

**CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ESPECTROSCOPIA UV/ VISIBLE
EN LA CALIDAD DE LA NARANJA *Citrus sinensis* var. Valencia.**

**CALIBRATION AND VALIDATION OF THE METHODOLOGY UV/VIS IN THE QUALITY OF
ORANGE *Citrus sinensis* var. Valencia**

**JOSE LUIS CORREA ^a, NELSON ROJAS MARTÍNEZ ^b, CARLOS ALBERTO RINCÓN ^c,
NELSON HURTADO ^d**

^a Programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Nariño.

^b Grupo de investigación en Biología Celular y Molecular (CELMOLEC), Departamento de Biología, Universidad del Cauca.

^c Departamento de Física, Facultad de Ingeniería Física, Universidad del Cauca
^d Departamento de Química, Universidad de Nariño.

PALABRAS CLAVES:

UV-Vis, NIR, *Citrus sinensis* var. Valencia., Contenido de sólidos solubles, Contenido de ácido cítrico.

KEYWORDS:

UV-Vis, NIR, *Citrus sinensis* var. Valencia, Soluble solids content, Citri acid content

RESUMEN

Un método óptico no destructivo basado en espectroscopia UV-Vis fue usado para la evaluación de la calidad interna de la fruta de naranjas en diferentes estados de maduración a longitudes de ondas de 292, 246 y 455 nm para medir SST % Brix, % Acido Cítrico y β -carotenos respectivamente; medidos individualmente en 56 frutas de naranjas en sus siete estados de maduración. La relación entre las longitudes de onda espectrales y los componentes de calidad fueron evaluados aplicando técnicas quimiométricas basado en regresión lineal por cuadrados mínimos, las frutas fueron divididas en dos grupos: 35 frutas para calibración y 21 para validación. Se obtuvo una buena predicción para sólidos solubles, ácido cítrico y β -carotenos con coeficientes de correlación de 0.98, 0.95 y 1 respectivamente y errores estándar de 0.26 %Brix, 0.14 % y 0.00648 mg/ml respectivamente. Es posible obtener una buena predicción del contenido de los componentes de calidad como SST % Brix, % A. Cítrico y β -carotenos en longitudes de onda de 292, 246 y 455 nm en UV-Vis, respectivamente. El procesamiento de imágenes fue bueno, sin embargo se presentaron dificultades en la obtención de la fotografía por la iluminación y falta de experiencia en ese tema.

ABSTRACT

A nondestructive optical method based on UV-Vis spectroscopy was used for internal quality evaluation of orange fruit in different stages of maturity at wavelengths of 292, 246 and 455 nm to measure SST% Brix, % Citric Acid and β -carotene respectively, measured in 56 individual orange fruits in the seven stages of maturity. Relationship between spectral wavelength and quality components were evaluated by applying chemometric techniques based on least squares linear regression, the fruits were divided into two groups: 35 fruits for calibration and 21 for validation. Good prediction was obtained for soluble solids, citric acid and β -carotene with correlation coefficients of 0.98, 0.95 and 1 respectively and standard errors of 0.26% Brix, 0.14% and 0.00648 mg / ml respectively. Can get a good prediction of content quality components SST% Brix, % A. Citric and β -carotene at wavelengths of 292, 246 and 455 nm in UV-Vis, respectively. Image processing was good; however there were difficulties in obtaining the photograph of the lighting and lack of experience on that topic.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en las instalaciones del laboratorio de Biología Celular y Molecular del Departamento de Biología, de la Universidad del Cauca; lográndose establecer una metodología calibrada y validada para la clasificación de frutos de naranja valencia en sus diferentes estados de maduración de acuerdo a su color y calidad interna tales como sólidos solubles totales expresado en porcentaje de grados Brix (SST), acidez titulable expresado en porcentaje de ácido cítrico (AT), y β -carotenos en miligramos por mililitro de solución (mg/ml); cultivada a más de 900 msnm, mediante espectroscopia UV/Visible.

La calidad de las frutas se caracteriza comúnmente por su tamaño, color, firmeza, apariencia superficial, igualmente características organolépticas como sólidos solubles y acidez. Muchas técnicas analíticas de medida de estas características son destructivas e involucran una considerable cantidad de trabajo. Por lo tanto, existe hoy en día una demanda por técnicas analíticas rápidas para evaluar la calidad de aquellas. (Guthrie et al., 2005).

Uno de los métodos no destructivos más usado, es la espectroscopia visible/infrarrojo cercano, 400 – 2500 nm; o espectroscopia

de infrarrojo cercano (NIR) de 750 – 2500 nm, han sido usadas como técnicas no destructivas para evaluar la firmeza, sólidos solubles, acidez, y otras propiedades fisiológicas de muchas frutas y vegetales; la aplicación comercial del NIR para la clasificación de frutas fue iniciado en Japón en 1990 (Kawano., 1994), estas frutas son de la línea de cítricos, manzanas, peras y melocotones, desde mediados de 1990 en Japón y más recientemente en otros países (Guthrie et al., 2005).

