



LORENA DE OLIVEIRA MOURA

**ESTIMATIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES CULTIVADAS EM
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM BASE NA
ESPECTROMETRIA**

**SETE LAGOAS/MG
2016**



LORENA DE OLIVEIRA MOURA

**ESTIMATIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES CULTIVADAS EM
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM BASE NA
ESPECTROMETRIA**

**SETE LAGOAS/MG
2016**

LORENA DE OLIVEIRA MOURA

**ESTIMATIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES CULTIVADAS EM
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM BASE NA
ESPECTROMETRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias na área de concentração em Produção Vegetal

Orientadora:

Profa. Dra. Daniela de Carvalho Lopes

Coorientador:

Prof. Dr. Antonio José Steidle Neto

**SETE LAGOAS/MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Divisão de Biblioteca da UFSJ, MG, Brasil.

M929e Moura, Lorena de Oliveira, 1991 -
2016 Estimativa de pigmentos em alfaces cultivadas em diferentes sistemas
de produção com base na espectrometria. - 2016.
106 f.: 16 il.

Orientadora: Daniela de Carvalho Lopes.
Coorientador: Antonio José Steidle Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São João Del-Rei,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

1. Alface - Análise de componentes - Teses. 2. Alface - Espectometria -
Teses. 3. Alface - Pigmentos - Teses I. Lopes, Daniela de Carvalho. II.
Steidle Neto, Antonio José. III. Universidade Federal de São João Del-Rei.
Graduação em Engenharia Agrônoma. V. Título.

LORENA DE OLIVEIRA MOURA

**ESTIMATIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES CULTIVADAS EM
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM BASE NA
ESPECTROMETRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientadora:

Profa. Dra. Daniela de Carvalho Lopes

Coorientador:

Prof. Dr. Antonio José Steidle Neto

Sete Lagoas, 22 de fevereiro de 2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos de Barros Monteiro - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Thomaz Corrêa e Castro da Costa – Embrapa Milho e Sorgo

Prof^ª. Dra. Daniela de Carvalho Lopes - UFSJ
Orientadora

EPÍGRAFE

"Deus tem consciência do teu limite.
Ele só quer o que tu podes, porém se quiseres superar-te...
Ele te dará mais força."

Walter Grandó

DEDICATÓRIA

A Deus.

Aos meus pais, Alverina e José.

Às minhas irmãs, Grazielle e Natane.

À minha sobrinha e afilhada, Marina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e maravilhas que realiza em minha vida. E por me fortalecer diante dos obstáculos.

À minha mãe, Alverina Maria de Oliveira, que sempre faz o impossível para que eu vá além dos meus próprios objetivos.

A meu pai, José Mauro de Moura, minhas irmãs, Grazielle de Oliveira Moura e Natane C. de Oliveira Moura, e à minha afilhada, Marina, pelo amor e apoio em todos os momentos e por entenderem a minha ausência.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Daniela de Carvalho Lopes, e ao coorientador, Prof. Dr. Antonio José Steidle Neto, pela orientação impecável, confiança para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e auxílio que foram essenciais.

À Universidade Federal de São João Del-Rei, pela oportunidade de cursar o mestrado e pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade e ao corpo docente pelos valiosos ensinamentos.

Ao Grupo Guayí de Agroecologia e CNPq, pela parceria e investimentos no projeto de pesquisa.

À Profa. Lanamar de Almeida Carlos, Luma Moreira Martins e a toda equipe do Laboratório de Conservação de Alimentos, pela estrutura e apoio oferecidos para o desenvolvimento do trabalho.

À banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste momento e pelas contribuições para melhoria do trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado, por tornarem a caminhada mais agradável.

A todos os meus familiares e amigos, pelo apoio e momentos de descontração. Especialmente a Karla Jorge da Silva, pelo incentivo constante mesmo estando distante.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cultura da alface.....	3
2.2 Sistemas de cultivo.....	4
2.2.1 Sistema de cultivo orgânico	4
2.2.2 Sistema de cultivo SAT.....	5
2.2.3 Sistema de cultivo hidropônico	6
2.3 Métodos laboratoriais de análise de tecidos vegetais.....	7
2.4 Reflectância espectral da vegetação	8
2.5 Utilização de índices para avaliação de dados espectrais.....	11
2.6 Quimiometria para avaliação de dados espectrais.....	12
2.7 Referências Bibliográficas	18
3. CLASSIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DE ALFACES COM BASE NA REFLECTÂNCIA ESPECTRAL	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
3.1 Introdução.....	26
3.2 Material e Métodos.....	28
3.2.1 Aquisição de dados.....	28
3.2.2 Processamento e análise de dados	31
3.3 Resultados e Discussão	33
3.4 Conclusão	41
3.7 Referências Bibliográficas	42

4. DETERMINAÇÃO NÃO-DESTRUTIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES UTILIZANDO ESPECTROMETRIA E ANÁLISE MULTIVARIADA	45
RESUMO	45
ABSTRACT	45
4.1 Introdução.....	46
4.2 Material e Métodos.....	48
4.2.1 Cultivo de alfaces	48
4.2.2 Medidas de reflectância espectral	49
4.2.3 Medidas de pigmentos por métodos convencionais.....	51
4.2.4 Análise de dados por regressão por mínimos quadrados parciais.....	53
4.3 Resultados e Discussão	56
4.4 Conclusões.....	64
4.6 Referências Bibliográficas	65
5. ESTIMATIVA DE CLOROFILA, CAROTENOIDES E ANTOCIANINAS EM ALFACES CULTIVADAS EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO POR MEIO DE ÍNDICES ESPECTRAIS.....	69
RESUMO	69
ABSTRACT	69
5.1 Introdução.....	70
5.2 Material e Métodos.....	72
5.2.1 Cultivo de alfaces	72
5.2.2 Medidas de reflectância espectral	74
5.2.3 Medidas de pigmentos por métodos convencionais.....	75
5.2.4 Índices espectrais e modelos matemáticos	77
5.3 Resultados e Discussão	79
5.4 Conclusões.....	87
5.5 Referências bibliográficas	88
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93

ESTIMATIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES CULTIVADAS EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM BASE NA ESPECTROMETRIA

RESUMO - A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no Brasil e a sua produção tem sido realizada sob diferentes sistemas de cultivo. A determinação de componentes e a análise de qualidade dos vegetais têm sido, comumente, realizada em laboratórios por meio de métodos analíticos convencionais, que envolvem uma preparação destrutiva das amostras. Por outro lado, a espectrometria tem sido muito estudada para esta mesma finalidade, sem a necessidade de preparação e destruição das amostras. Assim, este trabalho foi desenvolvido como objetivo de obter assinaturas espectrais de três cultivares de alface e avaliar o potencial da espectrometria em classificar as cultivares verdes e roxas e detectar pigmentos (clorofila, carotenoides e antocianinas) em alface, funcionando como um método alternativo às análises convencionais. O experimento foi conduzido em três propriedades rurais, uma com produção orgânica, uma sob o sistema SAT e outra sob o sistema hidropônico, no município de Capim Branco - MG, durante a safra de 2014. O delineamento experimental utilizado em todos os sistemas de cultivo foi o de blocos casualizados, em que foram plantadas três cultivares (Cristal, Regina 2000 e Mimosa), com três repetições. As amostras de alface coletadas foram analisadas quanto ao teor de clorofila, carotenoides e antocianinas, através da espectrometria e dos métodos laboratoriais convencionais. A classificação das cultivares foi realizada por meio de análise de regressão polinomial e de análise de componentes principais (PCA), em que ambas as técnicas se mostraram eficientes em distinguir cultivares de alface de diferentes cores (verde e roxa). O teor dos pigmentos foi determinado com base em modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR), apresentando coeficientes de determinação de 0,80, 0,76 e 0,88 para predição de clorofila, carotenoides e antocianinas, respectivamente; e também com base em índices espectrais, em que os modelos apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,61 na validação externa e baixos valores dos erros REQM e EME. O uso da espectrometria se confirmou como uma maneira rápida, não destrutiva e eficiente para classificar cultivares de alface de diferentes colorações e para determinar o teor de pigmentos nestas cultivares, apresentando-se como uma alternativa aos métodos convencionais.

Palavras-chave: análise de componentes principais; espectrometria; índices espectrais; *Lactuca sativa* L.; pigmentos; regressão por mínimos quadrados parciais

ESTIMATE OF PIGMENTS IN LETTUCES CULTIVATED IN DIFFERENT FARMING SYSTEMS BASED ON SPECTROMETRY

ABSTRACT - Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the vegetables most produced and consumed in Brazil. Its production has been performed under different farming systems. The plant component determination and quality analysis has been commonly carried out in laboratories by standard analytical methods, which involve a destructive sample preparation. Furthermore, mass spectrometry has been studied for the same purpose without the need for preparation and destruction of samples. The present study was developed to evaluate the potential of spectroscopy for classifying green and red lettuces and detecting pigments (chlorophyll, carotenoids and anthocyanins) in lettuces, functioning as an alternative method to conventional analysis. The experiment was conducted on three farms with organic production, alternative farming system and hydroponic system, located at Capim Branco city - MG. The experimental design used in all cropping systems was the randomized block, in which were planted three cultivars (Crystal, Regina 2000 and Mimosa), with three replications. The lettuce samples were analyzed for chlorophyll, carotenoid and anthocyanins contents, by spectrometry and conventional laboratory methods. The lettuce classification was performed by polynomial non-linear regression analysis and principal component analysis (PCA), where both techniques were effective in distinguishing lettuce cultivars of different colors (green and purple). The pigment content was estimated based on partial least squares regression models (PLSR), with determination coefficients of 0.80, 0.76 and 0.88 for the prediction of chlorophyll, carotenoid, and anthocyanin, respectively. Spectral indices were also evaluated, with the models resulting in correlation coefficients above 0.61 in external validation, as well as low values of RMSE and EME errors. The use of spectrometry was confirmed as fast, non-destructive and efficient for classifying lettuce cultivars of different colors and for determining pigment contents in these cultivars, acting as an alternative to conventional methods.

