram cruzados com os valores preditos do mesmo para calcular a acurácia. Desta forma, as laranjas foram classificadas conforme o calibre em mm de seu diâmetro atendendo os requisitos das classes 11-13(< 65 mm), 8-10 (65-71 mm) e 0-6 (>71 mm).

Classificação de RMN-PLS por parâmetros químicos

Duas classificações foram realizadas com diferentes critérios e efetuada análise sensorial para cada classificação utilizada.

Para a predição, classificação e análise sensorial foram utilizadas 170 laranjas Valência. Estas amostras foram medidas pelo equipamento de RMN seguindo as mesmas condições utilizadas para construção da calibração, validação interna e teste dos modelos. Os sinais oriundos destas amostras foram normalizados (0-1), suavizados por meio do filtro *Savitzky*–

Golay, transpostos em matrizes e realizada a predição do teor de sólidos solúveis de forma não invasiva.

A primeira classificação (110 laranjas) realizada teve como base a predição dos teores de sólidos solúveis, os intervalos de classificação foram criados utilizando a média geral obtida, onde, as laranjas que apresentaram valores superiores à média foram classificadas como classe 1 (55 laranjas) e laranjas com teores inferiores à média foram classificadas como classe 2 (55 laranjas).

A segunda classificação (60 laranjas) realizada teve como base a predição do teor de sólidos solúveis modificando apenas o intervalo de classificação. Onde frutos com no mínimo 1°Brix acima da média foi classificado como classe 1 (30 laranjas) e frutos com no mínimo 1°Brix abaixo da média foi classificado como classe 2 (30 laranjas). Com objetivo de aumentar a diferença do teor de sólidos solúveis no suco final obtido entre as classes 1 e 2. As laranjas da primeira e segunda classificação foram então submetidas à análise sensorial.

Classificação de NIR-PLS por parâmetros químicos

Os modelos de PLS utilizando NIR selecionados para realizar as classificações foram referentes ao teor de sólidos solúveis e a acidez total titulável. Após a predição destes dois parâmetros foi obtido o índice de maturação “*ratio*” de cada laranja. As faixas de classificação estabelecidas foram criadas a partir da obtenção da média do *ratio* (teor de sólidos solúveis/acidez total titulável) das amostras. Com base nos resultados médios, as laranjas que apresentaram valores de *ratio* acima da média foram classificadas como classe 1 e abaixo da média como classe 2.

As acurácias das classificações para os modelos de PLS-NIR foram avaliadas pela aplicação do modelo em um conjunto de calibração (n = 210) e em conjunto de validação externa (n = 90) antes da aplicação da classificação em novas laranjas destinadas a análise sensorial. Assim foi comparado o valor de referência com o valor predito obtido e realizada a contagem dos acertos e erros da classificação para calibração e validação externa.

Acurácia das classificações físico-químicas

Para as classificações físico-químicas por meio dos modelos de PLS-RMN e PLS-NIR, quando o valor da classe medida por análises de referência é igual ao valor de classe predita pelos modelos citados, é computado um acerto pelo modelo de predição. Sendo assim, possível mensurar a acurácia do modelo de predição somando o total de acertos multiplicado por 100 e dividido pelo número de amostras do conjunto de calibração (210), e o mesmo

processo para o conjunto de validação (90). Obtendo assim, a acurácia do modelo para os dois conjuntos de medidas. A acurácia vai representar a precisão dos modelos em classificar frutos de forma não invasiva.

Análise sensorial

Para a realização da análise sensorial, foram coletados 340 laranjas da variedade Hamlin (170) e Valência (170). Estas laranjas foram misturadas e selecionadas 85 de cada variedade e aleatoriamente somado 170 frutas destinada a classificação por meio dos modelos de PLS-RMN. As outras 170 frutas foram para classificação pelos modelos de PLS-NIR.

A análise sensorial foi realizada com duas repetições, tanto para os modelos de PLS-RMN (170 frutas) e PLS-NIR (170 frutas). Na primeira repetição, das 170 frutas foram utilizadas 110 frutas para a classificação em classe 1 e classe 2. Na segunda repetição, foram utilizadas 60 frutas para classificação em classe 1 e classe 2 e realizada a análise sensorial.

Após a classificação não invasiva das laranjas pelos modelos de PLS-RMN e PLS-NIR, os frutos foram individualmente higienizados e classificados manualmente seguindo a orientação das classes 1 e 2. Em seguida, os frutos foram transportados ao laboratório de análise sensorial do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ-USP, para a realização dos testes sensoriais de comparação pareada.

Teste de comparação pareada

As laranjas foram temporariamente armazenadas a temperatura de $10^{\circ}\text{C} \pm 1,5$ e U.R. 80 ± 10 até o momento da extração do suco e início das análises. Os procedimentos utilizados foram iguais tanto para as classificações realizadas pelos modelos PLS-RMN e PLS-NIR.

A elaboração dos sucos ocorreu da seguinte forma, as laranjas de classe 1 foram novamente higienizadas em água corrente, sanitizadas pela imersão em solução de cloro a 200 mg.L^{-1} (dicloro isocianurato de sódio dihidratado - 3% de cloro ativo) durante 15 minutos, enxaguadas em água potável, drenadas em peneiras de aço inox por 10 minutos, retirada da água residual, mediante disposição em papel toalha, cortadas e realizada a extração do suco em extrator convencional previamente esterilizado com álcool a 70%.

Os sucos de todas as laranjas pertencentes à classe 1 foram homogeneizados e colocados em jarros plásticos de 1L previamente higienizados e codificados. Para as laranjas pertencentes à classe 2 foi realizado o mesmo procedimento, onde então, se obteve duas classes de sucos provenientes de laranjas classificadas de forma não invasiva. Os sucos foram

extraídos minutos antes do início do teste sensorial, mantendo sempre a característica de suco fresco natural.

Em seguida o teste de comparação pareada foi aplicado, onde cada provador recebeu 2 amostras com aproximadamente 45ml de suco de laranja em copos plásticos descartáveis de 80ml, acompanhado de um copo descartável com água potável. Em seguida, foi então solicitado ao provador a identificação da amostra de suco que apresentasse maior intensidade do gosto doce (Apêndice A).

As amostras de suco de laranja foram codificadas com 3 dígitos, sendo o dígito do meio o identificador, por exemplo: Amostra 234 e amostra 546, a primeira amostra representa o suco de classe 1 pois contém o dígito 3 no meio. Já a amostra 546 representa a classe 2 pois contém o dígito 4 no meio. Os demais dígitos foram gerados aleatoriamente. A apresentação das amostras para os provadores também foi aleatória (Apêndice B).

A equipe de provadores foi constituída de pessoas não treinadas, que foram convidadas a participar voluntariamente dos testes. Foram realizados 2 testes com 2 repetições cada, 50 provadores no primeiro e 60 provadores no segundo, avaliando cada nível de classificação para as duas classes. Cada tratamento representava o suco obtido dos frutos da classe 1 ou classe 2. Os resultados foram comparados com os valores da tabela (χ^2) para o Teste de Comparação Pareada Monocaudal ao nível de 5% de probabilidade (Apêndice D); quando o número de resposta corretas foi igual ao mínimo tabelado, concluiu-se que havia diferença sensorial entre as amostras ao nível de significância testado para as classes 1 e 2 (MEEILGAARD, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de referência

Os parâmetros de qualidade de laranjas são importantes para avaliação do comportamento das frutas, indicando formas de conservação, valoração e armazenamento. Para isso deve-se levar em consideração que os citros são frutos não climatéricos, os quais não amadurecem fora do pé. Portanto, se forem colhidos verdes, eles se apresentam com baixo teor de açúcar e elevados níveis de acidez, desvalorizando sua comercialização (AHMAD et al., 1992).

