

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS
MESTRADO EM INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS

BRUNA DANIELY BASSETTI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ALTERNATIVO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS EM INDÚSTRIA DE ÓLEO DE
SOJA UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2019

BRUNA DANIELY BASSETTI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ALTERNATIVO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS EM INDÚSTRIA DE ÓLEO DE
SOJA UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Inovações Tecnológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Inovações Tecnológicas em Gestão da Produção e Qualidade.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Valderrama

CAMPO MOURÃO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B319 Bassetti, Bruna Daniely

Desenvolvimento de método alternativo para quantificação de clorofilas em indústria de óleo de soja utilizando imagens digitais / Bruna Daniely Bassetti. – Campo Mourão, 2019.

23 f.: il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Patrícia Valderrama.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Inovações Tecnológicas, Campo Mourão, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Quimiometria. 2. Óleos vegetais. 3. Calibração multivariada. 4. Inovações tecnológicas – Dissertações. I. Walderrama, Patrícia, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Inovações Tecnológicas. IV. Título.

CDD (22. ed.) 658.514

Biblioteca da UTFPR - Câmpus Campo Mourão

Bibliotecária/Documentalista:
Andréia Del Conte de Paiva – CRB-9/1525



TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ALTERNATIVO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS EM INDÚSTRIA DE ÓLEO DE SOJA UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS

por

BRUNA DANIELY BASSETTI

Esta Dissertação foi apresentada em 14 de setembro de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovações Tecnológicas. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Patrícia Valderrama
Prof.(a) Orientador(a)

Wyrllen Souza
Membro titular

Leonardo Pim Petean
Membro titular

RESUMO

BASSETTI, Bruna Daniely. **Desenvolvimento de método alternativo para quantificação de clorofilas em indústria de óleo utilizando imagens digitais.** 2019. 23 folhas. Qualificação (Mestrado em Inovações Tecnológicas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2019.

A clorofila é o pigmento mais abundante na natureza, cujo principal papel é a absorção da luz solar e a sua conversão para energia química durante a fotossíntese. Ela está presente em várias espécies vegetais e entre elas estão as oleaginosas, as quais nos fornecem os óleos comestíveis. Devido à exigência, por parte dos consumidores que os óleos vegetais apresentem um aspecto claro, há a necessidade de retirar esses pigmentos no processamento dos mesmos. Desse modo, existe a etapa de branqueamento, que ao adicionar terras clarificantes, retiram esse pigmento. Para garantir que os óleos refinados estejam dentro do limite especificado pela indústria, são realizadas análises empregando um espectrofotômetro. O método consiste em fazer leituras em comprimentos de onda no qual a cor verde é emitida (630, 670 e 710 nm), utilizando diclorometano como branco. A fim de agilizar o processo e tomada de decisão e reduzir consumo de reagentes, propõe-se utilizar um método alternativo a partir de imagens digitais provenientes de uma *webcam* associados a métodos quimiométricos para determinação de clorofilas em indústrias de óleo de soja. Cada imagem gera um tensor de dados numéricos que são desdobrados em histogramas de cor e modelados através da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). O método proposto mostrou-se eficaz na determinação de clorofilas, com indicadores de exatidão avaliados através dos erros na etapa de calibração e validação externa, bem como a consideração do ajuste. Além disso, o modelo consegue detectar concentrações de clorofila de 10,48 ppb e é capaz de quantificar com exatidão e precisão amostras com concentração de clorofila superiores a 31,77 ppb.

Palavras-chave: Quimiometria, *Web cam*, Calibração multivariada, PLS, Parâmetros de mérito.

ABSTRACT

BASSETTI, Bruna Daniely. **Development of an alternative method for quantification of chlorophylls in the oil industry using digital images.** 2019. 23 sheets. Qualification (Master in Technological Innovations) - Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2019.

Chlorophyll is the most abundant pigment in nature whose main role is the absorption of sunlight and its conversion to chemical energy during photosynthesis. It is present in various plant species and among them are oilseeds, which provide us with edible oils. Due to the demand from consumers that vegetable oils have a clear appearance, there is a need to remove these pigments in their processing. Thus, there is the bleaching step, which by adding clarifying earth, remove this pigment. To ensure that refined oils are within the industry specified range, analyzes are performed using a spectrophotometer. The method consists of taking wavelength readings at which the green color is emitted (630, 670 and 710 nm) using dichloromethane as a white test. In order to streamline the process and decision making and reduce reagent consumption, it is proposed to use an alternative method from digital webcam images associated with chemometric methods for chlorophyll determination in soybean oil industries. Each image generates a tensor of numerical data that is broken down into color histograms and modeled by partial least squares regression (PLS). The proposed method was effective in the determination of chlorophylls, with accuracy indicators evaluated through errors in the calibration and external validation stage, as well as the consideration of the adjustment. In addition, the model can detect chlorophyll concentrations of 10.48 ppb and is able to accurately and accurately quantify samples with chlorophyll concentrations greater than 31.77 ppb.