Keywords: principal component analysis; spectrometry; spectral indices; *Lactuca sativa* L.; pigments; partial least squares regression

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no Brasil. Possui uma grande quantidade de água nos seus tecidos, reduzido teor de lipídeos e baixo conteúdo energético, além de ser uma importante fonte de vitaminas A, B1, B2 e C, e sais minerais como ferro e cálcio. As cultivares existentes possuem diversos formatos de cabeça, de folhas e várias cores. O seu cultivo pode ser realizado de forma convencional, hidropônica, sem agrotóxicos (SAT) e orgânica.

A maior parte dos estudos conduzidos visando à análise química e nutricional de alimentos utiliza métodos convencionais realizados em laboratório. Estes métodos exigem diversos cuidados na preparação das amostras e manuseio dos reagentes e das vidrarias, para que a análise seja eficiente, gere resultados consistentes e não ofereça riscos ao laboratorista. Além disso, estas análises destroem as amostras estudadas e seus resultados não são imediatos (Cecchi, 2003; IAL, 2008).

De forma alternativa aos métodos convencionais de análise de alimentos, existem técnicas mais sofisticadas, como a espectrometria, que é uma técnica capaz de detectar a quantidade de energia eletromagnética que é emitida por um objeto ou superfície sem tocá-lo, ou seja, de forma não intrusiva ou destrutiva (Elmasry & Sun, 2010). Este método dispensa todo o processo de preparação de amostras e manipulação de reagentes que, além de ser demorado, aumenta a possibilidade de ocorrência de erros, gerando quantificações equivocadas dos componentes vegetais.

A espectrometria pode ser um meio alternativo rápido e fácil de avaliação da composição vegetal, determinando a quantidade de pigmentos, como carotenoides, clorofilas e antocianinas (Filella & Peñuelas, 1994; Sims & Gamon, 2002); o estado nutricional (Canavesi & Kirchner, 2005; Vigneau et al., 2011); a fenologia; o estresse geral e a eficiência fotossintética, sem que seja necessário a destruição do objeto analisado.

Um dos componentes vegetais mais importantes são os pigmentos, que são compostos orgânicos capazes de absorver a radiação eletromagnética na faixa de 400 a 700 nm. Eles estão localizados no interior dos cloroplastos e os principais grupos de pigmentos encontrados em plantas são as clorofilas (como as clorofilas a e b), os carotenoides (como o β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina) e os flavonoides (como as flavonas, flavonóis, isoflavonas e antocianinas).

Nas plantas, os pigmentos estão envolvidos em processos fotossintéticos, defesas contra o estresse luminoso evitando a formação de espécies reativas de oxigênio, entre outros (Taiz & Zeiger, 2004; Vieira et al., 2010). Além de possuírem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e reduzir o risco de doenças cardíacas (Peterson & Dwyer, 1998; Hollman & Katan, 1999).

Uma das vantagens obtidas com a modernização dos instrumentos de análise é o número de dados que podem ser extraídos em uma única amostra, como no caso da espectrometria, que detecta o comportamento espectral da amostra em vários comprimentos de onda. Para analisar este conjunto de dados, é necessário o uso de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair as informações relevantes. Nestes casos, a análise de dados pode ser do tipo univariada ou multivariada.

Em um modelo univariado, a análise das intensidades dos picos de absorção, por exemplo, é feita em apenas uma banda, desprezando a maior parte da informação espectral. Existe ainda a possibilidade de se utilizar índices espectrais que são obtidos a partir de diferenças, razões ou outras relações matemáticas entre comprimentos de onda específicos. Neste caso, os resultados obtidos com os índices espectrais são correlacionados à característica do alimento ou planta por meio de regressões lineares ou não lineares.

Em contrapartida, um modelo baseado na técnica multivariada permite utilizar toda a informação espectral disponível, tornando a previsão mais exata, já que variações podem ocorrer, não somente no pico, mas também em larguras de banda, por exemplo (Cunha Jr. et al., 2003).

É importante considerar o uso destas tecnologias no processo produtivo de hortaliças, como a alface, com o intuito de otimizar a produção e garantir a qualidade do produto final. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial da espectrometria em classificar cultivares de alface com colorações verde e roxa, além de detectar pigmentos nestas cultivares, funcionando como um método alternativo às análises convencionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.), pertencente à família *Asteracea*, é nativa da região sul da Europa e na Ásia Ocidental e o seu cultivo é datado de aproximadamente 2.500 a.C. Já nessa época, os antigos gregos e romanos utilizavam a alface como alimento e, devido às suas propriedades terapêuticas, como medicamento (Filgueira, 2007).

É uma planta herbácea de ciclo anual, com caule pequeno, não ramificado, ao qual se prendem as folhas em forma de roseta, podendo ou não formar “cabeça”. As cultivares existentes apresentam diversos formatos de cabeça, de folhas (lisa, crespa, mimosa, romana e americana) e de cores (verde e roxa). Apesar de ser uma planta adaptada ao clima ameno, a alface pode ser plantada durante o ano todo, principalmente devido ao desenvolvimento de cultivares adaptadas para diferentes condições ambientais. A ocorrência de altas temperaturas durante o seu cultivo pode acelerar o ciclo da cultura, gerando problemas de pendoamento precoce, além de intensificar as chances de ocorrência de doenças, como as podridões (Henz & Suinaga, 2009).

A alface prefere solos argilo-arenosos, ricos em matéria orgânica e os cultivos devem ser irrigados regularmente. A germinação das sementes ocorre com quatro a seis dias e a colheita começa em aproximadamente 60 dias após a semeadura, dependendo da cultivar utilizada. Na fase reprodutiva, a planta emite uma haste com flores amarelas agrupadas em cacho, e produz em maior quantidade uma substância leitosa e amarga chamada lactoaria (Filgueira, 2007).

O seu cultivo pode ser realizado por meio dos sistemas convencional, hidropônico, SAT e orgânico, aos quais, de acordo com Miyazama et al.(2001), influenciam nos parâmetros de qualidade das alfaces produzidas. Por ser uma hortaliça de alta perecibilidade e possuir baixa resistência ao transporte, geralmente é cultivada próximo aos grandes centros urbanos, nos chamados “cinturões verdes” (Vidigal et al., 1995).

Em 2013, a produção mundial de alface foi de 24.896.115,89 toneladas, em que 67,2%, 18%, 12,7%, 1,3% e 0,8% desta produção ocorreram na Ásia, Américas, Europa, África e Oceania, respectivamente (FAOSTAT, 2013). No Brasil, estima-se que o consumo médio diário de alface seja de 3,6 g por pessoa (IBGE, 2011), sendo cultivada anualmente em

uma área estimada de 35.000 hectares (Lopes et al., 2010). No ano de 2006, os dados do censo agropecuário apontaram uma produção nacional de alface em torno de 525.602 toneladas, com destaque para a região Sudeste, com produção aproximada de 350.376 toneladas. O Estado de São Paulo foi o maior produtor, apresentando uma produção de 164.774 toneladas, seguido pelo Rio de Janeiro com 143.370 toneladas e Minas Gerais com apenas 36.011 toneladas (IBGE, 2006).

2.2 Sistemas de cultivo

2.2.1 Sistema de cultivo orgânico

Desde o início do século XX, críticas vêm sendo direcionadas aos métodos utilizados na agricultura convencional, que se baseia na utilização de agroquímicos, tanto para aumentar a fertilidade dos solos, quanto para o controle de pragas, doenças e plantas invasoras nas áreas de cultivo. Além disso, este sistema utiliza um sistema de mecanização intensivo que permite aumentar as áreas de monoculturas, diminuir os custos de produção e a utilização de mão de obra; utiliza materiais geneticamente modificados na agricultura garantindo a uniformidade genética no campo; aumenta a resposta aos insumos químicos e diminui a biodiversidade do ambiente (Aquino & Assis, 2005). Porém, este modelo de agricultura não cumpriu com o seu objetivo social de melhorar a qualidade de vida da população rural, além de gerar inúmeros problemas ambientais, como a erosão e a perda da fertilidade dos solos; a perda da biodiversidade; a contaminação dos solos, da água, dos animais silvestres, do homem e dos alimentos (Altieri, 1987).