Os resultados das análises de referência mostram a amplitude da variação de cada parâmetro avaliado no conjunto amostral (Tabela 1). Esta variação é fundamental para representar modelos com aplicabilidade em escala real, uma vez que a regressão precisa ser calibrada com amostras que representem a variação existente no campo e no recebimento dos frutos pela indústria.

Tabela 1 - Análises de referência das laranjas Hamlin e Valência

Análises de referência	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Amostras
SST (°Brix)	7,56	14,60	10,84	1,41	300
ATT (g ac.cítrico/100g)	0,52	3,00	0,90	0,48	300
Ratio (SST/ATT)	4,29	21,59	11,39	3,09	300
Peso (g)	82,27	306,76	207,06	36,99	300
pH	2,74	3,93	3,55	0,26	300
Altura (mm)	53,57	89,78	73,50	7,17	300
Largura (mm)	51,69	84,51	73,27	5,23	300
Rendimento (%)	57,99	84,51	64,45	6,58	100

SST = Sólidos solúveis totais; ATT = Acidez total titulável; Ratio = razão SST/ATT.

Índice de maturidade do fruto - Ratio (SST/ATT).

As laranjas são consideradas maduras pela relação entre o teor de sólidos solúveis (SST) e a acidez total titulável (ATT) que expressa o índice de maturidade do fruto - *ratio* (SST/ATT). Durante o experimento as laranjas da variedade Hamlin não apresentaram valores deste índice menores que 10, não sendo possível obter uma variação no conjunto amostral, pois um modelo só com estas laranjas não representaria a variação real existente e não poderia ser validado e utilizado.

Desta forma, foi necessário aumentar o universo amostral com laranjas mais ácidas, ou seja, com valores de acidez titulável total mais elevados, assim os modelos foram calibrados com a variação existente no campo durante o período de safra das colheitas. Sendo assim, as

laranjas da variedade Valência foram coletadas no início da safra das tardias, onde estas apresentaram valores de acidez total titulável acima de 1,5 e até de 3,0 g de ácido cítrico/100 g, sólidos solúveis de 12,5°Brix e *ratio* de 9. Estes resultados estão de acordo com a literatura (SINCLAIR; RAMSEY, 1944).

A variedade Hamlin na época de final de colheita, apresenta valores reduzidos de acidez total titulável e sólidos solúveis, pois estes compostos são fontes de energia e são consumidos durante o processo respiratório. Os ácidos orgânicos atuam como uma fonte de sabor ácido. Laranjas da variedade Hamlin podem conter entre 0.20 e 0.30 % de ácido cítrico e a variedade Valência apresenta valores entre 0.30 e 0.80 % deste mesmo ácido. Em laranjas, a acidez total titulável por fruto aumenta durante o crescimento inicial, tornando-se constante durante o crescimento final e início da maturação e, por fim, sofre um decréscimo durante o amadurecimento e senescência do fruto (SINCLAIR; RAMSEY, 1944).

A diminuição da acidez titulável ao longo do tempo é associada à diluição, isso porque o fruto aumenta em tamanho e no teor de suco. Ainda, o quociente respiratório (CO_2 produzido / O_2 consumido) é maior que 1.00, o que indica a utilização dos ácidos, principalmente ácidos cítrico e málico, através do ciclo do ácido tricarbóxico, em que os ácidos são oxidados e a energia, em forma de adenosina trifosfato (ATP) é utilizada para a síntese de novos compostos (SINCLAIR e RAMSEY, 1944).

Potencial Hidrogeniônico (pH)

Outro fator para o suco de laranja é o pH, conforme observa-se na Tabela 1, a média de pH para Hamlin e Valência foi de 3,5. O pH de sucos cítricos também fornece informações sobre a acidez da fruta. Embora, seu teor expresse somente os íons totalmente dissociados dos ácidos, ao contrário da acidez titulável, cujos valores levam em consideração também os íons parcialmente dissociados, essa variável poderia ser uma forma de expressar a acidez do suco de laranja. O valor de pH do suco de laranjas da variedade Valência e Washington varia entre 2,9 e 3,9 (TING, 1983). O pH decresce com o aumento na concentração de ácido. Valores de pH acima de 3,5 podem caracterizar frutos menos ácidos, onde grande parte é referente às laranjas Hamlin. Já laranjas que apresentem valores de pH abaixo de 3,5 podem caracterizar frutos ácidos, grande parte destes é representado por laranjas da variedade Valência. Outra constatação, é que o sabor percebido em sucos cítricos pelos consumidores está relacionado com as medidas de pH; há uma forte correlação entre o pH e o efeito nas propriedades organolépticas do suco de laranja (TING, 1983, 1967 e 1971).

Massa fresca, diâmetro longitudinal e diâmetro transversal do fruto.

Fatores como a massa fresca, diâmetro longitudinal e diâmetro transversal do fruto são utilizados para a padronização de laranjas para o consumo *in natura* e também para a adaptação em equipamentos de extração de sucos nas indústrias visando o aumento do rendimento. Pela Tabela 1, a variação em massa fresca das laranjas Hamlin e Valência foi de 82g a 302g, onde, em média, as laranjas da variedade Hamlin apresentaram massa fresca maior em relação as laranjas da variedade Valência, dando suporte à relação de diluição da acidez e sólidos solúveis para as laranjas da variedade Hamlin e a concentração destes parâmetros para as laranjas da variedade Valência. A variação destes dados foi satisfatória e atendeu os requisitos de simular as faixas de massa fresca e tamanho e se adaptam à construção dos modelos.

Rendimento de suco

Souza, em 2009, obteve rendimento médio para laranjas Valência de 52 a 56%. Os valores de rendimento obtidos neste trabalho estão em média de 64% para Hamlin e Valência. Ainda, os dados estão em concordância com os demais parâmetros físico-químicos, como o *ratio* que foi maior para as laranjas da variedade Hamlin e menor para a Valência. Em 2009, Auler e colaboradores estudaram a qualidade de laranjas Valência, ao longo do período de safra e constataram que o *ratio* no primeiro mês de colheita (setembro) foi, em média, 8-9 e durante os meses seguintes crescem até atingir 13-14, em dezembro (AULER, 2009). Ainda, a massa fresca da variedade Hamlin foi, em média, maior que a variedade Valência. Contudo, o maior rendimento de suco referentes as frutas da variedade Hamlin pode estar atrelado ao fato que estas laranjas estavam em um estágio de maturação mais avançado que a variedade Valência, pelo fato destas estarem em final da safra.

5.2 Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo (RMN)

Um filtro de suavização de segundo grau *Savitzky-Golay* com 21 pontos de alisamento, foi utilizado para otimizar os sinais obtidos pelo CPMG utilizando RMN. Para os modelos em geral, houve melhora nos valores de coeficiente de correlação de *Pearson*. Especificamente, para o modelo de calibração construído para o teor de sólidos solúveis, ao se utilizar esta suavização houve um incremento do coeficiente de correlação de Pearson (r Cal) de 0,84 para 0,89 e um decremento do erro padrão de calibração (SEC) de 0,73 para 0,60, em relação ao não uso deste pré-processamento. O efeito visual da suavização no sinal, comparado com o sinal original, pode ser observada na Figura 8.