De esta manera, el uso directo de los instrumentos portátiles en la toma de decisiones para la compra por parte de los consumidores, podría ser de interés. Algunos de los avances de esta tecnología fue caracterizar en Naranjas y uvas (N, P, K y micronutrientes): (Hutton et al., 1995); Melocotones ($^{\circ}$ Brix): (Kawano et al., 1995); Mandarinas (azúcares): (Miyamoto y Kitano., 1995); Identificación de harinas de yuca con alto contenido proteico: (Jiménez, P, .2007); Caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano de maíz: (Vásquez, D; Abadía, B y Arreaza, L., 2004).

De otro lado, la espectroscopia UV/Visible es una técnica equivalente a la técnica NIR; este se diferencia en el intervalo de

longitudes de onda de trabajo la cual va de 200 – 1100 nm.

Esta técnica utiliza radiaciones electromagnéticas de las regiones: visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana NIR. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas y permite identificar la composición química de la muestra. (Skoog et al, 1992)

Para la obtención, análisis e interpretación de los datos procedentes de los experimentos; se aplicó un análisis estadístico multivariado con la técnica de regresión lineal múltiple para predecir los rasgos cualitativos de la naranja tales como: sólidos solubles totales, acidez titulable y β -carotenos.

No existe un número mínimo definido de muestras para una calibración satisfactoria.

Esto depende del analito a predecir y de la naturaleza del producto a evaluar, así para entidades químicas simples de productos homogéneos puede bastar con 30 a 40 muestras, mientras si por el contrario se pretende evaluar el contenido de proteína de productos heterogéneos se requieren un mínimo de 100 muestras (Shenky y Westerhaus, 1993 citados por Alomar, 1998).

El objetivo de este estudio fue calibrar y validar las metodologías espectroscopia UV/Visible en la calidad de la naranja *Citrus sinensis* var. Valencia; con la finalidad de cuantificar el contenido de sólidos solubles, acidez titulable, β -carotenos del jugo y relacionarla con el color (grado de madurez) esta última obtenida mediante el procesamiento digital de imágenes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Selección de frutas de naranja valencia.

Se recolectaron 8 frutas de cada estado de maduración para un total de 56 frutas; teniéndose en cuenta la Norma Técnica Colombiana (NTC 4086) ratificada por el Consejo Directivo de 02/26/1997. Las naranjas se cosecharon al azar el 26 de agosto del 2010; obtenidas de la Hacienda Jamaica ubicada en la vereda de San Isidro del municipio de Caicedonia del departamento del Valle del Cauca, con coordenadas geográficas de 4° 19' 25'' latitud norte y 75° 50'00'' longitud oeste; el cultivo de naranja tiene un patrón llamada citrumelo 4475 el cual dan porte semi-enano, diámetro de copa de 2.70 metros, resistencia o tolerancia a gomosis, virus de la tristeza y exocortis, sensibilidad a xiloporosis deficiencias de zinc y hierro, y induce buena calidad de fruta. El cultivo de naranja fue plantado en 1998, con textura de suelo franco, drenados profundos, de origen de ceniza volcánica, unidad malabar, a una altura de 1100 msnm y temperatura promedio de 28 °C.

2.2. Determinación de rasgos de calidad usando análisis referencial.

El color se determino usando una cámara digital con espacio de color RGB (figura 1) y luego expresado en HSV con OPENCV. Las frutas se midieron con un calibrador digital (Stainless Hardened mm/in) expresado en mm; luego cortadas donde se le extrajo el jugo con un exprimidor manual y se paso por un tamiz de 180 μ m, (figura 2); el contenido de jugo de naranja de cada estado de maduración se congelo a -10°C para evitar pérdidas de datos ya que los ácidos orgánicos se degradan; el ácido ascórbico se destruye fácilmente por el calor, especialmente en presencia de luz o aire a pH neutros, pero es más estable a pH más bajos (frutas más ácidas) como son los cítricos. Cuando las frutas se secan se producen pérdidas de vitamina C del 10 al 50 % y entre un 10 y un 20 % de vitamina A (Arthey y Ashurst, 1997).

El contenido de sólidos solubles se determino con un refractómetro (Extech Model 2192, Japan) expresado en % Brix a 20 °C, ajustado utilizando el porcentaje de ácido cítrico con la ecuación $S.S.T_{cor} = 0.194 * A + S.S.T$; donde A es el % de ácido cítrico y S.S.T es % Brix. La acidez titulable fue determinada usando la metodología de titulación potenciométrica de la norma técnica colombiana 4086, expresada en % de ácido cítrico; con la ecuación $\% \text{ácido cítrico} = \frac{V_1 * N * K * 100}{V_2}$; donde V1 es volumen de NaOH consumido, N es normalidad de NaOH (0.1 meq/ml), K es peso equivalente al ácido cítrico (0.064 g/meq) y V2 es volumen de la muestra (5 ml); de esta misma forma se encontró el porcentaje de ácido málico y tartárico, reemplazado en K los valores (0.067 g/meq y 0.075 g/meq respectivamente). El pH fue determinado con pH metro (744 Meter; Metrohm), (figura 3).