A partir da insatisfação com este sistema de produção, começou a surgir uma nova proposta com o intuito de integrar a produção de alimentos com a conservação dos sistemas ecológicos e o bem-estar social, sendo chamada de agricultura alternativa. Esse modelo de agricultura alternativa recebeu, ao longo do tempo, algumas denominações e variações de manejo, podendo ser chamada de agricultura orgânica, biodinâmica, biológica, ecológica, natural, sustentável, dentre outras (Aquino & Assis, 2005)

A agricultura orgânica tem ganhado cada vez mais adeptos no Brasil onde, no período de janeiro de 2014 e outubro de 2015, a quantidade de agricultores orgânicos cadastrados passou de 6.719 para 11.661, sendo a região Nordeste a detentora da maior parte destes produtores, seguido pela região Sul, Sudeste, Norte e Centro Oeste (MAPA, 2015).

É considerado sistema orgânico de produção, todo aquele em que se adotam tecnologias que otimizem o uso de recursos naturais e socioeconômicos, respeitando a integridade cultural, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energias não renováveis e a eliminação do emprego de agrotóxicos e outros insumos artificiais tóxicos, organismos geneticamente modificados (transgênicos) ou radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção (Brasil, 2003).

Este sistema visa ofertar produtos saudáveis isentos de contaminantes que possam colocar em risco a saúde do consumidor, do agricultor e do meio ambiente; preservar a diversidade biológica dos ecossistemas naturais e a recomposição ou incremento da diversidade biológica dos ecossistemas modificados em que se insere o sistema de produção; conservar as condições físicas, químicas e biológicas do solo, da água e do ar; reciclar os resíduos de origem orgânica, reduzindo ao mínimo o emprego de recursos não renováveis e; incentivar a integração entre os diferentes segmentos da cadeia produtiva e de consumo de produtos orgânicos, além da regionalização da produção e comércio desses produtos (Brasil, 2003).

Estudos comparando os alimentos cultivados em sistema orgânico com alimentos de sistemas convencionais apontam menor concentração de nitrato (Darolt, 2002), maior teor de vitamina C e atividade antioxidante (Jin et al., 2011) em alimentos orgânicos, mas poucas diferenças são encontradas quanto à composição nutricional (Williams, 2002).

2.2.2 Sistema de cultivo SAT

O sistema de cultivo sem agrotóxicos (SAT) ou organo-mineral é fundamentado na não utilização de defensivos agrícolas em qualquer fase de produção, permitindo apenas o uso de fertilizantes sintéticos (Caixeta & Pedini, 2002).

No Estado de Minas Gerais, os produtores que utilizam este sistema devem ser registrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) para obterem a certificação, desta forma podem comercializar seus produtos com um “selo de qualidade” específico para produtos sem agrotóxicos. De acordo com o IMA (2015), em setembro de 2015 existiam 23 produtores cadastrados em Minas Gerais.

No sistema SAT, o controle de pragas, doenças e plantas invasoras deve ser realizado principalmente por meio de métodos preventivos, como práticas culturais adequadas,

processos mecânicos e biológicos e utilização racional dos recursos naturais. Caso seja necessário, o agricultor poderá utilizar alguns produtos em caráter exclusivamente emergencial, mediante prévia e expressa autorização do IMA. Nestes casos, o controle de doenças pode ser feito através da utilização de caldas e extratos à base de produtos vegetais (como piretro, rotenona, sabadilha, quássia, riânia, saboneteira e outros), enxofre simples, calda bordalesa e sulfocálcica, emulsões à base de óleo mineral, querosene, sabão, sulfato de zinco, permanganato de potássio e hipoclorito de sódio neutro (água sanitária) (IMA, 2009).

As pragas podem ser controladas através do uso de iscas convencionais (exceto aquelas à base de dodecacloro e os fosforosos) e feromônios em armadilhas, desde que sejam utilizadas corretamente e não poluam o ambiente (IMA, 2009). O controle das plantas daninhas pode ser feito através de práticas mecânicas como aração, gradeação, roçadas e capinas manuais quando necessário, além da utilização de cobertura inerte (plástico), solarização, material propagativo isento de sementes de invasoras, uso de plantas alelopáticas e coberturas mortas e/ou vivas (IMA, 2009).

2.2.3 Sistema de cultivo hidropônico

A palavra hidroponia vem do grego, dos radicais “hydro” que significa água e “ponos” que significa trabalho, portanto, é a técnica de cultivar plantas em meio aquoso, sem solo, as raízes recebem uma solução nutritiva balanceada que contém água potável e todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta. As plantas são colocadas em canais ou recipientes por onde circula esta solução nutritiva. Nestes canais, as raízes das plantas podem ficar imersas em um meio líquido (Técnica do Fluxo Laminar de Nutrientes - NFT) sem nenhum meio de sustentação, ou podem estar apoiadas em um substrato inerte, como pedras ou areia lavada (Cooper, 1975; Furlani et al., 1999).

As propriedades químicas da solução nutritiva, como o pH e a concentração de nutrientes, devem ser monitoradas periodicamente, para que um possível desbalanceamento desta solução não prejudique o desenvolvimento das plantas (Furlani et al., 1999).

O cultivo da alface em sistema hidropônico tem sido muito difundido pelo Brasil, devido ao rápido crescimento da planta, baixo custo de produção, maior demanda por produtos de alta qualidade e maior difusão de tecnologias envolvidas no processo produtivo (Cometti et al., 2008).

Além disso, o sistema hidropônico possui algumas vantagens em relação aos outros sistemas de cultivo, como proteger as plantas cultivadas contra os fatores ambientais adversos (chuvas, geadas e ventos fortes), mantendo a produtividade nestas condições (Silva et al., 2007); e manter uma elevada sanidade e produtividade da cultura, que podem ser explicadas pelas concentrações mais elevadas dos nutrientes e a direta disponibilização na rizosfera das plantas, o que favorece a rápida absorção (Caldevilla & Lozano, 1993).

Porém, as plantas de alface produzidas por meio deste sistema, podem apresentar até 7,2 vezes mais nitrato que as plantas produzidas no sistema orgânico (Cometti et al., 2004). O nitrato, quando reduzido a nitrito, pode se tornar tóxico aos seres vivos. No ambiente ácido do estômago, o nitrito pode reagir com certas aminas, provenientes de várias fontes, incluindo o próprio alimento, dando origem a nitrosaminas, que são compostos cancerígenos, teratogênicos e mutagênicos (Maynard et al., 1976).

2.3 Métodos laboratoriais de análise de tecidos vegetais

A análise dos vegetais tem a finalidade de avaliar a sua qualidade e quantificar os seus constituintes, como os nutrientes, vitaminas, pigmentos, quantidade de água e os ácidos orgânicos. Estas análises são, atualmente, realizadas por meio de métodos convencionais em laboratório.

Para que os resultados dos métodos convencionais sejam confiáveis, deve-se garantir a especificidade do teste, para que um composto não interfira na detecção do componente de interesse; a exatidão, para que a medida obtida seja o mais próximo do resultado real; a precisão, que é a variação entre os resultados obtidos em uma mesma amostra; e a sensibilidade do teste, que expressa a menor quantidade do componente que se consegue detectar, sem erro (Cecchi, 2003).

A utilização dos métodos convencionais necessita de muitos cuidados, com a finalidade de reduzir as chances de erros, que podem ser operacionais ou pessoais, que acontecem durante a leitura de medidas instrumentais, preparação das amostras, diluições, identificação imprópria das amostras ou falhas ao seguir os protocolos.

O conteúdo de pigmentos foliares mostra-se como uma importante ferramenta na avaliação da fisiologia vegetal, tanto para a caracterização do material ou para fins de comparação entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores ambientais. A maioria dos

métodos destrutivos utilizados para a determinação destes pigmentos utiliza solventes orgânicos, sendo os principais: a acetona, o éter de petróleo e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Santos et al., 2007). A manipulação destes solventes, durante a análise, deve ser feita levando-se em consideração vários cuidados de segurança para que não ofereça riscos.

A acetona é muito volátil e inflamável. Os seus vapores se misturam rapidamente com o ar e em contato com o trato respiratório pode causar irritação nasal e da garganta, além de vertigem, sonolência e dor de cabeça. A inalação em altas concentrações tem ação narcótica e pode causar depressão do sistema nervoso central, levando ao coma (Chemco, 2016).

O éter de petróleo é um solvente altamente inflamável. A inalação de seus gases pode causar irritação das vias respiratórias, tosse, dispneia, depressão do sistema nervoso central, alterar a função hepática e causar danos ao coração. Deve-se evitar a infiltração do produto em sistemas de esgotos e águas mananciais, uma vez que não é facilmente degradado, além de ser tóxico para os organismos aquáticos (Labsynth, 2009).

A inalação de gases do dimetilsulfóxido (DMSO) pode causar irritação das vias respiratórias, perturbações no sistema nervoso central, náusea, dor de cabeça e cansaço. O descarte não deve ser feito em sistemas de esgotos e águas mananciais, uma vez que o produto apresenta toxicidade para os organismos aquáticos, não é rapidamente degradado e apresenta potencial bioacumulativo (Multichemie, 2016).