Figura 8 - Efeito da aplicação do filtro Savitzky-Golay, Lado B da figura representa o zoom no sinal na figura A

Com o maior desempenho dos coeficientes de correlação em função da aplicação da suavização de *Savitzky-Golay*, o estudo da seleção das variáveis suavizadas demonstrou os principais pontos de influência, na obtenção de modelos com alta correlação e com baixos erros agregados. A avaliação dos sinais sugeriu a exclusão das 200 últimas variáveis de RMN (Figura 9), com base na análise do poder de correlação das variáveis para a construção de todos os modelos por RMN. Ainda, os primeiros dez pontos foram excluídos com o objetivo de reduzir a influência da posição da amostra no equipamento. Observando a Figura 8, pode-se perceber que existem variáveis a partir de 1100 ao final do gráfico que poderiam ser excluídas já que possuem coeficientes de correlação abaixo de 0,7 e, desta forma, haveria

redução do tempo de medida pelo equipamento de RMN. Uma medida obtendo 1500 ecos no RMN teve duração de aproximadamente 1 minuto por amostra, tempo este que pode ser reduzido quando otimizado, conforme a necessidade, e assim, podendo chegar até menos de 10 segundos por amostra.

Figura 9 - Potência de modelagem das variáveis de RMN obtidas por PCA

Na Figura 10, pode-se observar a variação amostral nos 300 sinais médios das laranjas obtidos por CPMG, medido na RMN. Ainda, as 10 primeiras e 200 últimas variáveis foram excluídas durante a análise de variáveis para ganho de desempenho nos coeficientes de correlação dos modelos.

Figura 10 - Sinais de RMN médios de CPMG de 300 laranjas sem suavização e normalizados (0-1).

De maneira geral, na Tabela 2, os melhores modelos obtidos são os que apresentam baixos valores de erro padrão da validação (SEV) e de erro padrão da calibração (SEC) além de altos valores de coeficiente de Pearson da validação (r Val) e do coeficiente de Pearson da calibração (r Cal).

Desta forma, os modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) construídos para os sinais de RMN, com suavização *Savitzky-Golay* e com normalização entre 0-1, foram validados internamente utilizando o *cross-validation*. Portanto, os modelos obtidos foram os referentes ao teor de sólidos solúveis totais, pH, massa fresca, diâmetro longitudinal, diâmetro transversal e rendimento de suco. Já o modelo de acidez total titulável não apresentou baixos níveis de erros e correlações altas, e assim, não pode ser validado por meio do *cross-validation*. Desta forma, constatou-se a baixa capacidade do modelo de PLS-RMN em medir este parâmetro.

Tabela 2 - Modelos de calibração PLS-RMN

RMN	Fatores	SEV	r Val	SEC	r Cal	n Cal
SST(°Brix)	5	0,78	0,82	0,73	0,85	210
pH	5	0,19	0,71	0,18	0,75	210
Massa fresca(g)	5	12,51	0,93	11,67	0,94	210
Diâmetro longitudinal(mm)	7	2,91	0,85	2,53	0,89	210
Diâmetro transversal(mm)	8	1,85	0,92	1,50	0,95	210
ATT(g ác. Cítrico/100g)	5	0,38	0,53	0,36	0,60	210
Ratio (SST/ATT)	4	3,12	0,11	2,95	0,32	210
Rendimento (%)	4	2,82	0,88	2,63	0,90	70

SST = Sólidos solúveis totais; ATT = Acidez total titulável; *Ratio* = razão SST/ATT; SEV, SEC = erro padrão da validação e calibração; n Cal = universo amostral; r Val e Cal = Coeficiente de correlação de Pearson da validação e calibração.

O modelo de PLS para o teor de sólidos solúveis foi satisfatório e está de acordo com estudos (PEREIRA, 2013) já realizados do potencial da RMN associado a modelos de regressão para medir este parâmetro em frutas intactas. O gráfico dos valores medidos e preditos pelo modelo de PLS-RMN no conjunto de calibração do teor de sólidos solúveis pode ser observado na Figura 11.

A correlação entre o sinal de RMN e o teor de sólidos solúveis pode ser explicada pela ação que o aumento da concentração dos açúcares tem na viscosidade da água presente nas vesículas de suco. Como a medida de RMN observa os núcleos de Hidrogênio e, portanto, a água (H₂O), o aumento de açúcares e, conseqüentemente, a elevação da viscosidade faz com que o tempo de relaxação obtido por CPMG, no sinal de RMN, se altere conforme a concentração do teor de sólidos solúveis na fruta e mude ao longo da maturação ou em frutas diferentes.

Figura 11 - Sólidos solúveis medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN

O resultado do modelo de calibração de PLS-RMN para a massa fresca dos frutos apresentou ótimos valores de coeficientes de correlação (Figura 12). A forte correlação pode ser explicada pelo fato de que o sinal obtido por CPMG ganha intensidade conforme o aumento da massa fresca no fruto, contendo maior conteúdo de suco e, consequentemente, H_2O , alterando assim a viscosidade pela diluição do suco e, assim, a intensidade nos sinais de laranjas mais pesadas contendo maior teor de água e menor intensidade em laranjas leves com menor teor de água, permitindo uma ótima calibração da massa fresca com os sinais de RMN.

Figura 12 - Massa fresca dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN

O modelo de PLS-RMN (Figura 13) para o potencial Hidrogeniônico (pH) pode ser validado pois, demonstrou o potencial desta técnica para avaliar um parâmetro de acidez no suco de laranjas intactas. Levando em consideração que o modelo não teve nenhuma amostra anômala excluída, o coeficiente de correlação da validação de 0,71 obtido para 210 laranjas foi satisfatório e sugere a predição de novas frutas com um erro padrão médio de validação (SEV) de 0,19. A construção de classes de predição para este modelo é preferida em relação à predição direta dos valores, desta forma, uma classificação por pH é possível e sugerida.

Figura 13 - Potencial Hidrogeniônico dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN

A validação cruzada (*cross-validation*) validou o modelo de PLS-RMN para predição da medida de altura (diâmetro longitudinal em mm) em laranjas. O erro padrão médio da validação (SEV) foi de 2,91mm e a correlação de Pearson para a validação (r Val) foi de 0,85. Estes resultados indicam que o modelo PLS-RMN para predição do diâmetro longitudinal de laranjas pode ser aplicado. Quando estipuladas faixas de classificação, a RMN pode classificar frutos pelo diâmetro longitudinal (Figura 14).

Figura 14 - Diâmetro longitudinal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN

O modelo de PLS-RMN para a medida da largura (diâmetro transversal) de laranjas foi validado internamente, por meio do *cross-validation*. O coeficiente de correlação da validação foi de 0,92 em um conjunto amostral de 210 laranjas. O erro padrão médio da validação foi de 1,85mm por amostra. Desta forma, a união do modelo PLS-RMN para diâmetros longitudinal e transversal, aliado a faixas de classificação, pode separar laranjas grandes de laranjas pequenas, podendo também ser otimizada para detectar frutos com deformação no formato, anômalos aos demais ou com presença de talo ou folhas (Figura 15).

Figura 15 - Diâmetro transversal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN

Outro fator que tem grande importância para a indústria é o rendimento de suco por fruta, onde divide-se o peso da massa de suco pelo peso da massa fresca e multiplica-se por 100, obtendo o rendimento, em porcentagem. Esta medida de rendimento pelo modelo de PLS-RMN foi validada por meio do *cross-validation* (Figura 16). O modelo apresentou 0,88 como coeficiente de correlação de Pearson para a validação interna. O erro médio da validação foi de 2,82% por amostra. Desta forma, a predição e classificação de frutas, por rendimento de suco pode ser obtida aplicando este modelo de PLS-RMN. Esta pode ser uma ferramenta adequada para auxiliar de forma não invasiva, as rotinas analíticas em processos industriais.