Figura 1. Imágenes tomadas con cámara en espacio RGB de los siete estados de maduración de la naranja; estado 0 – 6 de izquierda a derecha.



Figura 3. Medición con pH metro (744 Meter; Metrohm).

2.3. Mediciones espectrofotométrica UV – Visible.

El espectro UV-Vis de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos en ciertos átomos de moléculas y no caracteriza a la molécula (Skoog et al, 1992).

Las muestras fueron barridas en un espectrofotómetro de UV-Visible (Spectronic Genesys 5), los análisis para las diferentes características organolépticas se hicieron a longitudes de onda fija en celdas de cuarzo con 1 ml de solución para cada muestra. Para SST, ácido cítrico y β -carotenos internos fueron a longitudes de onda de 292 nm, 246 nm y 455 nm respectivamente (figura 4).



Figura 4. Equipo Spectronic Genesys 5.

En este estudio se desarrollo la ecuación de calibración y predicción usando el método estadístico de los cuadrados mínimos (Shenk y Westerhaus, 1993). La ecuación de regresión se detalla a continuación:

$$Y = a + bx$$

Donde Y representa el parámetro químico o característica (SST, AT, β-carotenos); a es el intercepto, b el coeficiente de la regresión, x es la absorbancia de la longitud de onda.

Para la selección de ecuaciones de calibración de cada parámetro debe contar con un error estándar de calibración (E.E.C) y el coeficiente de determinación (r^2) ya que representan criterios importantes para tomar una decisión respecto a la selección de la ecuación.

Después de establecer una ecuación de calibración, es necesario validarla. Esto se hace con un set de muestras diferentes a las utilizadas en la calibración. De estas muestras se debe conocer los datos de laboratorio.

Hay tener en cuenta que para seleccionar una ecuación el error estándar de predicción (E.E.P) debe ser bajo, tomando como base que una ecuación es considerada como aceptable cuando la magnitud del E.E.P es menor a un tercio de la desviación estándar de los datos de referencia (Kennedy et al, 1996).

$$E.E.P = \sqrt{\sum(Y - Y_{est})^2 / (nv - 2)}$$

Donde:

Y = valor de autentico.

Y_{est} = Valor predicho por UV-Vis.

nv = Numero de muestras en el set de validación.

El E.E.P es un indicador confiable de la calidad de la ecuación desarrollada, ya que a diferencia del E.E.C, que mejora (disminuye) a medida que se agregan nuevos términos a la ecuación, el E.E.P mejora solo hasta que comienza a producirse un sobreajuste de la ecuación, aumentando (empeorando) con cada nuevo termino (Westerhaus, 1989 citado por Alomar y Fuchslocher, 1998).

2.4. Tratamiento estadístico de datos.

Se utilizo la metodología de regresión lineal para calibrar y validar la predicción.

Para llevar a cabo la validación en los diferentes estados de maduración se categorizaron las naranjas con intervalos para cada estado; donde se usaron 35 naranjas para calibrar (5 naranjas de cada estado de maduración) y 21 naranjas para validar (3 naranjas de cada estado de maduración); para un total de 56 naranjas. Para predecir la composición química de una muestra, se requiere previamente hacer calibraciones, para lo cual se necesita contar con un conjunto de muestras representativas, coleccionar los espectros, analizar las muestras mediante un método de referencia y validar dichas ecuaciones con otras muestras que no formen parte del conjunto de muestras para calibración (Garrido et al., 2000).

Para el procesamiento de los datos se uso el software InfoStat y Origin 6.5.

La aplicación del UV-Visible es un procedimiento sencillo, pudiéndose combinar estas calibraciones dentro de un mismo programa, de manera que con un único barrido de cada ingrediente o muestra, se pueden realizar simultáneamente todos los análisis citados. Así, se evita la utilización de reactivos y la emisión de vapores y residuos que contaminan el medio ambiente, facilitándose el análisis de SST, AT, β-carotenos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis referencial.

En la tabla 1 y 2 se presentan los resultados de los análisis químicos de cada estado para calibrar el espectrofotómetro UV – Visible y los análisis químicos para validar la metodología.

Como se puede observar, los rangos de variación de este conjunto de muestras de validación están dentro del correspondiente

rango de variación del conjunto de muestras de calibración.

Los análisis de pH no estudiaron con profundidad ya que no es un valor que nos diga en su totalidad la cantidad ácidos individuales porque su principio básico es medir los hidrógenos libres de una solución, en su defecto es mejor analizar con la acidez titulable expresado en % de ácido cítrico.