2.4 Reflectância espectral da vegetação

A vegetação tem sido um elemento bastante pesquisado na área de Ciências Agrárias por meio de análises de reflectância (Vigneau et al., 2011; Silva et al., 2012). Por meio desta técnica, aspectos qualitativos de produtos agrícolas têm sido investigados, como defeitos em frutos (Li et al., 2011); estado nutricional das plantas (Chen et al., 2010; Gianquinto et al., 2011; Pacumbaba & Beyl, 2011); existência de doenças (Jones et al., 2010), além de outros. Ainda, a reflectância tem sido utilizada em trabalhos visando à classificação automática de produtos agrícolas de acordo com o estágio de maturação (Elmasry et al., 2007; Steidle Neto et al., 2009; Diezma et al., 2013).

De maneira geral, os vegetais têm, na região do espectro visível, dois picos de absorção. O primeiro, próximo a 0,43 μm e o outro, a 0,66 μm , decorrente da presença de

pigmentos do grupo da clorofila (Raven et al., 2010). Existe ainda uma banda de absorção distinta, devido à presença de carotenos, situada próximo a 0,5 μm .

Outra característica marcante do comportamento espectral da vegetação é a existência de uma região de alta reflectância, entre 0,7 μm a 1,3 μm , que está associada à estrutura celular interna da folha. Dois outros picos de absorção ocorrem nas regiões próximas a 1,4 μm e 1,9 μm devido à presença de água na folha (Peñuelas & Filella, 1998) (Figura 1).

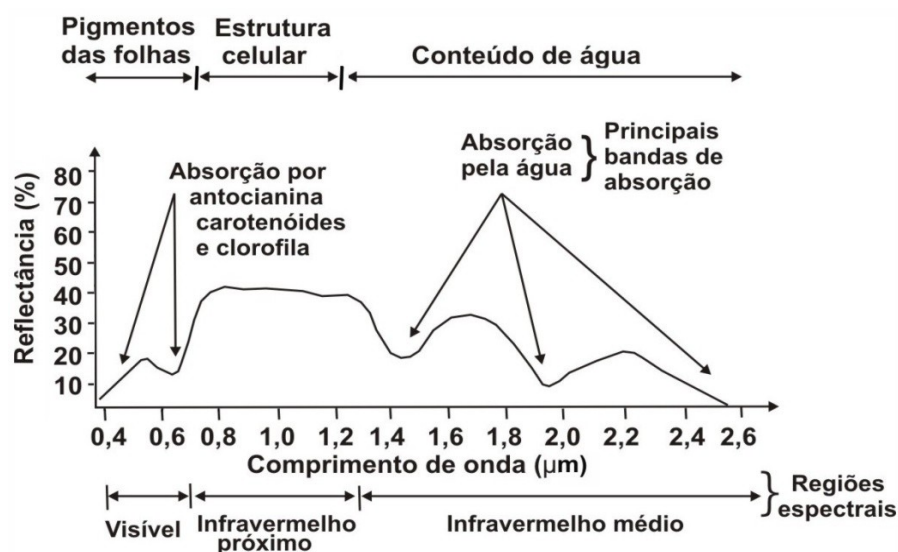


Figura 1. Padrão espectral do tecido vegetal (Fonte: Jensen, 2009)

A clorofila é o pigmento mais abundante no tecido vegetal, sendo especializado na absorção de luz, que ocorre nas regiões do azul (aproximadamente 0,43 μm) e do vermelho (aproximadamente 0,66 μm) do espectro. Na região da luz verde (aproximadamente 0,55 μm), a clorofila é pouco eficiente em absorver, sendo a maior parte refletida, dando às plantas a sua coloração verde característica (Taiz & Zeiger, 2004).

A clorofila pode ser do tipo “a”, “b”, “c” ou “d”, em que a presença e a quantidade variam de acordo com a espécie vegetal. A clorofila *a* (Chl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese e é responsável por absorver a radiação no primeiro estágio do processo fotossintético (etapa fotoquímica). Os demais pigmentos, como os outros tipos de clorofila (*b*, *c* e *d*), auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo chamados de pigmentos acessórios. A Clorofila *b* (Chl *b*) está presente nos vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; a clorofila *c* (Chl *c*),

em feófitas e diatomáceas; e a clorofila *d* (Chl *d*), em algas vermelhas (Taiz & Zeiger, 2004; Streit et al., 2005).

A combinação entre as Chl *a* e Chl *b* e os pigmentos acessórios permite maior captação da energia luminosa, conferindo às plantas maior eficiência fotossintética, crescimento, plasticidade e adaptabilidade (Engel & Poggiani, 1991).

Os carotenoides protegem a molécula de clorofila contra a foto-oxidação em condições de luz excessiva. Estes pigmentos refletem a radiação em comprimentos de onda do alaranjado ou do amarelo. A maioria dos carotenoides absorve luz no máximo em três comprimentos de onda, resultando em um espectro com três picos (Rodríguez-Amaya, 2001).

Os flavonoides constituem uma classe de compostos fenólicos produzidos pelo metabolismo secundário dos vegetais e um dos integrantes mais importantes são as antocianinas. As antocianinas refletem a radiação na região do vermelho, rosa, roxo e azul, por isso, essas cores são observadas em plantas com alto teor desse pigmento (Taiz & Zeiger, 2004). Alguns flavonoides possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e reduzem o risco de doenças cardíacas (Peterson & Dwyer, 1998; Hollman & Katan, 1999).

As antocianinas são pigmentos produzidos através do metabolismo secundário das plantas e a sua concentração pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a temperatura (Zhang et al., 1997), a radiação UV (Wellmann et al., 1976), a intensidade da luz (Zhong et al., 1991), o conteúdo de açúcar (Mori & Sakurai, 1994) e estresse osmótico (Do & Cormier, 1991).

A radiação eletromagnética pode ser quantificada por meio da técnica de espectrometria (Lorenzetti, 2002). Este tipo de sensoriamento remoto é muito utilizado em estudos que visam detectar a resposta de objetos à radiação incidente, sem tocar o objeto, ou seja, de forma não intrusiva ou destrutiva. Os sensores usados são sofisticados e medem a quantidade de energia eletromagnética que é refletida e/ou emitida por um objeto ou uma área geográfica à distância.

A espectrometria pode ser utilizada para obter desde informações básicas, em escalas maiores, como o conteúdo de pigmento em um tecido vegetal e qualidade nutricional de um solo (Clark, 1999), até a análise de extensas áreas geográficas, como para o acompanhamento de uso da terra e evolução da ocupação da área urbana (Alberti et al., 2004; Auch et al., 2004).

2.5 Utilização de índices para avaliação de dados espectrais

Diversas combinações entre bandas espectrais têm sido utilizadas para gerar índices como forma de ressaltar as características dos alvos a partir das imagens captadas por sensores (com alta absorção de energia na faixa do visível e alta reflectância na faixa do infravermelho próximo) (Ponzoni & Shimabukuro, 2007; Oliveira et al., 2009).

Os índices gerados a partir das imagens de satélite são utilizados como ferramentas importantes para o monitoramento das alterações naturais ou produzidas pelo homem na superfície terrestre (Jensen, 2009), pois ressaltam o comportamento espectral da vegetação, possibilitando distinguir diferentes tipos de cobertura e uso da terra (Moreira, 2005), áreas em processo de desertificação (Meneses & Netto, 2001), além de detectar em nível de dossel e de folha vegetal o conteúdo de água (Seelig et al., 2008) e de pigmentos (Peñuelas et al., 1995; Richardson et al., 2002), por exemplo. Porém, os índices espectrais podem também ser empregados a partir de medidas terrestres (Merzlyak et al., 2003; Zhang et al., 2012; Yi et al., 2014).

O índice de vegetação mais amplamente utilizado é o Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (“Normalized Difference Vegetation Index” - NDVI), obtido por meio de bandas espectrais na região do vermelho (R, de 630 - 690 nm) e do infravermelho próximo (NIR, de 760 - 900 nm) (Equação 1).

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R} \quad (1)$$

As informações nos comprimentos de onda utilizados para o cálculo dos índices podem variar de sensor para sensor, uma vez que a resolução espectral e espacial dos instrumentos é diferente, podendo interferir no resultado e interpretação de tais índices (Teillet et al., 1997).

Outro índice utilizado é o Índice de Razão Simples (“Simple Ratio Index” - SRI), que é um eficiente indicador do crescimento de uma cultura agrícola e da estimativa de biomassa, além de outras aplicações. Este índice é obtido dividindo-se valores de reflectância contidos em bandas do infravermelho próximo (NIR) por aqueles contidos na banda do vermelho (R) (Equação 2).

$$SRI = \frac{NIR}{R} \quad (2)$$

O Índice de Diferença Espectral (“Difference Spectral Index” - DSI) é obtido por uma simples diferença entre os valores de reflectância contidos em bandas na região do infravermelho próximo (NIR) por aqueles contidos em bandas na região do vermelho (R) (Equação 3).

$$DSI = NIR - R \quad (3)$$

O Índice de Vegetação Transformado (“Transformed Vegetation Index” - TVI) e o Índice de Vegetação Transformado Corrigido (“Corrected Transformed Vegetation Index” - CTVI) são variações do NDVI, não havendo nenhuma diferença técnica entre eles em termos de produção de imagem ou detecção de vegetação ativa (Rosendo, 2005). Também, outros índices podem ser propostos dependendo da aplicação a ser estudada e considerando-se outros comprimentos de onda.