Figura 16 - Rendimento de suco dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN

Os modelos de PLS-RMN para a medida de acidez total titulável e a predição diretamente do *ratio* (sólidos solúveis/acidez titulável) não puderam ser validados, uma vez que estes apresentaram baixos valores de correlação de Pearson (*r Val*). Ainda, o erro padrão médio destes modelos foi alto e este modelo não foi estatisticamente significativo para fins preditivos. O modelo de PLS-RMN para a predição direta do índice de maturação (*ratio*) foi prejudicado, pois depende de dois fatores, o teor de sólidos solúveis e a acidez total titulável, pelo fato deste parâmetro ser uma relação destes dois fatores, a soma dos erros impossibilitou a calibração correta do modelo. Já para o modelo de PLS-RMN para a predição da acidez total titulável não houve uma calibração eficiente, isto pode ter ocorrido pela precisão do método de referência ou, ainda sugere, a baixa correlação entre o sinal de RMN com este parâmetro (Figura 17).

Figura 17 - Modelos não validados por PLS-RMN para acidez titulável e ratio

Os modelos de PLS-RMN que foram validados internamente, foram avaliados, pelo desempenho em predição de amostras desconhecidas às amostras utilizadas para a calibração e validação interna. Desta forma, somente os modelos que foram validados internamente passaram para a fase de validação em conjunto teste ou validação externa. Os resultados obtidos pela validação externa para os modelos PLS-RMN validados internamente podem ser observados na Tabela 3. Os erros médios de predição (SEP) mantiveram-se próximos ao SEV encontrado na validação interna e os coeficientes de correlação da predição também foram compatíveis com os encontrados na validação.

Tabela 3 - Modelos em conjunto de validação externa

Análises	SEP	r	Fatores	N
SST (Brix)	0,88	0,81	5,00	90
pH	0,17	0,74	5,00	90
Massa fresca	13,57	0,97	5,00	90
Diâmetro longitudinal	3,37	0,91	5,00	90
Diâmetro transversal	2,73	0,92	5,00	90
Rendimento (%)	3,26	0,78	4,00	30

SEP = Erro padrão da predição; r = coeficiente de Pearson da predição; n = universo amostral

Pode-se observar nas Figuras 18 e 19, os gráficos dos valores preditos e medidos no conjunto de validação externa para os modelos validados de PLS-RMN.

Figura 18 - Sólidos solúveis medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa

Figura 19 - Massa fresca dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa

Figura 20 - Potencial Hidrogeniônico dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa

Figura 21 - Diâmetro longitudinal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa

Figura 22 - Diâmetro transversal dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa

Figura 23 - Rendimento de suco dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-RMN no conjunto de validação externa

De maneira geral, os modelos de PLS-RMN que foram validados internamente mantiveram os índices de correlação (r) e erros quadráticos médios (SEP), confirmando a aplicação da predição destes parâmetros em laranjas intactas.

Com base nos erros de predição existentes em geral nos modelos, uma alternativa para reduzir as taxas de erros é construir classes para classificações precisas em intervalos definidos de teor de sólidos solúveis, pH, massa fresca, diâmetro longitudinal ou diâmetro transversal. Desta forma, o emprego da RMN associada a modelos de regressão como o PLS é um sistema alternativo aos existentes e que pode ser empregado para análises de qualidade de laranjas da variedade Hamlin e Valência, podendo este estudo abrir caminhos para outras frutas e outras variedades de laranjas.

5.3 Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

O espectro das laranjas obtido no infravermelho próximo apresentou combinações de estiramentos O-H em $4545\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$ e entre $7143\text{-}6250\text{ cm}^{-1}$ referente ao primeiro sobretom (*Overtone*) da combinação de estiramento O-H, associados à presença de água no interior da fruta. Ainda, foi possível observar o segundo sobretom do estiramento C-H entre 9000 e 8000 cm^{-1} , associados a óleos essenciais e polissacarídeos presentes na casca da laranja, como celulose e pectinas. As variáveis do intervalo do número de onda $6400\text{-}5600\text{ cm}^{-1}$ apresentam o primeiro sobretom do estiramento C-H e o início do primeiro sobretom do estiramento N-H e foram excluídas devido exercerem influência na capacidade de diferenciar as variedades Hamlin e Valência de forma não desejada (Figura 24). Esta influência é negativa no modelo, uma vez que se está correlacionando com o teor de sólidos solúveis e acidez titulável, esta banda não representa o objetivo do modelo, e, portanto, teve que ser removida por não exercer correlação direta com os parâmetros que seriam preditos.

Figura 24 - Sinais das 300 laranjas obtidos por NIR, originais sem tratamento com as variáveis excluídas (valores médios)

A seleção das variáveis que representam os números de onda citados anteriormente foi estudada por meio da análise de componentes principais e avaliadas quanto à potência de modelagem. Revelaram que parte do sinal tem influência na construção dos modelos de calibração por PLS, para os parâmetros propostos pelo presente estudo (Figura 25).

Figura 25 - Potência de modelagem das variáveis de NIR

Os modelos de calibração PLS construídos com os sinais de NIR após a aplicação da variação normal padrão (SNV) e realizada a seleção das variáveis, resultaram positivamente para a medida não destrutiva do teor de sólidos solúveis, pH e acidez total titulável. Parâmetros estes, que são de grande importância para a análise de qualidade de laranjas no campo e na indústria.

A calibração do teor de sólidos solúveis juntamente com a acidez total titulável apresentaram baixo erro padrão médio de validação (SEV) e alto coeficiente de correlação de Pearson (r Val) (Tabela 4). Apesar do modelo de predição direto do índice de maturação ratio (SST/ATT) não ter resultado valores positivos e não validados, a predição deste valor é possível pela obtenção individual de cada parâmetro utilizando os modelos do teor de sólidos solúveis e acidez titulável separadamente. Após realizada a predição é possível calcular o ratio de maneira não invasiva a partir dos valores preditos de SST e ATT. Apresentando ainda erros que podem ser controlados por classificações de faixas que minimizam estes erros e podem classificar laranjas de ratio mais alto ou ratio mais baixo de acordo com a necessidade de forma não invasiva.

Os resultados dos modelos de PLS para o infravermelho próximo podem ser visualizados abaixo (Tabela 4). Os parâmetros de massa fresca, diâmetro longitudinal, diâmetro transversal e ratio não foram validados internamente por apresentar alta taxa de erro e baixos coeficientes de correlação.

Tabela 4 - Modelos de calibração PLS-NIR

NIR	Fatores	SEV	r Val	SEC	r Cal	n Cal
SST(°Brix)	14	0,64	0,88	0,53	0,93	192
pH	17	0,12	0,87	0,10	0,92	192
ATT(g/100g Ac. Cítrico)	17	0,13	0,84	0,10	0,92	192
Ratio(SST/ATT)	11	2,62	0,40	2,39	0,56	192
Massa fresca(g)	9	25,16	0,63	20,2	0,79	192
Diâmetro longitudinal(mm)	10	4,17	0,68	3,01	0,85	192
Diâmetro transversal(mm)	10	3,65	0,61	2,62	0,82	192

SST = Sólidos solúveis totais; ATT = Acidez total titulável; *Ratio* = razão SST/ATT; SEV, SEC = erro padrão da validação e calibração; n Cal = universo amostral; r Val e Cal = coef. de correlação de Pearson da validação e calibração.

As correlações entre os valores medidos e preditos do teor de sólidos solúveis e acidez total titulável pode ser observada nas Figura 26 e 27.