Keywords: Chemometrics, Web Cam, Multivariate Calibration, PLS, Merit Parameters.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Mínimos quadrados parciais (PLS).....	12
3.2 Parâmetros de mérito.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5 CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

Determinadas sementes, polpas de certos frutos e germes de alguns cereais, colocam-se como as mais importantes fontes de óleos vegetais. Esses óleos brutos vegetais apresentam naturalmente quantidades significativas de pigmentos indesejáveis, porém, alguns outros são produzidos por modificações e decomposição da matéria-prima durante a estocagem, transporte e processamento. A cor intensa de muitos óleos brutos resulta de várias espécies coloridas e pigmentos. As mais importantes são os carotenos e carotenóides (do vermelho-amarelado ao vermelho forte), assim como da clorofila e seus derivados (verde escuro) (HENDRY; PRICE, 1993).

Os consumidores de óleos vegetais preferem uma aparência translúcida desses produtos e, para alcançar esse resultado, a indústria aplica o processo de branqueamento com argilas clarificantes. Essas argilas são ativadas com ácido sulfúrico ou clorídrico, e tem função de adsorver pigmentos corantes. De acordo com as especificações correntes nos processos industriais, a concentração de clorofila deve estar em torno de 50ppb (0,05 ppm) podendo chegar ao limite de 100ppb, pois a clorofila é um elemento pró-oxidante e prejudica a qualidade dos óleos devido à sua cor intensa (DORSA, 2000).

Segundo Bormann (2009), a clorofila é o pigmento mais abundante na natureza, cujo principal papel é a absorção da luz solar e a sua conversão para energia química durante a fotossíntese. A clorofila se subdivide em clorofila 'a', que corresponde a 75% dos pigmentos verdes totais; e clorofila *b*.

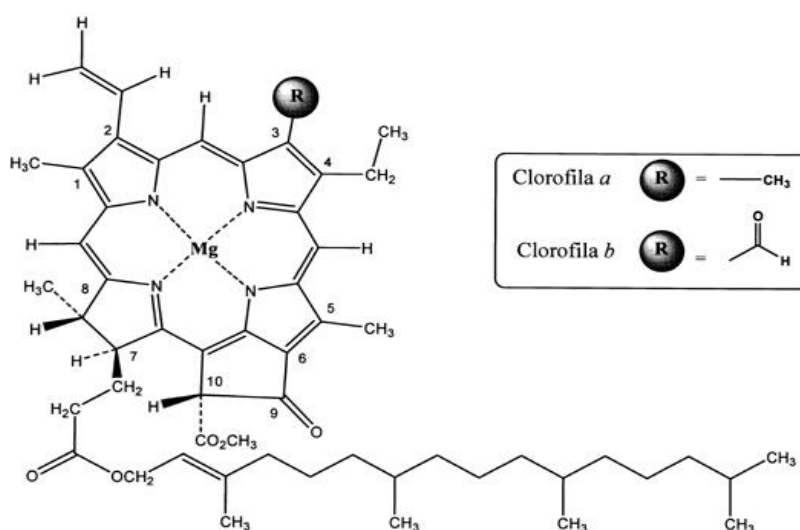
Os pigmentos fotossintéticos presentes nos vegetais e alguns organismos vivos variam de acordo com a sua espécie. A clorofila *a* (Chl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. As bactérias fotossintetizantes são desprovidas de clorofila *a* e possuem em seu lugar a bacterioclorofila como pigmento fotossintético. A Chl *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Os principais pigmentos acessórios também incluem outros tipos de

clorofilas: Chl *b*, presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; Chl *c*, em feofitas e diatomáceas; e Chl *d*, em algas vermelhas (STREIT et al., 2005).

A clorofila é uma molécula complexa que possui um átomo de magnésio central, mantido por um anel de porfirinas (Figura 1). Os máximos de absorção (comprimento de onda correspondente a um pico na curva de absorção de luz) da clorofila *a* são 420 e 660 nm nas regiões azul e vermelho, respectivamente. Os máximos de absorção da clorofila *b* correspondem, respectivamente, a 435 e 643 nm nas regiões azul e vermelho (VON ELBE, 2000).