Em medidas realizadas em nível terrestre e em laboratório, os índices espectrais podem ser empregados para estimar o conteúdo de componentes vegetais como a presença de pigmentos (Merzlyak et al., 2003; Yi et al., 2014), o conteúdo de água (Seelig et al., 2008), de nutrientes (Zhao et al., 2005; Li et al., 2014), sólidos solúveis totais (Stagakis et al., 2012), além de avaliar o estágio de maturação (Merzlyak et al., 1999; Jha et al., 2014), presença de doenças (Mahlein et al., 2013), dentre outros fatores.

A maior parte dos índices espectrais de vegetação utiliza as informações contidas nas reflectâncias de dosséis referentes às regiões do vermelho e do infravermelho próximo, que são combinadas sob a forma de razões. Essas regiões espectrais são mais utilizadas por conter mais de 90% da variação da resposta espectral da vegetação. Desta forma, estes índices realçam o comportamento espectral da vegetação, correlacionando-os com os parâmetros biofísicos da mesma (Rosendo, 2005).

2.6 Quimiometria para avaliação de dados espectrais

A quimiometria é um ramo da química que emprega métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para planejar e/ou selecionar experimentos de forma otimizada e fornecer o máximo de informações químicas com a análise dos dados obtidos (Kowalski, 1975).

A utilização da quimiometria com análise de dados multivariados contribui para o aumento da aplicação da espectrometria em vários campos da ciência, mas principalmente nas análises de alimentos (Nicolai et al., 2007; Cozzolino et al., 2009; 2011). Estas técnicas estatísticas sofisticadas podem desenvolver múltiplas análises simultâneas e quase instantaneamente de vários parâmetros, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados originais. Além de fornecer uma quantificação rápida e não destrutiva dos componentes principais em muitas substâncias orgânicas (McClure, 2003; Cozzolino et al., 2006; Nicolai et al., 2007).

As principais técnicas de quimiometria empregadas em estudos que envolvem a classificação e a análise química ou nutricional de produtos de origem vegetal são a análise de componentes principais (“Principal Component Analysis” - PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (“Partial Least Square Regression” - PLSR) (Martens & Naes, 1989; Brereton, 2000; Naes et al., 2004; Roggo et al., 2007; Cozzolino et al., 2009).

Geralmente, antes de iniciar a calibração do modelo de PCA e PLSR é aconselhável aplicar pré-tratamentos matemáticos aos dados experimentais originais, pois estes podem não ter uma distribuição adequada para a análise, podendo dificultar a extração de informações úteis e a interpretação dos mesmos (Martens & Naes, 1989; Naes et al., 2004). Dentre os pré-tratamentos matemáticos aplicados aos dados espectrais, podemos citar: normalização, correção de deformações (“detrending”), centralização, linearização (“smoothing”), primeira e segunda derivadas do espectro.

Na normalização dos dados, o espectro em cada faixa do comprimento de onda é dividido pelo desvio padrão do espectro nesta mesma faixa. Geralmente, as variações de todos os comprimentos de onda são normalizadas a 1 (um), o que resulta numa influência igual das variáveis no modelo (Nicolai et al., 2007).

Para a correção de deformações, cada espectro é ajustado a uma primeira ou segunda ordem polinomial e depois se subtrai esse espectro ajustado a partir do original para obter o espectro corrigido. Embora possam ser utilizados polinômios de ordem superior, existe um risco associado de remover a informação relevante (Barnes et al., 1989).

Na centralização dos dados em torno da média, cada elemento de uma coluna da matriz de dados é subtraído do valor médio da respectiva coluna. Esta operação assegura que todos os resultados serão interpretados em termos de variação em torno da média (Nicolai et al., 2007). Geralmente, é usada quando todas as variáveis forem medidas numa mesma unidade, em uma mesma magnitude, como acontece normalmente no caso da espectroscopia (Ribeiro, 2001).

A linearização é uma técnica para remover o ruído aleatório, melhorando o aspecto visual dos espectros através da aplicação de filtros de média móvel ou pelo algoritmo Savitzky-Golay, por exemplo (Naes et al., 2004).

Derivadas de primeira e de segunda ordem são utilizadas para reduzir o deslocamento espectral, melhorando a definição de picos que se encontram sobrepostos em uma mesma região e para correção de linha base (Rinnan et al., 2009).

Frequentemente, os trabalhos descrevem a utilização de duas ou mais técnicas de pré-tratamentos matemáticos aos dados espectrais (Azzouz et al., 2003).

Além do pré-tratamento dos dados, é necessário detectar e remover as amostras anômalas (“outliers”), para assegurar a formação de um conjunto homogêneo para a construção do modelo de regressão. Amostras estruturalmente diferentes das demais ou com valores experimentais atípicos podem ter uma influência inadequada no modelo e devem ser removidos do conjunto de treinamento antes da construção do modelo (Martins & Ferreira, 2013). Os “outliers” podem ocorrer devido a erros instrumentais, experimentais, presença de compostos químicos não pertencentes ao grupo que está sendo analisado ou de diferentes composições químicas, além de outras fontes (Rocha, 2009).

A PCA é uma técnica utilizada para analisar, classificar e reduzir a dimensionalidade dos conjuntos de dados numéricos em uma análise multivariada (Zhang & Wang, 2007), não tendo a necessidade de que o conjunto de dados seja conhecido antes da análise. Neste método, as variáveis originais são transformadas em novas variáveis, conhecidas como componentes principais (PCs), em que cada PC é uma combinação linear das variáveis originais e são responsáveis pela variabilidade contida nos dados originais (Kong et al., 2009; Ouyang et al., 2013).

Por meio da aplicação de PCA aos dados, as principais variações de dados serão retidas nos primeiros componentes principais, em que o primeiro componente principal (PC1) é responsável pela variância máxima das variáveis, o segundo (PC2) não está correlacionado

com o primeiro e é responsável pelo máximo da variância residual, e assim por diante até quantos PCs forem necessários para explicar totalmente a variância dos dados. Desta forma, os PCs são utilizados para indicar a classificação dos agrupamentos de dados, mostrando a relação entre as observações, em que amostras similares estarão localizadas próximas umas das outras. Assim, a saída gráfica pode ser utilizada para determinar a diferença entre os grupos formados com as amostras (Ge & Song, 2007; Ouyang et al., 2013). Para que esta análise seja executada, os dados espectrais e os conjuntos a serem discriminados deverão ser organizados no formato de matrizes.

A análise PLSR estabelece uma relação matemática (modelo de calibração) entre os valores químicos de referência, obtidos através de análises convencionais, e os dados espectrais da amostra, obtidos com um equipamento, como o espectrômetro (Morgano et al., 2007). O método PLSR é consideravelmente eficiente, pois a calibração pode ser realizada mesmo na presença de interferentes, como ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades nos dados (Ferreira et al., 1999).

Na análise por PLSR, o conjunto de dados é dividido em duas partes, um conjunto de calibração e outro para validação externa. O conjunto de calibração é utilizado para ajustar um modelo matemático que represente o resultado de interesse a partir dos dados espectrais (Cozzolino et al., 2006; Nicolai et al., 2007). Já o conjunto de validação externa, contém medidas de amostras conhecidas que são independentes das amostras usadas no conjunto treinamento (calibração), e é utilizado para avaliar o desempenho do modelo ajustado. Neste caso, as amostras de validação externa são tratadas como se seus valores não fossem conhecidos e utiliza-se a calibração construída com o conjunto treinamento para estimá-los. Então, os valores estimados são comparados com os valores teóricos (determinados pelo método de referência) para avaliar o desempenho da calibração em amostras realmente desconhecidas.

No PLSR, após o pré-tratamento e seleção dos dados, eles devem ser separados em variáveis independentes (X = comprimentos de onda) e variáveis dependentes (Y = variável a ser analisada, como concentração de algum analito). Estes dados deverão ser organizados no formato de matrizes, para que possam ser utilizados na análise multivariada PLSR (Mota, 2012).

Na matriz X ($n \times m$) de variáveis independentes, cada linha corresponde ao espectro obtido de cada amostra e cada coluna corresponde a um comprimento de onda específico. As

variáveis dependentes ficam organizadas em uma matriz Y, em que o total de elementos deste vetor é igual a n, isto é, o número de amostras, e corresponde às concentrações de um determinado analito de interesse, obtidos através de um método de referência convencionalmente utilizado (Ferreira et al., 1999). Desta forma, a PLSR irá capturar a variância dos dados da matriz independente X e da matriz dependente Y, através de suas decomposições sucessivas e simultâneas, correlacionando-as (Geladi & Kowalski, 1986; Brereton, 2003).

Os dados organizados nas matrizes serão utilizados na construção de um modelo apropriado para relacionar as respostas instrumentais com a informação desejada no conjunto de calibração. Para isto, é importante considerar o número de variáveis latentes ou de componentes principais, que irá reduzir a dimensão dos dados, mantendo apenas os mais significativos, ou seja, aqueles que carregam maior variância do conjunto de dados (Brereton, 2000; Neto, 2005).