Figura 26 - Sólidos solúveis dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação interna

Figura 27 - Acidez total titulável dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação interna

Figura 28 - Potencial Hidrogeniônico dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação interna

Os modelos de PLS que foram validados internamente através do *cross-validation* foram avaliados em um conjunto teste com amostras não presentes na calibração (Tabela 5).

Tabela 5 - Modelos PLS-NIR em conjunto de validação externa

Análises	SEP	r	Fatores	n
SST (°brix)	0,71	0,92	14,00	83
pH	0,13	0,89	18,00	83
ATT(g/100g Ac. Cítrico)	0,30	0,92	17,00	83

SEP = Erro padrão da predição; r = coeficiente de Pearson da predição; n = universo amostral

Os gráficos dos valores medidos e preditos no conjunto de validação teste ou externa podem ser visualizados nas Figura 29 e 30.

Figura 29 - Sólidos solúveis dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação externa

Figura 30 - Acidez total titulável dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-NIR no conjunto de validação externa

Os resultados encontrados utilizando o NIR associado ao PLS para predição do teor de sólidos solúveis neste trabalho, em laranjas, está de acordo com muitos estudos presentes na literatura que realizaram a construção de modelos utilizando NIR para predição em laranjas variedade Valência, variedade Sanguínea, além de outras variedades (CAYUELA, 2007 e 2010; LIU, 2010; MAGWAZA, 2013).

Desta forma, foi constatado que é possível medir laranjas Hamlin e Valência de forma não invasiva para o teor de sólidos solúveis, acidez total titulável e pH, com baixas porcentagens de erro, e também que estes dados sugerem a real aplicação da técnica de NIR associada a modelos de PLS para predição não invasiva de parâmetros de qualidade em laranjas.

5.4 Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)

As variáveis correspondentes ao número de onda da região correspondentes a intervalos de 3646 e 4000 cm^{-1} a 1759 e 3073 cm^{-1} foram excluídas, com a justificativa de haver ruído aleatório e grupos específicos referentes a C-H associados à celulose e pectina, que não se correlacionam com as análises de referência necessárias para a calibração dos modelos de PLS. Ainda, o ruído entre as bandas 2000 e 2250 cm^{-1} de absorbância a estas regiões espectrais, foram removidos com objetivo de elevar as correlações de todos os modelos e evitar a inclusão de variáveis não necessárias (Figura 31).

As bandas características da água e grupos O-H foram observadas entre 3500 cm^{-1} e 3073 cm^{-1} e foram mantidas, pois fazem parte das moléculas estudadas para a construção dos modelos de PLS. O intervalo entre 1790 e 706 cm^{-1} é associado a grupos C=O e C=C e as bandas entre 1000 e 1500 são associadas a polissacarídeos e ligações simples (LAMBERT, SHURVELL e COOKS, 1998; SCHULZ e BARANSKA, 2009).

Figura 31 - Sinais de MIR originais sem normalização (0-1) e segunda derivada com a marcação das variáveis excluídas e utilizadas

A análise exploratória dos sinais de infravermelho médio revelou a potência de modelagem de cada variável correspondente ao número de onda, em cm^{-1} , correspondente a cada grupo de moléculas. As variáveis 0-200, 490-1210 e 1776-1798 foram excluídas por não apresentaram correlação com os parâmetros estudados e/ou apresentarem pouca influência na construção dos modelos de PLS (Figura 32).

Figura 32 - Potência de modelagem das variáveis de MIR

Os modelos de calibração com validação interna construídos por PLS utilizando os sinais do infravermelho médio e as análises de referência demonstraram a adaptação do MIR para alguns parâmetros como pH e teor de sólidos solúveis. Não foi possível validar os modelos de PLS para os parâmetros de massa fresca, diâmetro longitudinal, diâmetro transversal, ratio e acidez total titulável (Tabela 6).

Tabela 6 - Modelos de PLS-MIR em conjunto de validação interna

Análise	Fatores	SEV	r Val	SEC	r Cal	n
SST (°Brix)	12	0,87	0,78	0,65	0,89	210
ATT (g de ác.cítrico/100g)	5	0,35	0,63	0,31	0,74	210
Ratio	4	2,87	0,40	2,59	0,55	210
Massa fresca(g)	8	29,43	0,48	25,45	0,65	210
pH	10	0,16	0,80	0,13	0,88	210
Diâmetro longitudinal(mm)	9	4,83	0,48	4,10	0,67	210
Diâmetro transversal(mm)	9	4,04	0,51	3,38	0,69	210

SST = Sólidos solúveis totais; ATT = Acidez total titulável; *Ratio* = razão SST/ATT; SEV, SEC = erro padrão da validação e calibração; n Cal = universo amostral; r Val e Cal = coef. De correlação de Pearson da validação e calibração.

Os melhores modelos gerados pelo PLS utilizando o MIR ocorreram para o teor de sólidos solúveis e pH. Os gráficos dos valores medidos e preditos podem ser visualizados nas Figuras 33 e 34.

Figura 33 - Sólidos solúveis dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-MIR no conjunto de validação interna

Figura 34 - Valores de pH dos frutos medidos e preditos pelo modelo PLS-MIR no conjunto de validação interna

Os erros quadráticos médios de predição (SEP) para os modelos de sólidos solúveis totais e pH, foram avaliados e podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 - Modelos de PLS-MIR em conjunto de validação externa

Análises	SEP	R	Fatores	n
SST (°brix)	0,92	0,78	12,00	90
pH	0,18	0,70	10,00	90

SEP = Erro padrão da predição; r = coeficiente de Pearson da predição; n = universo amostral

Com base nos dados validados internamente e externamente obtidos pela regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), o espectrômetro de infravermelho médio apresenta potencial para uso na mensuração do pH e do teor de sólidos solúveis totais em laranjas Hamlin e Valência de forma não invasiva.

6. Classificação físico-química dos frutos

Classificação de RMN-PLS por parâmetro físico

A acurácia da classificação dos frutos pelo diâmetro transversal apresentou acerto acima de 79%, demonstrando a capacidade do modelo de RMN-PLS para selecionar frutos conforme os códigos da CODEX-STAN 245 (Figura 35).

Figura 35 - Acurácia da classificação RMN-PLS de laranjas por diâmetro transversal

Desta forma, o modelo de RMN-PLS para classificar frutos por tamanho pode ser calibrado conforme a necessidade de classificação, dependendo apenas de uma adequada calibração para se tornar funcional atendendo as necessidades de fazendas ou indústrias.

Classificação de RMN-PLS por parâmetros químicos

As frutas foram classificadas de forma não invasiva pelo modelo de RMN-PLS e após a extração e homogeneização do suco, foram medidos o teor de sólidos solúveis e o pH final, por meio de métodos de referência (Tabela 8). Com base nestes resultados, pode-se observar que a classificação não invasiva demonstrou ter influência na obtenção destes parâmetros no suco final produzido.

Tabela 8 - Análises de referência após a classificação

Classe	SST*	pH	Amostras
Classe 1	12,50	3,27	55
Classe 2	11,56	3,56	55

*SST = Teor de sólidos solúveis.