As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) no C-3 e a clorofila *b* contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil-CH₃ (STREIT et al., 2005).

Figura 1. Estrutura química da clorofila *a* e *b*



Fonte: Streit et al. (2005).

Para controle do processo industrial de óleo de soja refinado aplica-se o método de determinação de clorofilas por espectrofotometria descrito pela AOCS cc13d-55/2009 (AOCS, 2009). Essa metodologia é demorada, utiliza solvente orgânico como diclorometano, gerando resíduos que precisam ser descartados adequadamente.

Afim de diminuir o tempo de tomada de decisão e agilizar o processo de refino do óleo de soja, este trabalho tem por objetivo apresentar resultados de uma metodologia alternativa para previsão de clorofila em óleo branqueado empregando imagens digitais. Dessa forma, caso a metodologia seja implementada pela indústria para o monitoramento *on-line* a resposta será imediata.

2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA

O método AOCS cc13d-55/2009 atualmente é o método oficial utilizado pelas indústrias de refino de óleo de soja para a quantificação de clorofila durante o processo de produção de óleo de soja. Este método apresenta algumas desvantagens como tempo de espera do resultado, limite por turno industrial de amostras analisadas, consumo de reagentes, tempo excessivo para tomada de ações no controle de processo, além da geração de resíduos que deverão ser descartados adequadamente (BORRMANN, 2009). No método AOCS cc13d-55/2009 o solvente diclorometano é colocado em uma cubeta de 50 mm. Com a cubeta de diclorometano calibra-se o espectrofotômetro no comprimento de onda 630nm e após realiza-se a leitura de absorbância da amostra. O procedimento é repetido para os comprimentos de onda 670nm e 710nm e em seguida realizado um cálculo para chegar ao valor da concentração de clorofila.

As moléculas de clorofila são capazes de absorvem a energia luminosa (fótons) e assim alteram as suas configurações eletrônicas de forma temporária. Estes pigmentos passam do estado fundamental (Chl *a*) para o estado de maior energia e de maior instabilidade denominado de singlet 1 (Chl *a*^{*}) (CAMPOSTRINI, 2011). A variação da energia interna de uma molécula quando absorve, emite ou espalha radiação eletromagnética está associada à excitação de elétrons e pode então ser determinada por espectroscopia molecular (PAVIA, 2001).

Magalhães (2012), ao investigar fluoróforos presentes no biodiesel produzido a partir de diferentes óleos vegetais, determinou clorofilas por fluorescência molecular e concluiu que a concentração de clorofila é elevada em óleos brutos que

não sofreram algum processo de clarificação e purificação, mas reduzida nos óleos considerados no estudo, logo, a intensidade de fluorescência da clorofila não afeta de maneira significativa a fluorescência dos biodiesel estudados.

A clorofila *a* foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por Proença (1997). No estudo, foi realizada a determinação de pigmentos fotossintéticos em oceanografia e, estes pigmentos incluíam clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas.

Uma câmera RGB-NIR (Red Green Blue – Near InfraRed) foi empregada para determinação em campo do teor de clorofila em milho (Zhang et al., 2018). A espectroscopia NIR também já foi empregada na detecção de clorofila *a* em corpos de água (Yang et al., 2017), chás produzidos em sombra (Sonobe et al., 2018), em folhas de cafés (Putra e Soni, 2018) e pinheiros coreanos (Li et al., 2011). A espectroscopia nas regiões do visível e infravermelho próximo (VIS-NIR) foi utilizada na determinação de clorofila em folhas de girassol (STEIDLE NETO et al., 2017).

Nos últimos anos o número de trabalhos envolvendo imagens digitais e quimiometria aumentou consideravelmente. Uma pesquisa efetuada no site de busca <www.sciencedirect.com> utilizando as palavras “imagem digital” (digital image) e “quimiometria” (chemometrics) em 2017 mostrou um total de 160 trabalhos publicados, 2018 teve 227 publicações e este ano até o início do mês de setembro já foram publicados 197 trabalhos. Desse modo, propõe-se avaliar um método alternativo acoplado a quimiometria para determinar clorofilas em indústria de óleo de soja.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se amostras de óleo branqueado cedidas por uma empresa de extração e refinamento de óleo de soja. As imagens digitais foram obtidas na própria indústria no momento da análise utilizada como referência para a determinação da clorofila. O ambiente foi mantido climatizado a 20°C e empregou-se uma *webcam* da marca Logitech (modelo C270, 3MP) com uma distância de 20 cm (+/- 1 cm) entre a amostra (20 mL acondicionada em um frasco de formato oval e cor branco leitoso) e

a webcam, sob luz fluorescente (Foto 1). A calibração multivariada foi desenvolvida empregando-se o software Matlab R2007b com as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

Foto 1. Esquema de obtenção das imagens digitais do óleo branqueado



Para a determinação da concentração de clorofila pelo método convencional, aplicou-se o procedimento descrito abaixo de acordo com AOCS Cc13d-55/2009.