A escolha do número de variáveis latentes permite descrever até mais de 90% da variância dos dados com um número muito menor de fatores do que das variáveis originais. O número de variáveis latentes utilizadas em um modelo não deve ser muito baixo, pois não irá considerar a informação total contida no conjunto de dados, resultando em um subajuste; e quanto maior o número de variáveis latentes, maior será o ruído e os erros de modelagem, resultando em um sobreajuste. Assim, o número ótimo de variáveis latentes corresponde ao ponto no qual a diminuição do erro (produzido pelo aumento da complexidade do modelo) é compensada pelo aumento de erro de superavaliação (Rocha, 2009). O número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo pode ser definido através dos valores da raiz do erro quadrático médio (REQM), calculado a partir da equação (4):

$$\text{REQM} = \sqrt{\sum (y_p - y_r)^2 / n} \quad (4)$$

em que:

n = número de amostras,

y_p = valores preditos, e

y_r = valores de referência observados para as amostras.

Esses erros podem ser calculados a partir da autopredição das amostras de calibração (Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio de Calibração - REQMC), da validação cruzada

das mesmas (Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada - REQMVC) e da predição de amostras externas (Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio de Previsão - REQMP).

O método mais utilizado para determinar o número de variáveis latentes e validar o modelo é através da validação cruzada (validação interna) no conjunto de calibração, que é baseado na avaliação da magnitude dos erros de previsão, feito pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas. Para isto, um número determinado de amostras é deixado de fora no processo de construção do modelo, o modelo finalizado é então utilizado para prever a concentração da amostra que foi retirada inicialmente e calcula-se o erro desta previsão (Ferreira et al., 1999; Morgano et al., 2007).

Para avaliar os resultados da validação externa, os índices estatísticos mais empregados são o Erro Médio de Estimativa (EME) (Equação 5) e o coeficiente de determinação (R^2) referente aos dados observados em relação aos preditos (Equação 6). O EME representa o erro sistemático entre os valores preditos e os valores medidos, sendo que os valores próximos a zero indicam modelos mais exatos (Matsimbe et al., 2015). A presença deste erro pode ser associada a erros na preparação da amostra, na análise da amostra ou em não linearidades entre o sinal instrumental e a propriedade de interesse. Valores negativos do EME indicam subestimativa, enquanto valores positivos indicam superestimativa dos valores observados. E o R^2 representa a proporção da variação total dos valores observados que pode ser explicada pelo modelo de estimativa proposto, podendo variar de 0 (zero) a 1 (um), sendo que, quanto mais próximos de 1 (um), melhor o ajuste do modelo.

$$\text{EME} = \sum (y_p - y_r) / n \quad (5)$$

$$R^2 = \frac{[\sum (y_p - \bar{y}_p)(y_r - \bar{y}_r)]^2}{\sum (y_p - \bar{y}_p)^2 \sum (y_r - \bar{y}_r)^2} \quad (6)$$

em que:

y_r = valor de referência obtido pelo método convencional,

y_p = valor estimado pelo modelo,

n = número de amostras,

\bar{y}_r = média dos valores de referência obtidos pelo método convencional, e

\bar{y}_p = média dos valores estimados pelo modelo.

A espectrometria e o método de calibração multivariada (PLSR) são técnicas eficientes para a determinação de analitos em amostras (Lorente et al., 2012; Mariani et al., 2014; Chen et al., 2015). Quando comparado com os métodos convencionais de análise, o método PLSR tem o tempo de análise reduzido, pouca manipulação das amostras, diminuição de resíduos químicos e redução do custo de análise (Morgano et al., 2007).

2.7 Referências Bibliográficas

- ALBERTI, M.; WEEKS, R.; COE, S. Urban land-cover change analysis in Central Puget Sound. **Photogrammetric Engineering & Remote Sensing**, v. 70, n. 9, p. 1043–1052, 2004.
- ALTIERI, M.A. **Agroecology: the scientific basis of alternative agriculture**. Westview Press, 1987. 227p.
- AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Editores). **Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF. 2005. 517p.
- AUCH, R.; TAYLOR, J.; ACEVEDO, W. **Urban growth in American cities – Glimpses of U. S. Urbanization**. Washington: U.S. Geological Survey, 2004. 52p.
- AZZOUZ, T.; PUIGDOMÉNECH, A.; ARAGAY, M.; TAULER, R. Comparison between different data pre-treatment methods in the analysis of forage samples using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and partial least-squares multivariate calibration method. **Analytica Chimica Acta**, v. 484, p. 121–134, 2003.
- BARNES, R.J.; DHANOA, M.S.; LISTER, S.J. Standard normal variate transformation and detrending of near-infrared diffuse reflectance spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 43, p. 772–777, 1989.
- BRASIL, Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. **Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 27 out. 2015.
- BRERETON, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.
- BRERETON, R.G. **Chemometrics: Data Analysis for the laboratory and Chemical Plant**. John Wiley & Sons, USA, 2003. 504p.
- CAIXETA, I.F.; PEDINI, S. Cafeicultura orgânica: conceitos e princípios. **Café Orgânico: Informe Agropecuário**, v. 23, n. 214/215, p. 15-20, 2002.
- CALDEVILLA, E.M.; LOZANO, M.G. **Cultivos sin suelo: hortalizas en clima mediterráneo**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1993. 123p.
- CANAVESI, V.; KIRCHNER, F.F. Quantificação de macronutrientes em floresta ombrófila mista montana utilizando dados de campo e dados obtidos a partir de imagens do satélite IKONOS II. **Floresta**, v. 35, n. 3, p. 451-464, 2005.
- CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. rev. Editora da Unicamp: Campinas, SP, 2003. 208p.
- CHEMCO, Indústria e Comércio Ltda. **Acetona para análise (p.a.)/pura - Ficha de informações de segurança de produto químico**. 6 p. 2016.

- CHEN, P.; HABOUDANE, D.; TREMBLAY, N.; WANG, J.; VIGNEAULT, P.; LI, B. New spectral indicator assessing the efficiency of crop nitrogen treatment in corn and wheat. **Remote Sensing of Environment**, v. 114, p. 1987–1997, 2010.
- CHEN, S.; ZHANG, F.; NING, J.; LIU, X.; ZHANG, Z.; YANG, S. Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. **Food Chemistry**, v. 172, p. 788–793, 2015.
- CLARK, K.C. **Spectroscopy of rocks and minerals, and principles of spectroscopy**. Denver: U.S. Geological Survey, 1999. 58p.
- COMETTI, N.N.; MATIAS, G.C.S.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNANDES, M.S. Comportamento de nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 748-753, 2004.
- COMETTI, N.N.; MATIAS, G.C.S.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNANDES, M.S. Efeito da concentração da solução nutritiva no crescimento da alface em cultivo hidropônico-sistema NFT. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 252-257, 2008.
- COOPER, A.J. Crop production in recirculating nutrient solution. **Scientia Horticultural**. v. 3, p. 251-258, 1975.
- COZZOLINO, D.; CYNKAR, W.; JANIK, L.; DAMBERGS, R.G.; GISHEN, M. Analysis of grape and wine by near infrared spectroscopy - A review. **Journal Near Infrared Spectros**, v. 14, p. 279–289, 2006.
- COZZOLINO, D.; CYNKAR, W.U.; DAMBERGS, R.G.; SHAH, N.; SMITH, P. Multivariate methods in grape and wine analysis. **International Journal of Wine Research**, v. 1, p. 123–130, 2009.
- COZZOLINO, D.; CYNKAR, W.U.; SHAH, N.; SMITH, P. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. **Food Research International**, v. 44, p. 1888–1896, 2011.
- CUNHA JR., A.P.; CUNHA, V.P.P.; SILVEIRA JR., L.; MARTIN, A.A. Modelo de calibração da concentração de metilmetacrilato em solução aquosa utilizando espectroscopia de absorção no ultravioleta. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 850-854, 2003.
- DAROLT, M.R. **Agricultura orgânica: inventando o futuro**. Londrina: IAPAR, 2002. 250p.
- DIEZMA, B.; LLEÓ, L.; ROGER, J.M.; HERRERO-LANGREO, A.; LUNADEI, L.; RUIZ-ALTISENT, M. Examination of the quality of spinach leaves using hyperspectral imaging. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 8–17, 2013.
- DO, C.B.; CORMIER, F. Accumulation of peonidin-3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 49–54, 1991.
- ELMASRY, G., SUN, D. Chapter 1 – Principles of hyperspectral imaging technology. In: Sun, Da-Wen (Ed.). **Hyperspectral imaging for food quality analysis and control**. Academic Press, San Diego, 2010. 43p.
- ELMASRY, G.; WANG, N.; ELSAYED, A.; NGAD, M. Hyperspectral imaging for non destructive determination of some quality attributes for strawberry. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 98-107, 2007.
- ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations: **Statistics Division**. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 26 out. 2015.
- FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- FILELLA, I.; PEÑUELAS, J. The red edge position and shape as indicators of plant chlorophyll content, biomass and hydric status. **International Journal of Remote Sensing**, v. 15, p. 1459–1470, 1994.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Editora UFV: Viçosa, 2007. 421p.
- FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: Instituto Agrônômico, Boletim técnico 180, 1999. 52p.
- GE, Z.; SONG, Z. Process monitoring based on independent component analysis–principal component analysis (ICA–PCA) and similarity factors. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 2054-2063, 2007.
- GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.
- GIANQUINTO, G.; ORSINI, F.; FECONDINI, M.; MEZZETTI, M.; SAMBO, P.; BONA, S. A methodological approach for defining spectral indices for assessing tomato nitrogen status and yield. **European Journal of Agronomy**, v. 35, p. 135–143, 2011.
- HENZ, G.P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Comunicado Técnico 75, Embrapa: Brasília, DF, 2009. 7p.
- HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937–942, 1999.
- IAL, Instituto Adolfo Lutz. ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (Coordenadores). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, 2008. 1020p.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 150p.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. 777 p.
- IMA, Instituto Mineiro Agropecuário. **Regulamento técnico para a produção vegetal em sistema sem agrotóxicos – SAT para fins de certificação e outras providências**. Portaria nº 1.005, de 22 de Junho de 2009.
- IMA, Instituto Mineiro Agropecuário. **Produtores certificados em sistema sem agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1198-produtores-certificados-em-sistema-sem-agrotoxicos>. Acesso em: 28 out. 2015.
- JENSEN, J.R. Tradução: EPIPHANIO, J. C. N. et al. **Sensoriamento remoto do ambiente: uma perspectiva em recursos terrestres**. São José dos Campos, SP, 2009. 604p.
- JIN, P.; WANG, S.Y.; WANG, C.Y.; ZHENG, Y. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. **Food Chemistry**, v. 124, p. 262–270, 2011.
- JHA, S.N.; NARSAIAH, K.; JAISWAL, P.; BHARDWAJ, R.; GUPTA, M.; KUMAR, R.; SHARMA, R. Nondestructive prediction of maturity of mango using near infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 152-157, 2014.
- JONES, H.G.; VAUGHAN, R.A. **Remote sensing of vegetation: principles, techniques, and applications**. Oxford, UK, 2010. 384p.