3.2. Predicción del contenido de sólidos solubles totales.

Los sólidos solubles del zumo de los cítricos están formados, fundamentalmente, por los azúcares reductores y no reductores y por los ácidos.

Los principales azúcares, en los zumos de naranja son: sacarosa, glucosa y fructosa,

que suman alrededor del 75 % de los sólidos solubles totales, estando frecuentemente equilibrados los reductores y la sacarosa (Yúfera, E, 1998).

Se encontró una alta correlación de calibración entre el espectro UV-Visible y los valores referenciales SST %Brix con (r) de 0.96 y un error estándar de calibración de 0.34 %Brix (ver tabla 3). El modelo se aplicó para predecir otras 21 naranjas, teniendo una correlación (r) de 0.92 y error estándar de predicción de 0.47 %Brix, la regresora referencial SST %Brix presentó un valor $p < 0,0001$ es decir presenta una relación lineal significativa, sin embargo el coeficiente constante presentó un valor $p = 0.4438$, es decir no fue significativa su relación con los valores predichos UV-Vis %Brix (ver tabla 4).

Tabla 1. Composición química del grupo de muestras de fruta de naranjas usadas para calibrar el espectrofotómetro UV-Vis.

ESTADO 0					ESTADO 1				ESTADO 2			
Calibración	Rango	Promedio	DE	%CV	Rango	Promedio	DE	CV	Rango	Promedio	DE	CV
SST %Brix	7,85 - 8,30	8,10	0,20	2,5	8,38 - 8,75	8,53	0,15	1,75	8,89 - 9,16	9,00	0,10	1,15
% ácido cítrico	2,18 - 2,39	2,31	0,09	3,8	1,81 - 2,12	2,01	0,12	5,77	1,39 - 1,47	1,43	0,03	2,40
% ácido tartárico	2,56 - 2,80	2,71	0,10	3,8	2,13 - 2,48	2,35	0,14	5,78	1,63 - 1,72	1,68	0,04	2,40
% ácido málico	2,28 - 2,50	2,42	0,09	3,8	1,90 - 2,22	2,10	0,12	5,78	1,45 - 1,53	1,50	0,04	2,40
índice de madurez	3,44 - 3,62	3,50	0,08	2,3	3,96 - 4,65	4,25	0,25	5,89	6,09 - 6,48	6,29	0,15	2,31
ESTADO 3					ESTADO 4				ESTADO 5			
Calibración	Rango	Promedio	DE	CV	Rango	Promedio	DE	CV	Rango	Promedio	DE	CV
SST %Brix	9,20 - 9,46	9,34	0,11	1,1	9,60 - 10,15	9,92	0,23	2,28	10,21 - 10,85	10,68	0,26	2,46
% ácido cítrico	1,36 - 1,38	1,37	0,01	0,6	1,22 - 1,33	1,27	0,04	3,23	1,18 - 1,27	1,22	0,04	2,91
% ácido tartárico	1,60 - 1,62	1,61	0,01	0,6	1,43 - 1,56	1,49	0,05	3,23	1,38 - 1,49	1,43	0,04	2,91
% ácido málico	1,43 - 1,45	1,44	0,01	0,6	1,28 - 1,39	1,33	0,04	3,23	1,27 - 1,33	1,28	0,04	2,90
Índice de madurez	6,65 - 6,90	6,79	0,09	1,3	7,62 - 7,90	7,83	0,12	1,49	8,44 - 9,13	8,76	0,30	3,43
ESTADO 6												
Calibración	Rango	Promedio	DE	CV								
SST %Brix	10,95 - 12,61	11,55	0,67	5,84								
% ácido cítrico	0,89 - 1,14	1,03	0,11	10,50								
% ácido tartárico	1,05 - 1,34	1,21	0,13	10,47								
% ácido málico	0,94 - 1,19	1,08	0,11	10,48								
Índice de madurez	9,61 - 12,63	11,23	1,31	11,66								

Tabla 2. Composición química del grupo de muestras de fruta de naranjas utilizadas para el proceso de validación.