1. Em uma cubeta de 10 mm, colocou-se o diclorometano até aproximadamente 90% do volume total da cubeta;
2. Em outra cubeta de 10 mm, colocou-se a amostra a ser analisada;
3. Com a cubeta com diclorometano, calibrou-se o espectrofotômetro no comprimento de onda 630 nm;
4. Inseriu-se a cubeta com a amostra no outro compartimento do espectrofotômetro, realizou-se a leitura no comprimento de onda 630 nm
5. Repetiu-se o procedimento para os comprimentos de onda 670 e 710nm e com as respectivas absorbâncias, realizou-se o cálculo conforme equação 1.

$$C = \frac{A_{670} - (A_{630} + A_{710})/2}{0,0964.L} \cdot 100 \quad (1)$$

Em que:

A = absorvância;

L = caminho óptico (cm);

C = concentração de clorofila;

0,0964 = constante denominada de fator específico do espectrofômetro.

3.1 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os dados extraídos de imagens digitais foram tratados pela regressão PLS. Nesta ferramenta, a decomposição da matriz **X** por análise de componentes principais (PCA) é realizada e a informação de **y** é incorporada, de forma que cada componente principal (PC) do modelo sofre uma pequena modificação para buscar a máxima covariância entre **X** e **Y** e passa a receber a terminologia de Variável Latente (VL) (OTTO, 1999).

O modelo PLS é obtido através de um processo iterativo, no qual se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre os *loadings* para a determinação dos *scores* e o ajuste por uma função linear dos *scores* e *loadings* da matriz **X** (Equação 2) aos *scores* da matriz **Y** (Equação 3) de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea ocasiona pequenas distorções nas direções dos *loadings*, de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. No entanto, são essas pequenas redundâncias que otimizam a relação linear entre os *scores* e estas distorções da ortogonalidade entre os PCs no PLS fazem com que os mesmos não sejam mais componentes principais (que são ortogonais) e sim variáveis latentes (OTTO, 1999; VANDEGINSTE, 1998).

A regressão por mínimos quadrados parciais estende o conceito do modelo inverso (propriedade como função da resposta instrumental) trocando as variáveis originais por um subconjunto truncado das variáveis latentes dos dados originais (VANDEGINSTE, 1998; BEEBE, 1987). Considerando um caso geral para a determinação de mais de uma espécie de interesse, logo **Y** é uma matriz de dimensão ($n \times z$), onde z é o número de colunas de **Y**, tem-se a decomposição de ambas as matrizes **X** de dimensão ($n \times m$) e **Y** em suas matrizes de *scores* e *loadings* (OTTO, 1999):

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_x = \sum \mathbf{t}_A \mathbf{p}_A^T + \mathbf{E}_x \quad (2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{E}_y = \sum \mathbf{u}_A \mathbf{q}_A^T + \mathbf{E}_y \quad (3)$$

Em que:

\mathbf{X} = matriz de respostas instrumentais;

\mathbf{Y} = matriz de respostas da propriedade de interesse ou os valores tidos como verdadeiros;

\mathbf{T} e \mathbf{U} = scores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente;

\mathbf{A} = variáveis latentes;

\mathbf{P} e \mathbf{Q} = *loadings* de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente;

\mathbf{E}_x e \mathbf{E}_y = matrizes de resíduos composta pelas variáveis latentes descartadas, ou seja, as matrizes que contém a parte não modelada.

Entre os *scores* de \mathbf{X} e os *scores* de \mathbf{Y} , uma relação linear (Equação 4) é então estabelecida (OTTO, 1999):

$$\hat{\mathbf{u}}_A = \mathbf{b}_A \hat{\mathbf{t}}_A \quad (4)$$

Em que,

\mathbf{b}_A = coeficientes de regressão do modelo linear para cada variável latente, obtido através da Equação 5:

$$\mathbf{b}_A = \frac{\mathbf{u}_A^T \mathbf{t}_A}{\mathbf{t}_A^T \mathbf{t}_A} \quad (5)$$

3.2 Parâmetros de mérito

A validação do modelo PLS foi realizada através do cálculo de parâmetros de mérito como: exatidão, linearidade, sensibilidade, sensibilidade analítica, ajuste, limites de detecção e quantificação. Os cálculos foram realizados com base nas equações apresentadas na Quadro 1 (SANTOS, et al., 2016; BELTRAME, et al., 2016).