A aproximação dos valores obtidos para o teor de sólidos solúveis e a diferença de apenas 1°Brix pode ser justificada pela maneira qual foram construídas as classes. As classes tiveram como base o valor médio do teor de sólidos solúveis para o conjunto de predição, de 12°Brix. As amostras com valores mais altos foram classificadas como classe 1 e menores que a média, como classe 2. Desta forma, o erro médio presente no modelo de predição (SEP) faz com que exista uma zona próxima à média onde há amostras que são classificadas dentro da faixa de erro. Este erro é chamado de erro de borda, onde a diferença entre o teor de sólidos solúveis, entre as amostras, é menor do que a margem de erro do modelo de predição. Assim, a média dos valores dos parâmetros de sólidos solúveis e pH apresentaram valores muito próximos entre as classes obtidas. Contudo, em um total de 110 amostras, foi possível classificar 55 frutas como pertencentes à classe 1 e 55 frutas para classe 2, com amostras presentes na zona de erro de borda e, ainda assim, obter separação dos valores finais dos sucos (Figura 36).

Figura 36 - Classificação para 1ª análise sensorial RMN-PLS (n = 110)

A segunda classificação realizada teve objetivo de aumentar a diferença final do teor de sólidos solúveis e pH entre os sucos das laranjas classificadas de forma não invasiva. Desta forma, a o modelo de predição utilizou a classe de frutas pelo teor de sólidos solúveis e valores de pH com base na média excluindo as frutas que ficaram na zona do erro de borda do modelo de PLS-RMN (Tabela 9).

Tabela 9 - Análises de referência dos sucos após a classificação

Classe	*SST	pH	Amostras
Classe 1	12,50	3,27	30
Classe 2	9,83	4,18	30

*SST = Teor de sólidos solúveis totais

A classificação apresentou maior diferença entre o teor de sólidos solúveis no suco final, modificando apenas a construção das faixas de seleção desejada. Desta forma, a faixa pode ser baseada na média do conjunto de laranjas medidas excluindo a zona de frutas presente no erro de borda, ou pode-se criar outra classe de suco com os valores médios entre os valores desejados, assim a diferença final destes parâmetros dos sucos será maior, mais homogêneas e em conformidade com o recomendado (Figura 37).

Figura 37 - Classificação para 2ª análise sensorial RMN-PLS (n = 60)

As acurácias dos modelos de classificação foram satisfatórias para o teor de sólidos solúveis (SST), porém para o parâmetro de pH o acerto ficou abaixo de 70% no conjunto de validação, os valores podem ser observados nos histogramas abaixo (Figura 38).

Figura 38 - Histograma da acurácia dos modelos de PLS-RMN

Classificação de NIR-PLS por parâmetros químicos

As frutas foram classificadas de forma não invasiva pelo modelo de NIR-PLS. Após a extração e homogeneização do suco o teor de sólidos solúveis e o pH final, foram aferidos por meio de métodos de referência (Tabela 8). Com base nestes resultados, pode-se observar que a esta classificação teve influência na obtenção dos parâmetros no suco final produzido. A predição do modelo de NIR-PLS apresentou como classe 1 os valores de *ratio* acima da média estipulada, porém, a classe 2 também apresentou valores de *ratio* pouco acima da média.

Tabela 10 - Análises de referência dos sucos após a classificação

Classe	<i>Ratio</i> (*SST/*ATT)	Amostras
Classe 1	16,6	55
Classe 2	12,2	55

*SST = Teor de sólidos solúveis totais; *ATT= Acidez total titulável.

A classificação pelo modelo de NIR-PLS para estas classes foi igual a realizada nos modelos de RMN-PLS, baseando-se no valor médio do parâmetro do teor de sólidos solúveis e acidez total titulável (*ratio*) médios preditos. Esta forma de classificação baseada na média utilizando muitos frutos faz com que o valor de *ratio* final dos sucos seja muito próximo

(Figura 39). A análise de componentes não apresentou grande separação ou agrupamento das amostras pelo fato da proximidade do conjunto amostral analisado.

Figura 39 - Classificação para 1ª análise sensorial NIR-PLS (n = 110)

Um fator que pode ter influência nesta classificação foi a ausência de laranjas mais ácidas no conjunto amostral. Desta forma, conclui-se que em um conjunto amostral muito homogêneo, o erro de predição (SEP), presente no modelo de NIR-PLS, tem baixo poder de classificação. Mais uma vez, a classificação de amostras com faixas de ratio igual ou maior ao erro de predição (SEP) é aconselhada para reproduzir uma melhor classificação.

Para o segundo conjunto de classificação, com as faixas de predição aumentadas e amostras com valores intermediários, ou seja, amostras que estavam na margem do erro de borda, removidas. Desta forma, foi possível obter uma classificação com diferença significativa para valores de *ratio* no suco final (Tabela 11).

Tabela 11 - Análises de referência dos sucos após a classificação

Classe	<i>Ratio</i> (*SST/*ATT)	Amostras
Classe 1	14,08	30
Classe 2	9,16	30

*SST = Teor de sólidos solúveis totais; *ATT= Acidez total titulável.

O agrupamento das frutas da classe 1 e classe 2 pode ser observado pela análise de componentes principais (Figura 40). A componente principal 1 foi a principal responsável pela separação dos sinais explicando mais de 87% dos dados.

Figura 40 - Classificação para 2ª análise sensorial NIR-PLS (n = 60)

A acurácia dos modelos de NIR-PLS para o teor de sólidos solúveis, acidez total titulável e *ratio* ficaram acima de 70%, indicando uma boa margem de classificação baseada na média. Os valores podem ser observados na Figura 41.

Figura 41 - Histograma da acurácia dos modelos de NIR-PLS

7. Análise sensorial

7.1 Testes de comparação pareada para RMN-PLS

Após a classificação dos frutos por meio do modelo de RMN-PLS, o suco final homogeneizado de classe 1 e o da classe 2 foram avaliados pelo teste de comparação pareada. A primeira classificação que utilizou faixas de classificação baseadas na média utilizou 110 laranjas. A segunda classificação utilizou 60 laranjas e apresentou diferença entre as faixas de classificação aumentada em verificar a eficácia em intervalos grandes de diferença de sólidos solúveis e pH.

Os resultados da análise sensorial de comparação pareada dos sucos de laranja, para as classificações de frutos de forma não invasiva, foram significativos para as duas classificações desenvolvidas conforme tabela de referência de KRAMER&TWIGG, 1970 (Apêndice D). Para a primeira faixa de classificação criada com diferença menor baseada na média, houve 34 respostas para classe 2 de suco de laranja como sendo mais doce em relação à classe 1. Isto quer dizer que a diferença de 0,5 de pH teve maior influência no sabor do suco mesmo tendo 1ºBrix a menos do que o suco de classe 2 (Tabela 12).

Para a segunda faixa de classificação criada, houveram 42 respostas marcando a classe 2 como sendo mais doce do que a classe 1. A análise de referência no suco final, revelou que a diferença entre os sucos de laranja de classe 2 foi de 9ºBrix para 12º da classe 1, porém, novamente o valor de pH encontrado na classe 2 foi superior, sendo de 4,18 e determinante em relação ao pH de 3,27 do suco de classe 1.

Tabela 12 - Testes de comparação pareada

Classificação	Respostas	Classe 1	Classe 2	Nível de confiança
1 ^a	50	16	34	95%
2 ^a	60	18	42	99%

A medida do teor de sólidos solúveis é aproximada e engloba os ácidos presentes na amostra. Isto quer dizer que um suco com alto teor de sólidos solúveis não é necessariamente percebido como mais doce pelo paladar humano do que um suco que apresenta este teor levemente menor. O pH comanda a percepção do gosto percebido, pois o suco de classe 1 obtido com pH de 3,27 é percebido mais ácido ao palato do que um suco com pH 4,18, desta forma, minimizando a diferença de 3ºBrix.

Os histogramas do teste de comparação pareada podem ser observados nas Figuras 42 e 43.