ESTADO 0					ESTADO 1				ESTADO 2			
Validacion	Rango	Promedio	DE	%CV	Rango	Promedio	DE	CV	Rango	Promedio	DE	CV
SST %Brix	8,24 - 8,32	8,28	0,04	0,5	8,56 - 8,73	8,65	0,09	1,03	8,85 - 9	8,93	0,08	0,84
% acido citrico	2,19 - 2,49	2,34	0,15	6,4	1,89 - 2,11	2,01	0,11	5,70	1,39 - 1,45	1,43	0,04	2,50
% acido tartarico	2,57 - 2,92	2,74	0,18	6,4	2,21 - 2,48	2,36	0,13	5,69	1,63 - 1,70	1,68	0,04	2,49
% acido malico	2,29 - 2,61	2,45	0,16	6,4	1,98 - 2,21	2,11	0,12	5,68	1,45 - 1,52	1,50	0,04	2,49
Indice de madurez	3,31 - 3,78	3,54	0,23	6,6	4,13 - 4,53	4,30	0,20	4,77	6,09 - 6,44	6,25	0,18	2,88
ESTADO 3					ESTADO 4				ESTADO 5			
Validacion	Rango	Promedio	DE	CV	Rango	Promedio	DE	CV	Rango	Promedio	DE	CV
SST %Brix	9,20 - 9,40	9,28	0,10	1,1	9,63 - 10,10	9,91	0,25	2,47	10,23 - 10,60	10,36	0,21	2,04
% acido citrico	1,37 - 1,38	1,38	0,01	0,5	1,23 - 1,30	1,26	0,04	2,92	1,18 - 1,23	1,21	0,02	1,96
% acido tartarico	1,61 - 1,62	1,62	0,01	0,5	1,44 - 1,52	1,48	0,04	2,91	1,39 - 1,44	1,42	0,03	1,96
% acido malico	1,43 - 1,45	1,44	0,01	0,5	1,28 - 1,36	1,32	0,04	2,92	1,24 - 1,29	1,26	0,02	1,97
Indice de madurez	6,65 - 6,86	6,74	0,11	1,6	7,68 - 8,23	7,87	0,32	4,01	8,31 - 8,77	8,51	0,24	2,82
ESTADO 6												
Validacion	Rango	Promedio	DE	CV								
SST %Brix	10,96- 12,65	11,61	0,91	7,81								
% acido citrico	0,97 - 1,13	1,06	0,09	8,11								
% acido tartarico	1,13 - 1,32	1,25	0,10	8,06								
% acido malico	1,01 - 1,18	1,11	0,09	8,11								
Indice de madurez	10,20 - 11,34	10,91	0,63	5,73								

Dado que el gráfico (ver figura 5), sugiere un componente cuadrático, se realizó un ajuste con una función polinómica grado 2 con la que se obtuvo una correlación (r) de 0.98, una reducción del error estándar de predicción a 0.26 %Brix y el coeficiente constante presento un valor $p < 0,0001$, presentando una relación lineal significativa (ver tabla 5 y figura 6).

Tabla 3. Análisis de regresión calibración a 292 nm.

Variable	N	R ²	R ² Aj	Coef. C	E.E.C
concentracion SST %BRIX	35	0,92	0,92	0,96	0,34

Coefficientes de regresión y estadísticos asoc

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	7,92	0,1	7,71	8,13	76,91	<0,0001
absorbancia	1,09	0,06	0,97	1,2	19,44	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	43,48	1	43,48	377,86	<0,0001
absorbancia	43,48	1	43,48	377,86	<0,0001
Error	3,8	33	0,12		
Total	47,27	34			

E.E.C = Error estándar de calibración.

Tabla 4. Análisis de regresión validación a 292 nm.

Variable	N	R ²	R ² Aj	Coef. C	E.E.P
Predichos UV-Vis %Brix	21	0,84	0,83	0,92	0,47

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	0,7	0,89	-1,17	2,57	0,78	0,4438
Ref. SST %Brix	0,92	0,09	0,73	1,12	9,94	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21,82	1	21,82	98,77	<0,0001
Ref. SST %Brix	21,82	1	21,82	98,77	<0,0001
Error	4,2	19	0,22		
Total	26,01	20			

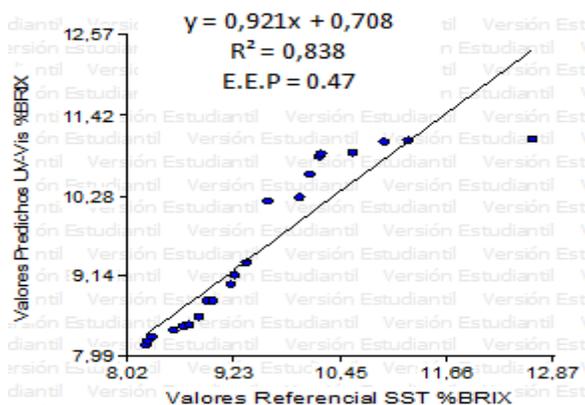


Fig. 5. Resultados de predicción UV-Vis establecido con el modelo de regresión lineal para SST %Brix.

Tabla 5. Análisis de regresión lineal modelo polinómico 2° grado, validación a 292 nm.

Variable	N	R ²	R ² Aj	Coef. C	E.E.P
Predichos UV-Vis %Brix	21	0,95	0,95	0,98	0,26

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	-23,47	3,8	-31,44	-15,5	-6,18	<0,0001
Ref. SST %Brix	5,77	0,76	4,18	7,36	7,63	<0,0001
Ref ² SST %Brix	-0,24	0,04	-0,32	-0,16	-6,43	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24,74	2	12,37	174,77	<0,0001
Ref. SST %Brix	21,82	1	21,82	308,25	<0,0001
Ref ² SST %Brix	2,92	1	2,92	41,3	<0,0001
Error	1,27	18	0,07		
Total	26,01	20			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24,74	2	12,37	174,77	<0,0001
Ref. SST %Brix	24,74	2	12,37	174,77	<0,0001
Error	1,27	18	0,07		
Total	26,01	20			

SC tipo I= se refiere al orden de los términos del modelo que se relacionan con una jerarquía que es útil para su interpretación, por ejemplo: modelos con términos polinómicos.