Quadro 1. Equações para calcular os parâmetros de mérito

Parâmetros de mérito	Equação
Exatidão	$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{nv} (y_i - \hat{y}_i)^2}{nv}}$
	$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{nc} (y_i - \hat{y}_i)^2}{nc - nVL + 1}}$
Sensibilidade	$Sensibilidade = \frac{1}{\ \mathbf{b}\ }$
Sensibilidade Analítica	$Sensibilidade Analítica = \frac{Sensibilidade}{\ \delta x\ }$
Sensibilidade Analítica ⁻¹	$Sensibilidade Analítica^{-1} = \frac{1}{Sensibilidade Analítica}$
Limite de detecção	$\text{Limite de detecção} = 3.3\delta x \ \mathbf{b}\ = 3.3\delta x \frac{1}{Sensibilidade}$
Limite de quantificação	$\text{Limite de quantificação} = 10\delta x \ \mathbf{b}\ = 10\delta x \frac{1}{Sensibilidade}$
Relação de desempenho do desvio	$RPD_{val} = \frac{DP_{val}}{RMSEP}$

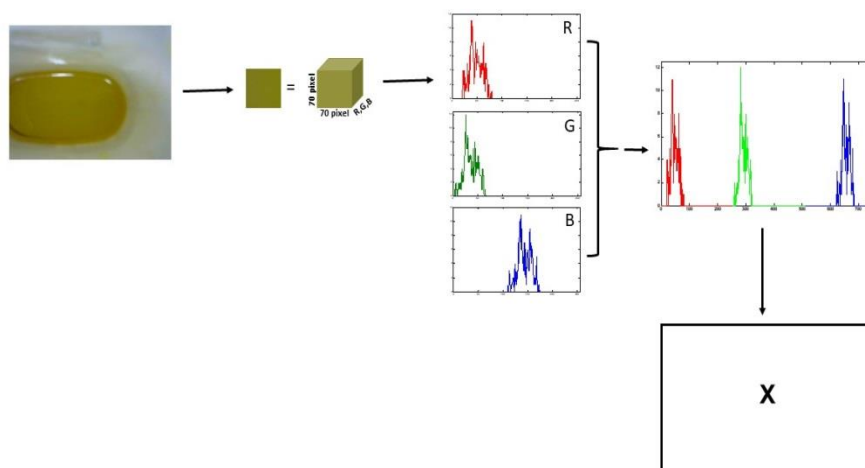
nv é o número de amostras no conjunto de validação, y_i é o valor de referência da amostra i e \hat{y}_i é o valor previsto da amostra i , nc é o número de amostras no conjunto de calibração, nVL é o número de Variáveis Latentes, $RMSECV$ é o Erro Quadrado Médio da Raiz para Validação Cruzada, \mathbf{b} é o vetor dos coeficientes de regressão, δx é uma estimativa para o ruído instrumental. Na equação do $RMSEC$, o "+1" é adicionado quando os dados são centrados na média. DP_{val} é o desvio padrão dos valores de referência para as amostras no conjunto de validação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta um esquema para obtenção de uma matriz \mathbf{X} a partir de imagens digitais obtida através da *webcam* para diferentes amostras de óleo branqueado. Cada imagem 70 x 70 *pixels* foi importada para o ambiente de trabalho do Matlab gerando um tensor de dimensões {70,70,3}, em que o número 3 corresponde as variáveis R (vermelho), G (verde) e B (azul). As variáveis R, G e B podem assumir valores entre 0 e 255, então cada amostra, após desdobramento do

tensor, gerou um vetor com dimensão 1×768 (256 possíveis valores para as variáveis R, G e B dispostas lado a lado). A partir do vetor de dados, para cada amostra, foi montada a matriz X .

Figura 2. Esquema para a geração da matriz X a partir das imagens digitais



Fonte: Adaptado de Valderrama e Valderrama (2016).

A separação das amostras entre os conjuntos de calibração e validação, realizado pelo algoritmo de Kennard-Stone (KENARD; STONE, 1969), resultou em um total de 215 e 75 amostras para os conjuntos de calibração e validação, respectivamente.

A otimização dos conjuntos de calibração e validação, pela eliminação das amostras anômalas, foi realizada de acordo com a norma da ASTM E1655-05 (Annual Book of ASTM Standards, 2005). Nesta otimização são avaliadas as amostras anômalas com relação ao *leverage*, ao resíduo espectral e o resíduo na variável dependente.