Figura 42 - Histograma da 1ª análise sensorial RMN-PLS (n = 50)

Figura 43 - Histograma da 2ª análise sensorial RMN-PLS (n = 60)

7.2 Testes de comparação pareada para NIR-PLS

A classificação realizada com base na média, para a primeira análise sensorial, não apresentou diferença significativa para a percepção do gosto doce para os sucos de classe 1 e classe 2. Isto pode ser explicado, pelo fato de que os dois sucos estavam com o valor de *ratio* (sólidos solúveis/acidez titulável) muito próximos e acima de 11, que é considerado doce. Portanto, a diferença não foi percebida pelos provadores. Já a segunda classificação, com a faixa de diferença aumentada, foi percebida pelos provadores entre o suco de classe 1 e o suco de classe 2, sendo estatisticamente significativa, em nível de confiança de 99% (Tabela 12). Dentre os 60 provadores do segundo teste, 43 escolheram a classe 1 como sendo mais doce em relação à classe 2 (Tabela 13).

Tabela 13 - Testes de comparação pareada

Classificação	Respostas	Classe 1	Classe 2	Nível de confiança
1 ^a	50	20	31	n/a
2 ^a	60	43	17	99%

A análise de referência revelou que o suco de classe 1 apresentou *ratio* de 14 e já o suco de classe 2, apenas 9. Uma laranja que apresenta *ratio* inferior a 10 é considerada, segundo classificação do CEAGESP (2011), como uma fruta que não atende os requisitos mínimos de qualidade. Os comentários realizados pelos provadores, salientaram a grande diferença de acidez percebida ao provar os dois sucos. Isto confirma que a classificação com faixas com maior diferença apresenta uma seleção de laranjas melhor que faixas baseadas na média.

Os histogramas dos testes de comparação pareada podem ser observados na Figuras 44 e 45.

Figura 44 - Histograma da 1ª análise sensorial NIR-PLS (n = 50)

Figura 45 - Histograma da 2ª análise sensorial NIR-PLS (n = 60)

8 CONCLUSÃO

Os modelos de regressão por mínimos quadrados parciais associados à ressonância magnética nuclear de baixo campo revelaram potencial de aplicação para a análise de parâmetros de qualidade em laranjas intactas. Foi possível validar os modelos para predição do teor de sólidos solúveis totais, potencial hidrogeniônico, diâmetros longitudinais e latitudinais, massa fresca e o rendimento de suco. Desta forma, o emprego de um único equipamento com potencial de avaliar múltiplos parâmetros em uma única análise, rápida e não invasiva, é um avanço na fronteira da ciência e tecnologia.

As classificações avaliadas pelos modelos de RMN-PLS demonstraram valores de acurácia aceitáveis, onde os valores das faixas de classificação podem ser ajustados conforme a necessidade e objetivos respeitando o requisito de uma etapa de calibração otimizada. Ainda, a análise sensorial do suco de laranjas classificadas pelo modelo, apresentou valores significativos para o parâmetro de doçura, segundo o teste de comparação pareada aplicado. Demonstrando assim, que a seleção de laranjas para elaboração de suco pode ser um diferencial para o mercado.

Para as análises de regressão utilizando as espectroscopias de infravermelho, foi possível validar modelos para medir parâmetros de qualidade, como teor de sólidos solúveis (SST), acidez total titulável (ATT) e *ratio* quando utilizado o infravermelho próximo (NIR). Para o infravermelho médio (MIR), foi possível validar apenas modelos para predição dos parâmetros de pH e teor de sólidos solúveis totais com erros quadráticos de predição em níveis razoáveis, sendo mais indicado para medir compostos específicos.

Já o infravermelho próximo quando avaliado para classificar laranjas por meio do *ratio* (SST/ATT), apresentou acurácia acima de 70%. Quando aplicado o modelo para selecionar frutos para análise sensorial, este apresentou ter desempenho satisfatório e significativo, segundo o teste de comparação pareada para o gosto doce nos sucos de laranja classificadas. Desta forma, demonstrou ser uma tecnologia com potencial de aplicação para selecionar laranjas por doçura podendo aumentar o teor de sacarose em sucos industriais, apenas aplicando a classificação não invasiva.

Contudo, existe a necessidade de uma calibração específica dos equipamentos e dos modelos de regressão por mínimos quadrados parciais para que os parâmetros de qualidade desejados sejam passíveis de serem obtidos de forma não invasiva. Sendo assim, necessária uma calibração específica no local onde serão aplicadas estas tecnologias, para que os modelos compreendam as variações existentes no ambiente de análises atendendo às faixas de

classificação pretendidas pelas fazendas, indústrias processadoras de suco, beneficiadoras de frutas e demais usuários.

REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. **Cary 630 Medium infrared equipment**. Walnut Creek, California. Disponível em: www.chem.agilent.com. Acesso em: 8 fev. 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 16.ed. Washington: AOAC, 1997, p. 2-45.
- AULER, P.A.M.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; TAZIMA, Z.H. Comportamento da laranjeira 'Valência' sobre seis porta-enxertos no noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 229-234, 2008.
- CARR, H. Y; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physics Reviews**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 630-638, 1954.
- CAYUELA, J. A. Vis/NIR soluble solids prediction in intact oranges (*Citrus sinensis* L.) cv. Valencia Late by reflectance. **Postharvest Biology and Technology**, Madrid, v. 47, n. 11, p. 75-80, 2008.
- CHATTOPADHYAY, N.; HORE, J. K.; SEN, S. K. Extension of storage life of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) cv. Jaffa. **Indian Journal of Plant Physiology**, Paris, v. 35, n. 7, p. 345-251, 1992.
- CHEN, C.S.; BROWN, C.W., LO, S.C, Calibration Transfer from Sample Cell to Fiber-Optic Probe, **Applied Spectroscopy**, Tokyo, v. 51, n. 13, p. 744-748, 1997
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2005, p. 75-86.
- CHO, B. K.; CHAYAPRASERT, W.; STROSHINE, R. L. Effects of internal browning and watercore on low field (5.4 MHz) proton magnetic resonance measurements of T2 values of whole apples. **Postharvest Biology and Technology**, Cambridge, v. 47, n. 11, p. 81-89, 2008.
- CLARIDGE, T.D.W., **Practical aspects of high-resolution NMR**, 2 Ed. Tetrahedron Organic Chemistry Series, ELSEVIER, 2009, p. 35-98.
- FAO STATISTICAL YEARBOOK 2013. **World Food and Agriculture**, 2013. Disponível em: www.fao.org. Acesso em: 8 mar. 2015.
- GAMBHIR, P. N.; CHOI, Y. J.; SLAUGHTER, D. C.; THOMPSON, J. F. and MCCARTHY, M. J. NMR spectroscopy on food quality. **Journal of Science Food Agriculture**, California, v. 81, n. 11, p. 85-98, 2005.
- GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste, 1987, p. 32-50.
- H. MARTENS, NAES, T., **Multivariate Calibration**, Chichester: John Wiley & Sons, 1996. p. 23-45.

H. MARTENS, **Multivariate Analysis of Quality An Introduction**, Chichester: John Wiley & Sons, 2001, p. 23-56.

HOLLAS, J MICHAEL. **Basic Atomic and Molecular Spectroscopy**. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2002, p. 35-64.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: O instituto, 1985, p. 82.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 5 ago. 2014.

KUMAR, J.; SHARMA, R. K.; SINGH, R.; GODARA, R. K. Increased shelf-life of kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) by different storage conditions and chemicals. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Punjab, v. 60, n. 2, p. 151-154, 1990.

LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H. F.; A, L. D.; COOKS, R. G. **Organic structural spectroscopy**. New Jersey: Prentice-Hall, 1998, p. 87-98.