SC tipo III= se refiere al reflejo de la contribución de cada término del modelo, dado que todos los otros términos están también presentes en el modelo.

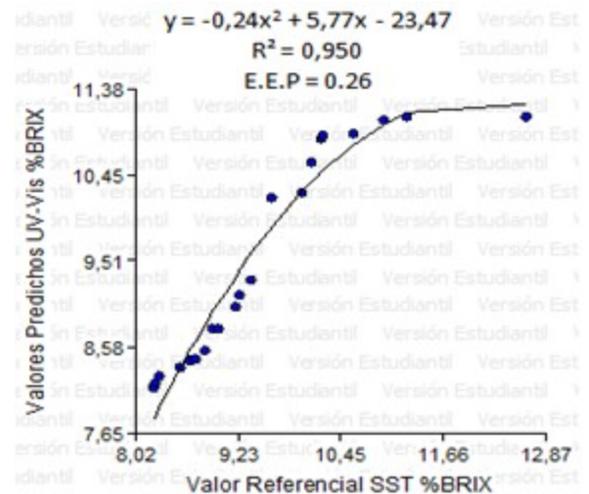


Fig. 6. Resultados de predicción UV-Vis establecido con el modelo de regresión lineal polinómica 2° grado para SST %Brix.

Aunque no hay reportes sobre el valor de regresión de validación en SST por UV-Vis, el valor de la regresión de este trabajo es similar a estos obtenidos en otras frutas por NIRS; $r = 0.91$ en tomate (Shao et al., 2007) y $r = 0.92$ en kiwi (McGlone et al., 2002). De otra manera, se ha encontrado buenos resultados en mandarina 'Satsuma' $r = 0.96$ (Gomez et al., 2006), y en manzana 'Fuji' con $r = 0.97$ (Liu & Ying, 2005).

3.3. Predicción del contenido del % ácido cítrico.

La determinación de la acidez de zumos comerciales y naturales se lleva a cabo mediante una valoración ácido-base; los resultados que se obtienen corresponden a la suma de los ácidos minerales y orgánicos, aunque de manera general en el caso de frutas y hortalizas, se tratan de los ácidos cítrico, málico, oxálico y tartárico (Yúfera, E, 1998)

La correlación de calibración entre el espectro UV-Vis y el % de ácido cítrico fue bueno con un r igual a 0.86 y un E.E.C de 0.23 % A. Cítrico (ver tabla 6); en la aplicación del modelo para predecir otras 21 frutas de naranja los resultados fueron similares con un $r = 0.85$ y un E.E.P de 0.23 % A. Cítrico. Sin embargo el E.E.P siendo bajo, el coeficiente constante no tuvo relación significativa con los valores predichos de UV-Vis % A. Cítrico con un valor $\rho = 0,148$; por lo anterior se realizó un ajuste con el modelo de regresión lineal polinómica de 2º grado. Con la que se obtuvo una correlación (r) de 0.95, una reducción del error estándar de predicción a 0.14 % A. Cítrico y el coeficiente constante presento un valor $\rho < 0,0001$, presentando una relación lineal significativa (ver tabla 7 y figura 7).

Aunque no hay reportes sobre trabajos realizados sobre el valor de regresión de validación en A. Cítrico por UV-Vis, existen pocos trabajos realizados con la técnica NIRS en manzana 'Fuji', Liu and Ying (2005) obtuvo un modelo de predicción $r = 0.72$ y un E.E.P = 0.0043 g/100 gr de peso fresco expresado en % A. Málico.

En la figura 8 se observa que no existen diferencias significativas entre los valores estimados al aplicar la ecuación de calibración con respecto a los obtenidos por métodos químicos para los componentes medidos.

Tabla 6. Análisis de regresión calibración a 246 nm

Variable	N	R ²	R ² Aj	Coef. C	E.E.C
% A. Cítrico	35	0,73	0,72	0,86	0,23

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E. LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	
const	0,43	0,12	0,18	0,67	3,49	0,0014
absorbancia	0,62	0,07	0,49	0,75	9,48	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,83	1	4,83	89,95	<0,0001
absorbancia	4,83	1	4,83	89,95	<0,0001
Error	1,77	33	0,05		
Total	6,61	34			

Tabla 7. Análisis de regresión lineal modelo polinómico 2º grado, validación a 246 nm.