O número de variáveis latentes (VLs) para cada modelo de calibração multivariada foi determinado através dos resultados da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) para as amostras de calibração, obtido pelo método de blocos contínuos de 5 amostras. Assim, o modelo foi construído com um total de 20VLs.

A Tabela 1 apresenta os resultados para os valores de erro médio quadrático da calibração (RMSEC) e validação (RMSEP) do modelo otimizado.

Esses valores são considerados como um dos indicadores de exatidão do modelo multivariado (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009), e indicam que o número de variáveis latentes utilizado foi escolhido corretamente, não havendo sobre ajuste ou falta de ajuste. Entretanto, os valores de RMSEP e RMSEC são parâmetros globais que incorporam erros sistemáticos e aleatórios. Sendo assim, um outro indicador de exatidão é a regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo (ajuste), mostrado na Figura 3.

Tabela 1. Parâmetros de validação do modelo PLS

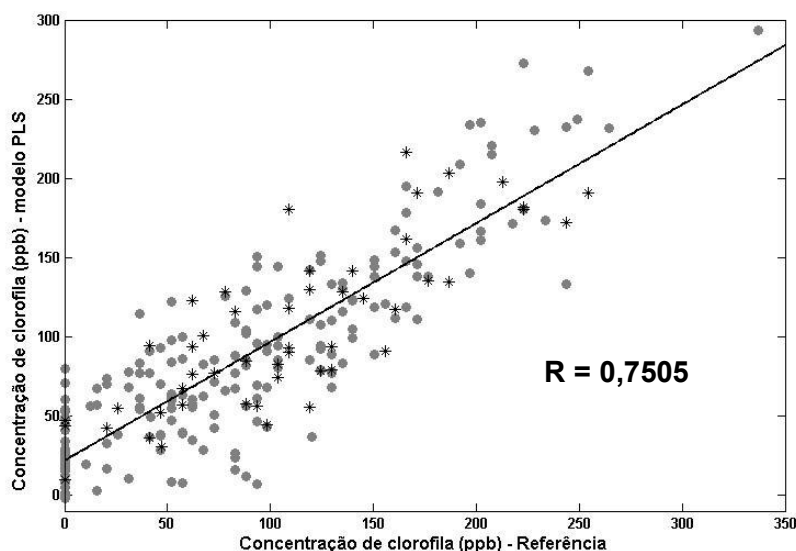
Figuras de mérito		Modelo PLS
Exatidão	RMSEC ^a	37,44
	RMSEP ^a	36,96
Coeficiente de correlação		0,7505
RPD _{val}		1,72
Linearidade		JBSTAT = 1,7272 CRITICAL = 4,9697
Sensibilidade analítica ^{-1 a}		3,18
Limite de detecção ^a		10,48
Limite de quantificação ^a		31,77

a = ppb

O ajuste do modelo construído foi avaliado com base no gráfico da concentração de clorofila estimada pelo modelo PLS contra os valores obtidos através de metodologia de referência (AOCS, 2009). O coeficiente de correlação foi 0,7505. Apesar do resultados para o coeficiente de correlação estarem abaixo de 0,9 resultados da ordem de 0,7 já foram reportados antes na literatura quando o método de referência, para a calibração multivariada, são métodos laboriosos, que apresentam muitas etapas (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2007; VALDERRAMA,

BRAGA, POPPI, 2007b; FERREIRA, PALLONI, POPPI, 2013; SANTOS et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Figura 3. Ajuste do modelo PLS



(●) amostras de calibração e (*) amostras de validação.

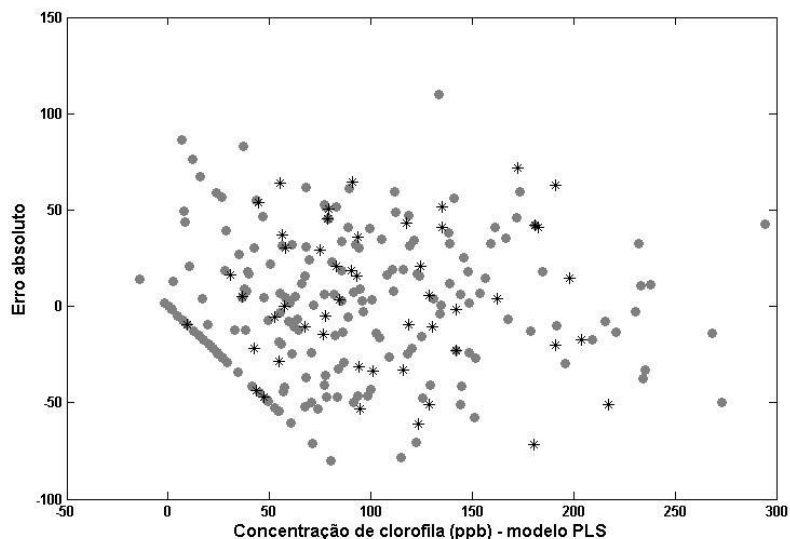
A relação de desempenho do desvio (RPD) é a razão entre a variação natural das amostras e a probabilidade dos erros que ocorrem durante a previsão. Este parâmetro de mérito é mais útil para comparar modelos em diferentes conjuntos de dados ou em termos de valores absolutos. De acordo com a literatura (BOTELHO, MENDES, SENA, 2013) modelos com valor para RDP entre 2,4 e 1,5 são considerados satisfatórios. Portanto, o resultado de RPD alcançado na metodologia proposta é condizente com os valores tidos como satisfatórios.