- KONG, W.J.; ZHAO, Y.L.; XIAO, X.H.; JIN, C.; LI, Z.L. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma coptidis chinensis* based on UPLC–PAD combined with chemometrics methods. **Phytomedicine**, v. 16, p. 950–959, 2009.
- KOWALSKI, B.R. Chemometrics: views and propositions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 15, n. 4, p. 201–203, 1975.
- LABSYNTH. **Éter de petróleo - Ficha de informações de segurança de produto químico**. 4 p. 2009.
- LI, J.; RAO, X.; YING, Y. Detection of common defects on oranges using hyperspectral reflectance imaging. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 78, p. 38–48, 2011.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2010. 68p.
- LORENTE, D.; ALEIXOS, N.; GÓMEZ-SANCHIS, J.; CUBERO, S.; GARCÍA-NAVARRETE, O.L.; BLASCO, J. Recent advances and applications of hyperspectral imaging for fruit and vegetable quality assessment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1121-1142, 2012.
- LORENZZETTI, J.A. **Princípios Físicos de Sensoriamento Remoto: notas de aula**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2002.
- MAHLEIN, A.-K.; RUMPF, T.; WELKE, P.; DEHNE, H.-W.; PLÜMER, L.; STEINER, U.; OERKE, E.-C. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. **Remote Sensing of Environment**, v. 128, p. 21- 30, 2013.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadastro nacional de produtores orgânicos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/organicos>>. Acesso em: 27 out. 2015.
- MARIANI, N.C.T.; COSTA, R.C.; LIMA, K.M.G.; NARDINI, V.; CUNHA JÚNIOR, L.C.; TEIXEIRA, G.H.A. Predicting soluble solid content in intact jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg] fruit using near-infrared spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 159, p. 458–462, 2014.
- MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. J. Wiley & Sons Ltd.: Chichester, 1989. 438p.
- MARTINS, J.P.A.; FERREIRA, M.M.C. QSAR Modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 554-560, 2013.
- MATSIMBE, S.F.S.; MOTOIKE, S.Y.; PINTO, F.A.C.; LEITE, H.G.; MARCATTI, G.E. Prediction of oil content in the mesocarp of fruit from the macauba palm using spectrometry. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 1, p. 21-28, 2015.
- MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. **Advances in Agronomy**, v. 28, p. 71-118, 1976.
- McCLURE, W.F. 204 years of near infrared technology: 1800 - 2003. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 11, p. 487–518, 2003.
- MENESES, P.R.; NETTO, J.S.M. **Sensoriamento remoto: reflectância dos alvos naturais**. Brasília: UnB, Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 262p.
- MERZLYAK, M.N.; GITELSON, A.A.; CHIVKUNOVA, O.B.; RAKITIN, V.Y. Non-destructive optical detection of leaf senescence and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 135-141, 1999.
- MERZLYAK, M.N.; SOLOVCHENKO, A.E.; GITELSON, A.A. Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, p. 197-211, 2003.

- MIYAZAMA, M.; KHATOUNIAN, C.A.; ODENATH-PENHA, L.A. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia Hoje**. Ano II, n. 7, p. 23, 2001.
- MOREIRA, M.A. **Fundamentos do sensoriamento remoto e metodologias de aplicação**. 3. ed., Viçosa: UFV, 2005. 320p.
- MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 346-350, 2007.
- MORI, T.; SAKURAI, M. Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; effects of sugar and nitrogen. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 588–593, 1994.
- MOTA, M.D. **Determinação de trans-resveratrol em vinhos tintos por meio de calibração multivariada**. 2012. 99p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- MULTICHEMIE, Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. **Dimetilsulfóxido - Ficha de informações de segurança de produto químico**. 7p. 2016.
- NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. NIR publications: Chichester, UK. 2004. 420p.
- NETO, W.B. **Parâmetros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. 2005. 142p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- NICOLAI, B.M.; BEULLENS, K.; BOBELYN, E.; PEIRS, A.; SAEYS, W.; THERON, K.I.; LAMMERTYN, J. Non-destructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 99-118, 2007.
- OLIVEIRA, W.M.; CHAVES, I.B.; LIMA, E.R.V. Índices espectrais de vegetação de caatinga em um neossololítico do semiárido paraibano. **XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, p. 2103-2110, 2009.
- OUYANG, Q.; ZHAO, J.; CHEN, Q.; LIN, H. Classification of rice wine according to different marked ages using a novel artificial olfactory technique based on colorimetric sensor array. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1320-1324, 2013.
- PACUMBABA JR., R.O.; BEYL, C.A. Changes in hyperspectral reflectance signatures of lettuce leaves in response to macronutrient deficiencies. **Advances in Space Research**, v. 48, p. 32-42, 2011.
- PEÑUELAS, J.; BARET, F.; FILELLA, I. Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll *a* ratio from leaf spectral reflectance. **Photosynthetica**, v. 31, p. 221-230, 1995.
- PEÑUELAS, J.; FILELLA, I. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 4, p. 151-155, 1998.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995–2018, 1998.
- PONZONI, F.J.; SHIMABUKURO, Y.E. **Sensoriamento remoto aplicado ao estudo da vegetação**. 1 ed., v.1, São José dos Campos: Parêntese, 2007. 135p.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro, 2010. 830p.
- RIBEIRO, F.A.L. **Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2001. 196p. Tese (Mestrado) - IQ- Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- RICHARDSON, A.D.; DUGAN, S.P.; BERLYN, G.P. An evaluation of non invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, v. 153, p. 185–194, 2002.
- RINNAN, A.; van den BERG, F.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.
- ROCHA, J.T.C. **Emprego de espectrometria no infravermelho e métodos quimiométricos para a identificação e quantificação de petróleo a partir de misturas de frações de diesel**. 2009. 122p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. OMNI Research: Washington, D.C., 2001. 71p.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683–700, 2007.
- ROSENDO, J.S. **Índices de vegetação e monitoramento do uso do solo e cobertura vegetal na bacia do rio Araguari – MG utilizando dados do sensor MODIS**. 2005. 152p. Tese (Mestrado) - Universidade de Uberlândia, Uberlândia.
- SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; FERNANDES, K.R.G.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* propagadas in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 888-890, 2007.
- SEELIG, H.D.; HOEHN, A.; STODIECK, L.S.; KLAUS, D.M.; ADAMS III, W.W.; EMERY, W.J. Relations of remote sensing leaf water indices to leaf water thickness in cowpea, bean, and sugarbeet plants. **Remote Sensing of Environment**, v. 112, n. 2, p. 445–455, 2008.
- SILVA, D.F.; MICHELON, N.; ORSINI, F.; TROMBONI, F.; GIANQUINTO, G.P. **Manual prático de horticultura hidropônica para cultivas hortaliças em área urbana e periurbana**. Piauí: Codecrop, 2007. 34p.
- SILVA, E.A.; MARANGON, G.P.; DESSBESELL, L.; MORAIS, W.W.; LIPPERT, D.B.; PEREIRA, R.S. Caracterização espectral na reflectância de *Eucalyptus grandis*. **Floresta**, v. 42, n. 2, p. 285-292, 2012.
- SIMS, D.A.; GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, p. 337-354, 2002.
- STAGAKIS, S.; GONZÁLEZ-DUGO, V.; CID, P.; GUILLÉN-CLIMENT, M.L.; ZARCO-TEJADA, P.J. Monitoring water stress and fruit quality in an orange orchard under regulated deficit irrigation using narrow-band structural and physiological remote sensing indices. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 71, p. 47–61, 2012.
- STEIDLE NETO, A.J.; GROSSI, J.A.S.; PINTO, F.A.C. Postharvest shape characterization of calla lily flowers using digital imaging. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 57, p. 421-428, 2009.
- STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Artmed: Porto Alegre, 2004. 722p.