Variable	N	R ²	R ² Aj	Coef. C	E.E.P
Predichos UV-Vis % A. Cítrico	21	0,91	0,9	0,95	0,14

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E. LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	
const	-3	0,55	-4,15	-1,84	-5,46	<0,0001
Ref % A. Cítrico	4,91	0,68	3,48	6,34	7,23	<0,0001
Ref ² % A. Cítrico	-1,19	0,2	-1,6	-0,78	-6,08	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,26	2	1,63	88,95	<0,0001
Ref % A. Cítrico	2,59	1	2,59	140,94	<0,0001
Ref ² % A. Cítrico	0,68	1	0,68	36,96	<0,0001
Error	0,33	18	0,02		
Total	3,59	20			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,26	2	1,63	88,95	<0,0001
Ref % A. Cítrico	3,26	2	1,63	88,95	<0,0001
Error	0,33	18	0,02		
Total	3,59	20			

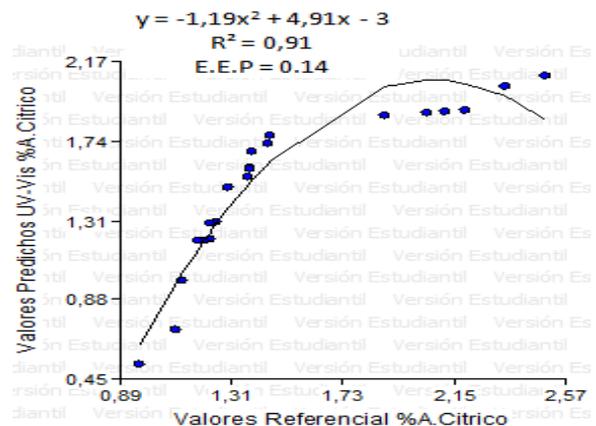
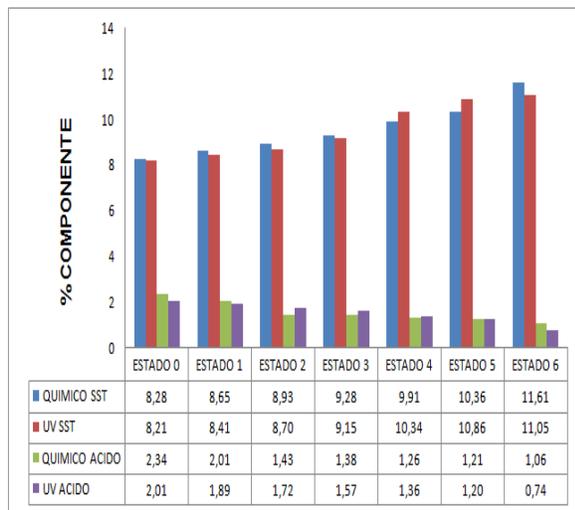


Figura 7. Resultados de predicción UV-Vis establecido con el modelo de regresión lineal polinómica 2º grado para % A. Cítrico.

El análisis estadístico permite comparar los resultados de los análisis químicos con los valores obtenidos a partir de los espectros UV-Vis y así obtener los respectivos parámetros de validación mediante el programa Microsoft Excel. Éste genera un conjunto de datos, los cuales se encuentran en la Figura 8.

Los componentes presentaron un error de predicción entre 0.14 y 0.46% máximo, lo cual significa que el modelo de calibración se ajusta a las muestras ya que no sobrepasaron el 10% aceptado.



3.4. Predicción del contenido de β -Carotenos mg/ml.

Este es el carotenoide más abundante en la naturaleza y el más importante para la dieta humana, por lo que da su nombre a todo un grupo de compuestos bioquímicos.

El espectro de absorción del β -caroteno muestra dos picos de absorción entre los 400 nm y 500 nm, correspondiente al azul y verde, por lo que la luz roja-anaranjada-amarilla que refleja le proporciona su color característico.

Se usó la curva de calibración ya establecida para el sigma de trans-beta-caroteno, obtenida a partir de soluciones preparadas con acetona a diferentes concentraciones, medida a una longitud de

onda de 455 nm, celdas de cuarzo de 1.0 cm de recorrido óptico, obteniendo una ecuación de predicho UV-Vis (ver tabla 8).

$Y=4,28x + 0,01$ con $r= 1$ y un E.E.C igual a 0.00648 mg/ml de β -Carotenos.

Tabla 8. Curva de calibración de carotenos Concentración en mg/ml.

Concentracion mg/ml	Absorbancia
0,00	0,00
0,20	0,043
0,25	0,057
0,30	0,068
0,35	0,081
0,40	0,093

Para poder validar este método para predecir el contenido de β -carotenos, se realizó una curva patrón con las muestras de cada estado de las frutas de naranjas, obteniendo como resultado un $r= 1$ y un E.E.P igual a 0.000616 mg/ml β -carotenos (ver tabla 9).

Tabla 9. Análisis de regresión calibración a 455 nm.