LIU, Y., YING, Y., Use of FT-NIR spectrometry in non-invasive measurements of internal quality of 'Fuji' apples. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 37, n. 3, p. 65–71, 2005.

LU, H. S., XU, H. R., YING, Y. B., FU, X. P., YU, H. Y., & TIAN, H. Q., Application Fourier transform near infrared spectrometer in rapid estimation of soluble solids content of intact citrus fruits. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 48, n.13, p. 794–799, 2006.

M.J. ADAMS, **Chemometrics in Analytical Spectroscopy**, Royal Society of Chemistry, UK: Cambridge, 1995, v. 13, n. 11, p. 15-25.

MARTINEZ, I.; AURSAND, M.; ERIKSON, U.; SINGSTAD, T. E.; VELIYULIN, E.; VAN DER ZWAAG, C. Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 14, n. 12, p. 489–498, 2003.

MEIBOOM, S., GILL, D. Modified spin–echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review Science Instrument**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 688-691, 1958.

NORDON, A.; MCGILL, C. A.; LITTLEJOHN, D. Process NMR spectrometry. **Analytical Chemistry**, New York, v. 126, n. 2, p. 260-272, 2001.

OETTERER, M.; D'ARCE, M.A.B.R; SPOTO, M.F.H. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**, ed. Brasileira, 2006, p. 404.

O'SHEA, D.C., **Elements of Modern Optical Design**. New York: Wiley Interscience, 1985, v. 77, n. 5, p. 14.

OLIVEIRA, G. A., CASTILHOS, F., MARIE-GENEVIÈVE, C., RENARD, C. Bureau, S. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit, **Food Research International**, New York, v. 60, n. 31, p. 32-44 2014.

PEREIRA, F. M. V.; CARVALHO, A. D. S.; CABEÇA, L. F.; COLNAGO, L. A. Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Microchemical Journal**, New York, v. 108, n. 43, p. 14–17, 2013.

RAHMAN, A. M. A.; The color white as one of the passive solar design elements on buildings surfaces pertaining to reduced energy consumption. **Analytical Chemistry**, Malaysia: Universiti Sains, v. 62, n. 23, p. 31-45, 2006.

RAHMATALLAH S.; Li, Y.; SETON, H. C.; GREGORY, J. S and R. M. ASPDEN. NMR applied technology. **Europe Food Research Technology**, Madrid, v. 34, n. 41, p. 222-298, 2006.

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, n. 13, p. 2052-2057, 2010.

ROBARDS, K., and ANTO LOVICH, M., Methods for assessing the authenticity of orange juice. **A Review Analyst**, London, v. 89, n.13, p. 1-28, 1995.

RUSHWORTH, F. A.; TUNSTALL, D. P. Nuclear Magnetic Resonance, New York, **Science Publishers**, New York, v. 13, n. 5, p. 13-21, 1973.

RUTLEDGE, D. N. Low resolution pulse nuclear magnetic resonance in agro-food industry. **Journal of Chemistry Physics**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 273-285, 1992.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E.; PLS regression: New tool. **Analytical Chemistry**, Chicago, v. 16, n.6, p. 36, 1964.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M., Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. **Fruits and vegetables**, California, v. 70, n.13, p. 321–353, 2009.

SHUN L.; JIN W., A model-based fault detection and diagnostic methodology based on PCA method and wavelet transform. **Energy and Buildings**, Pekin, v.68, n.41, p. 63-71, 2014.

SINCLAIR, W.B.; AND RAMSAY, R.C, Changes in the organic acids of ‘Valencia’ orange during development, **Bot Gaz**, Punjab, v. 106, n. 3, p. 140–148, 1944.

TING, S.V. Distribution of soluble components and quality factors in the edible portion of citrus fruits. **Journal of Science Horticulture**, Florida, v. 32, n. 5, p. 515– 519, 1969.

TING, S.V. Nitrogen content of Florida orange juice and Florida orange concentrate. **State Horticultural Society**, Florida, v. 7, n.8, p. 257–261, 1967.

TING, S.V., AND ATTAWAY, J.A. Citrus fruits. In 'The biochemistry of fruits and their products. **Academic Press**, Florida, v. 2, n. 8, p. 107–179, 1971.

TING, S.V., AND DESZYCK, E.J. Isolation of L-quinic acid in citrus. **Nature**, New York, v. 183, n.5, p. 1404–1405, 1959.

TING, S.V., AND DESZYCK, E.J. The carbohydrates in the peel of oranges and grapefruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v.26, n. 7, p. 146–152, 1961.

TING, S.V., AND DESZYCK, E.J. Total amino acid content of chilled orange juice and frozen orange concentrate. **Processing Florida State Horticulture Society**, Florida, v.73, n. 5, p. 252–257, 1960.

TING, S.V., AND VINES, H.M. Organic acids in the juice vesicles of Florida 'Hamlin' orange and Marsh seedless grapefruit. **Processing Florida State Horticulture Society**, Florida, v.88, n. 8, p. 291–297, 1966.

TREZZA, E. HAIDUC, A.M.W., GOUDAPPEL, G.J. AND VAN DUYNHOVEN, J.P.M. Rapid phase-compositional assessment of lipid-based food products by time domain NMR. **Magnetic Resonance Chemistry**, Oxford, v. 44, n. 13, p. 1023–1030, 2006.

WARDOSKI, W; WHIGHAM, J.; GRIERSON, W.; SOULE, J. Quality Tests for Florida Citrus. **Academic journal press**, Florida, v.31, n. 55, p. 13-25, 1999.

WOLD, S.; TRYGG, J.; BERGLUND, A.; ANTTI, H. Chemometrics intelligent systems. **Laboratory Systems**, New York, v. 41, n. 18, p. 58, 2001.

WORKMAN, J.J. An Introduction to Near Infrared Spectroscopy. **Oxford Academic Press**, Oxford, v. 45, n. 43, p.32-43, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha apresentada aos provadores durante o teste de comparação pareada

Nome: _____	Sexo: _____	Data : ____/____/____
<p>Você está recebendo duas amostras de suco de laranja natural. Por favor, copie o código dos copos no espaço em branco nesta ficha. Em seguida prove as amostras da esquerda para a direita e circule o número da amostra que julgar mais doce.</p> <p>_____</p>		
Comentários: _____		

APÊNDICE B - Disposição da bandeja apresentada aos provadores durante o teste de comparação pareada

APÊNDICE C - CODEX-STAN 245 para calibre de laranjas (mm)

Size Code	Diameter (mm)
0	92 – 110
1	87 – 100
2	84 – 96
3	81 – 92
4	77 – 88
5	73 – 84
6	70 – 80
7	67 – 76
8	64 – 73
9	62 – 70
10	60 – 68
11	58 – 66
12	56 – 63
13	53 – 60

APÊNCIDE D - Tabela de significância (χ^2) no teste de comparação pareada

SIGNIFICÂNCIA NO TESTE PAREADO ($P = 1/2$)

Nº de julgamentos ou provadores	Mínimo de respostas corretas necessárias para estabelecer significância			Mínimo de respostas corretas necessárias para estabelecer significância		
	Teste Bicaudal, preferência			Teste Monocaudal, Diferença		
	Nível de probabilidade			Nível de probabilidade		
	5%	1%	0,1%	5%	1%	0,1%
6	-	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	10
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	11	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	15	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	27	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	31
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	33	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55
90	55	58	61	52	57	61
95	58	61	64	57	60	64
100	61	64	67	59	63	66

Fonte: KRAMER & TWIGG, 1970.