A linearidade do modelo foi avaliada através do gráfico dos resíduos da calibração e validação, mostrados na Figura 4. Através dos resíduos observa-se o comportamento aleatório indicando que os dados se ajustam ao modelo linear.

Para confirmar a distribuição aleatória dos resíduos, o teste estatístico Jarque-Bera foi empregado. Neste teste quando JBSTAT é menor do que o CRITIVAL a hipótese nula (resíduos são normalmente distribuídos com média e desvio padrão não específicos) pode ser aceita no nível de 95% de significância. Portanto, confirma-se

que os resíduos apresentados na Figura 4 apresentam comportamento aleatório, já que conforme Tabela 1 o resultado para JBSTAT é menor do que o valor para CRITIVAL.

Figura 4. Resíduos da calibração e validação



(●) amostras de calibração e (*) amostras de validação

A sensibilidade e sensibilidade analítica apresentaram resultados adequados na determinação da clorofila, considerando-se a faixa de concentração utilizada no trabalho, 0,10 – 337,14 ppb. O inverso da sensibilidade analítica permite estabelecer a menor diferença de concentração entre as amostras que pode ser distinguida pelo modelo PLS. Sendo assim, é possível fazer a distinção de amostras com diferença de concentração de clorofila da ordem de 3,18 ppb.

O modelo proposto consegue detectar concentrações de clorofila de 10,48 ppb e é capaz de quantificar com exatidão e precisão amostras com concentração de clorofila superiores a 31,77 ppb. Considerando o limite máximo de 100 ppb de clorofila que a indústria trabalha para o envase do óleo, a metodologia alternativa proposta nesse trabalho alcançou resultados satisfatórios para os parâmetros de mérito utilizados para validação do modelo.

5 CONCLUSÃO

De com os resultados obtidos há possibilidade de utilização de imagens digitais aliada à calibração multivariada por PLS na determinação da concentração de clorofila em amostras de óleo branqueado provenientes da indústria de óleo de soja. Os modelos apresentaram-se lineares, de acordo com o gráfico dos resíduos que mostrou uma distribuição aleatória dos erros.

O método proposto é uma alternativa ao método convencional para determinação da clorofila na indústria, apresentando como vantagens, maior rapidez nas determinações e eliminação de resíduos tóxicos, colaborando com os princípios da química verde.

REFERÊNCIAS

Annual Book of ASTM Standards. Standards practices for infrared multivariate quantitative analysis. E1655-05. ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2005.

AOCS. 2009. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6th ed., edited by D. Firestone, AOCS Press, Champaign.

BEEBE, Kenneth R.; KOWALSKI, Bruce R. An introduction to multivariate calibration and analysis. **Analytical Chemistry**, v.59(17), p.A1007-A1017, 1987.

BELTRAME, Karla K. et al. Determinação de Carbono Orgânico do Solo Usando NIRS: Avaliação de Oxidação de Dicromato e Análise de Combustão Seca como Métodos de Referência em Calibração Multivariada. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**, v.27, n.9, p.1527-1528, 2016.

BORRMANN, Daniela. **Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores**. 2009. 125f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Programa de pós-graduação em ciência dos alimentos, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

BOTELHO, Bruno G.; MENDES, Bruna A. P.; SENA, Marcelo M. Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. **Química Nova**, vol.36, n.9, p.1416-1422, 2013.

CAMPOSTRINI, Eliemar. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. 2001. (Apostila 31 páginas). Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf

DORSA, Renato. **Tecnologia de processamento de óleos e gorduras vegetais e derivados**. 3ª ed. São Paulo: GEA, p.274, 2000.