Variable	N	R ²	R ² Aj	coef. C.	E.E.C	
Conc. β -carot. mg/ml	35	1	1	1	6,16E-04	
Coeficientes de regresión y estadísticos asociados						
Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	0,01	3,10E-04	0,01	0,01	32,45	<0,0001
absorbancias	4,28	1,60E-04	4,28	4,28	26425,28	<0,0001
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	266,83	1	266,83	7E+08	<0,0001	
absorbancias	266,83	1	266,83	7E+08	<0,0001	
Error	1,30E-05	33	3,80E-07			
Total	266,83	34				

Como se puede observar la ecuación puede predecir el contenido de β -carotenos en frutas de naranjas con un error estándar menor de 0.05 de probabilidad y un $r= 1$.

4. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.

El procesamiento de una imagen busca modificar dicha imagen para que el de segmentación produzca los resultados

aumento de la velocidad en la realización del análisis de rutina en los laboratorios.

- Es posible obtener una buena predicción del contenido de los componentes de calidad como SST % Brix, % A. Cítrico y β -carotenos en longitudes de onda de 292, 246 y 455 nm en UV-Vis, respectivamente.
- Las ecuaciones evaluadas en calibración presentaron coeficientes de determinación superiores al 70%, y correlaciones por encima del 80% estos valores son bajos debido a la variabilidad natural del material experimental y a causa de la variabilidad de las desviaciones de los datos dentro de la cantidad limitada de las muestras.
- Para la realización de la curva de calibración y posterior validación se requiere gran cantidad de muestras que tengan un amplio rango en sus valores de componentes de calidad interna para que, así mismo, se vean reflejados en los resultados.
- Con respecto al procesamiento de imágenes se presentaron dificultades en el proceso ya que el color se ve afectado por la iluminación y por la toma de fotografía, sin embargo cabe decir que con una buena iluminación para cada fotografía podríamos crear un sistema de clasificación de frutas por medio del color y relacionarlos con los parámetros de calidad ya antes mencionados.

REFERENCIAS

GUTHRIE, J.A., WALSH, K.B., REID, D.J., LIEBENSBERG, C.J., 2005. Assesment of internal quality attributes of mandarin fruit. 1. NIR calibration model development. Aust. J. Agric. Res. 56, 405–416.

KAWANO, S., 1994. Non-destructive NIR quality evaluation of fruits and vegetables in Japan. NIR News 5, 10–12.

MIYAMOTO, K., KITANO, Y., 1995. Non-destructive determination of sugar content in Satsuma mandarin fruit by near infrared transmittance spectroscopy. J. NIR Spectrosc. 3, 227–237.

JIMÉNEZ, P. Identificación de harinas de yuca (*Manihot esculenta* crantz) con alto contenido proteico mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 2007.

VÁSQUEZ, D; ABADÍA, B Y ARREAZA, L., 2004. Aplicación de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano de maíz. Revista Corpoica, vol. 5 n°1, Octubre.

SKOOG, D. A., HOLER, F. J., NIEMAN, T. A. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. 1992.

GARRIDO, V.A, PÉREZ, M.D, GUERRERO, J.E Y GÓMEZ, C.A. Avances en la utilización de la tecnología NIRS, aplicaciones en producción animal. Universidad Politécnica de Córdoba, España. 2000.

ALOMAR, D., FUSCHLOCHER, R. Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. En: Agrosur, Vol 26, N°1, Valdivia, Chile. 1998.

KENNEDY, C.A, SHELFORD, J.A Y WILLIAMS, P.C. Near infrared spectroscopy analysis of intact grass silage and fresh grass for dry matter, crude protein and acid detergent fiber. In AMC Davies y P. Wilhams,. Near infrared spectroscopy: The future Waves. Proceeding of the 7th International conference on near infrared spectroscopy, Montreal, Canada, Agosto

1996. Nir Publication, Chichester, Uk. Pp 524-530.

SHAO, Y., HE, Y., GOMEZ, A. H., PEREIRA, A. G., QIU, Z., & ZHANG, Y. (2007). Visible/near infrared spectrometric technique for non-destructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicum esculentum*) quality characteristics. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 672–678.

McGlone, V. A., Jordan, R. B., Seelye, R., & Martinsen, P. J. (2002). Comparing density and NIR methods for measurement of kiwi dry matter and soluble solids content. *Postharvest Biology and Technology*, 26(2), 191–198.

Gómez, A. H., He, Y., & Pereira, A. G. (2006). Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR spectroscopy techniques. *Journal of Food Engineering*, 77(2), 313–319.

Liu, Y., & Ying, Y. (2005). Use of FT-NIR spectrometry in non-invasive measurements of internal quality of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 65–71.

Norma Técnica Colombiana 4086 para Naranja Valencia, 1997.

Arthey, D. y Ashurst, P.R. (1997) *Procesado de frutas*. Ed Acribia. Zaragoza.

Yúfera, E. *Química de los alimentos*. Editorial Síntesis, 1998.