FERREIRA, Daniela S.; PALLONE, Juliana A.L.; POPPI, Ronei J. Aplicação da espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIRS) para estimar a composição da soja brasileira [Glycine max (L.) Merrill]. **Food Research International**, v.51, n.1, p.53-58, 2013.

HENDRY, Graham A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, Graham A.F.; GRIME John P. **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, p.148-152, 1993.

STEIDLE NETO, Antônio J. et al. Vis / NIR e quimiometria para estimativa não destrutiva de água e estado de clorofila em folhas de girassol. **Biosystems Engineering**, v. 155, p.124-133, 2017.

KENNARD, Robert W.; STONE, L. A. Computer aided desing of experiments. **Technometrics**, v.11(1), p.137-148, 1969.

LI, Yaoxiang; ZHANG, Yazhao; JIANG, Lichun. Modelando o Teor de Clorofila das Agulhas de Pinheiro Coreano com NIR e SVM. **Procedia Environmental Sciences**, v.10, parte A, p.222-227.

MAGALHÃES, Keurison F. **Investigação dos fluoróforos presentes no biodiesel produzido a partir de diferentes óleos vegetais**. 2012. 67f. Dissertação de Mestrado – Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2012.

OTTO, Matthias; **Chemometrics**: Weinheim: Wiley, 1999.

PAVIA, Donald L; et al. **Introduction to spectroscopy**. Third edition, Brooks/Cole – Thomson Learning, US, 2001.

PROENÇA, Luís A. **Separação de pigmentos fotossintéticos do foplcton por meio de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE)**. Notas técnicas da FACIMAR, 1:23-31, 1997.

PUTRA, Bayu T. W.; SONI, Peeyush. Conjunto de dados de estimativa de conteúdo de clorofila de Coffea Canephora usando a câmera Red e Near-Infrared consumer. **Data in Brief**, v.21, p.736-741, 2018.

RIBEIRO JUNIOR. Elson Heraldo; PENTEADO, Rosangela de Fatima Stankowitz. **Modelo para formatação de trabalhos acadêmicos da UTFPR**. Ponta Grossa, 2011.

SANTOS, Dayane A. D. et al. Determinação de Vitamina C por Espectroscopia Ultravioleta e Calibração de Multiprodutos. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**, v.27, n.10, p.1912-1917, 2016.

SANTOS, Dayane A. D. et al. Espectroscopia UV e calibração multivariada multiproduto na determinação da acidez total em néctar de frutas. **Revista Brasileira de Pesquisa de Alimentos**, v.6, n.1, p.1-8, 2015.

SANTOS, Dayane A. D. et al. Multiproduto, Multicomponente e Calibração Multivariada: um Estudo de Caso Usando Espectroscopia Vis-NIR. **Food Analytical Methods**, v.11, p.1915-1919, 2018.

SONOBE, Rei; SANO, Tomohito; HORIE, Hideki. Usando a refletância espectral para estimar o teor de clorofila foliar do chá com tratamentos de sombreamento. **Biosystems Engineering**, v.175, p.168-182, 2017.

STREIT, Nivia M.; et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

VALDERRAMA, Leonardo; VALDERRAMA, Patrícia. Identificação não destrutiva de tintas de caneta azul para fins de documentos usando o iPhone e análise de imagens digitais, incluindo uma abordagem para estimativa de intervalo de confiança na validação de modelos PLS-DA. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, vol. 156, p.188-195, 2016.

VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez W.B.; POPPI, Ronei J. Validação de modelos de calibração multivariada na determinação de parâmetros de qualidade de cana-de-açúcar por espectroscopia no infravermelho próximo. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**, v.18, n.2, p.259-266, 2007.

VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez W.B.; POPPI, Ronei J. Seleção variável, detecção de outliers e valores de estimativa de mérito em um modelo de calibração multivariada de regressão de mínimos quadrados parciais. Um estudo de caso para a determinação de parâmetros de qualidade na indústria do álcool por espectroscopia de infravermelho próximo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8331-8338, 2007b.

VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez W. B.; POPPI, Ronei J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v.32(5), p.1278-1287, 2009.

VANDEGINSTE, Bernard G.M. et al. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1998.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

YANG, Zhiming; REITER, Michael; MUNYEI, Nicolas. Estimativas das concentrações de clorofila a em diversos corpos de água usando índices NIR / Red baseados em razão. **Applications of Remote Sensing: Society and Environment**, v.6, p.52-58, 2017.

ZHANG, Junyi et al. Detecção de conteúdo de clorofila de milho em campo usando a câmera RGB-NIR. **IFAC-PapersOnLine**, v.51, Ed.17, p.700-705, 2018.