- TEILLET, P.M.; STAENZ, K.; WILLIAM, D.J. Effects of spectral, spatial, and radiometric characteristics on remote sensing vegetation indices of forested regions. **Remote Sensing of Environment**, v. 61, n. 1, p. 139–149, 1997.
- VIDIGAL, S.M.; RIBEIRO, A.C.; CASALI, V.W.D.; FONTES, L.E.F. Resposta da alface (*Lactuca sativa* L.) ao efeito da adubação orgânica. II – Ensaio em casa de vegetação. **Revista Ceres**, v. 42, n. 239, p. 89-97, 1995.
- VIEIRA, E.L.; SOUZA, G.S.; SANTOS, A.R.; SILVA, J.S. **Manual de Fisiologia Vegetal**. EDUFMA: São Luis, MA, 2010. 230p.
- VIGNEAU, N.; ECARNOT, M.; RABATEL, G.; ROUMET, P. Potential of field hyperspectral imaging as a non destructive method to assess leaf nitrogen content in wheat. **Field Crops Research**, v. 122, p. 25-31, 2011.
- WELLMANN, E.; HARZDINA, G.; GRISEBACH, H. Introduction of anthocyanin formation and enzymes related to its biosynthesis by UV light in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 913–915, 1976.
- WILLIAMS, C.M. Nutritional quality of organic food: shades of grey or shades of green? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 19-24, 2002.
- YI, Q.; JIAPAER, G.; CHEN, J.; BAO, A.; WANG, F. Different units of measurement of carotenoids estimation in cotton using hyperspectral indices and partial least square regression. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 91, p. 72–84, 2014.
- ZHANG W, SEKI M, FURUSAKI S. Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. **Plant Science**, v. 127, p. 207–214, 1997.
- ZHANG, H.; WANG, J. Detection of age and insect damage incurred by wheat, with an electronic nose. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 489–495, 2007.
- ZHANG, L.; ZHOU, Z.; ZHANG, G.; MENG, Y.; CHEN, B.; WANG, Y. Monitoring the leaf water content and specific leaf weight of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in saline soil using leaf spectral reflectance. **European Journal of Agronomy**, v. 41, p. 103–117, 2012.
- ZHAO, D.H.; LI, J.L.; QI, J.G. Identification of red and NIR spectral regions and vegetative indices for discrimination of cotton nitrogen stress and growth stage. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 48, p. 155–169, 2005.
- ZHONG, J.; SEKI, T.; KINOSHITA, S.; YOSHIDA, T. Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 653–658, 1991.

3. CLASSIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DE ALFACES COM BASE NA REFLECTÂNCIA ESPECTRAL

Artigo escrito conforme as normas do periódico *Food Analytical Methods*

RESUMO - Os empreendimentos olerícolas têm buscado implementar novas tecnologias à sua produção, sendo a classificação por visão artificial uma forma de agilizar o processo, aumentar sua eficiência e precisão e automatizar tarefas tediosas e subjetivas. A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo que a sua classificação, de acordo com a cultivar, coloração das folhas, presença de defeitos e outras características, tem sido realizada de forma predominantemente manual. Os métodos espectrométricos fornecem “impressões digitais” detalhadas das amostras biológicas, sendo a reflectância espectral pesquisada e empregada com sucesso no desenvolvimento de diferentes sistemas de classificação automatizados. Neste trabalho, a reflectância espectral foi utilizada na pós-colheita de alface, visando o uso desta tecnologia dentro de sistemas automatizados para a classificação de três cultivares (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo. Com base nesses dados, foram avaliadas duas técnicas de modelagem matemática, a regressão polinomial e a análise de componentes principais (PCA). Os resultados evidenciaram que a reflectância espectral possui um grande potencial para distinguir cultivares de alface de diferentes cores (verde e roxa). Além disso, o sistema de produção influenciou na síntese de antocianinas das plantas de alface Mimosa, afetando as assinaturas espectrais e os modelos de classificação. A técnica de regressão polinomial se mostrou eficiente, classificando corretamente as cultivares Cristal e Regina 2000 como cultivares verdes em 100% dos casos, e Mimosa como cultivar roxa em 87% das amostras avaliadas. Na análise de componentes principais, a classificação foi efetiva em 100% das amostras para as três cultivares.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., Regressão polinomial, Espectrometria, Análise de componentes principais (PCA).

EVALUATION OF TECHNIQUES FOR AUTOMATIC CLASSIFICATION OF LETTUCE BASED ON SPECTRAL REFLECTANCE

ABSTRACT - Horticultural sector have sought out new technologies to enhance its competitiveness. In this context, the automatic classification by artificial vision is a way of speeding up processes, improving their performances and precisions, also automating tedious and subjective tasks. Globally, lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most important salad vegetables and its classification is predominantly a manual work. The spectrometric methods supply sequence information about biological samples based on the interactions of their physical characteristics with the electromagnetic radiation, and the spectral reflectance has been successful in accurately classifying different products. In this work spectral signature characterization of three lettuce cultivars (Crystal, Regina 2000 and Mimosa) grown under different farming systems was performed, aiming at improving this food sorting process. Based on these data, two mathematical modeling techniques, the polynomial regression and the principal component analysis (PCA), were evaluated for lettuce postharvest automatic classification. Results showed that the spectral reflectance has great potential to distinguish lettuce cultivars with different colors. Further, the different farming system cover types affected the Mimosa anthocyanin synthesis, consequently influencing the spectral signatures and the classification models. The polynomial regression technique was effective in classifying the Crystal and Regina 2000 as green cultivars with accuracy of 100%, and the Mimosa as red cultivar with accuracy of 87%. When using PCA, both classification accuracies of Crystal and Regina 2000 as green cultivars and of Mimosa as red cultivar were 100%.

Keywords: *Lactuca sativa* L., Polynomial regression, Spectrometry, Principal Component Analysis (PCA).

3.1 Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais produzidas e consumidas, devido ao avanço tecnológico e ao desenvolvimento de novas variedades, que contribui para que a produção ocorra durante todo o ano; à facilidade de aquisição, de preparo

e pelo baixo custo. A produção mundial de alface foi de 24.896.115,89 toneladas em 2013 (FAOSTAT, 2013), estima-se que o consumo médio diário de alface no Brasil seja de 3,6 g por pessoa (IBGE, 2011) e na Europa de 22,5 g por pessoa (Pérez-López et al., 2015a).

Após a colheita, as alfaces passam por um processo de classificação antes de serem encaminhadas aos centros de distribuição e de comercialização. Neste processo, as plantas são separadas em lotes homogêneos, classificados de acordo com a cultivar (crespa, americana, mimosa, lisa ou romana), coloração das folhas (verde ou roxa), peso da cabeça e quanto à presença de defeitos (Vojin et al., 2014).

Em geral, a classificação pós-colheita das plantas de alface é feita manualmente por meio de inspeções visuais. No sistema produtivo de hortaliças, uma quantidade excessiva de tarefas manuais pode colocar em risco a saúde dos agricultores, por demandarem esforços físicos consideráveis, posturas desconfortáveis e movimentos repetitivos, além da pressão pela diminuição no tempo gasto nas atividades. Estes esforços podem ocasionar o aparecimento de distúrbios musculares, esqueléticos e levar ao estresse devido à rotina exaustiva de trabalho, além de aumentar a probabilidade de erros nas atividades de seleção e classificação (Jarimopas e Jaisin, 2008).

De acordo com Pu et al. (2015), existe uma pressão por métodos sem contato, não destrutivos, rápidos, precisos e eficientes para a avaliação rápida de produtos agrícolas nos processos industriais. Seguindo esta tendência e visando o menor esforço da mão de obra e o aumento de produtividade, os empreendimentos olerícolas têm buscado incorporar novas tecnologias à sua produção, como a utilização de insumos modernos, cultivares híbridas de alto potencial produtivo e máquinas e equipamentos de alta eficiência, incluindo ferramentas de classificação automática.

Os métodos espectrométricos fornecem “impressões digitais” detalhadas das amostras biológicas, utilizando características físicas da interação destas com a radiação eletromagnética, tais como a reflectância, transmitância e absorbância (Jones e Vaughan, 2010).

A reflectância espectral tem sido pesquisada e empregada no desenvolvimento de sistemas automatizados que funcionam como uma “visão artificial” aplicada em processos de classificação de produtos agrícolas como, por exemplo, na separação de produtos com características diferentes (Borrás et al., 2014; Li et al., 2014; Gouvinhas et al., 2015; Wang et al., 2015) e para discriminar diferentes cultivares de oliveira (Aouidi et al., 2012), de videira

(Diago et al., 2013) e de café (Garrett et al., 2013). Esta técnica também tem sido utilizada para a detecção dos estádios de maturação (Lleo et al., 2009; Steidle Neto et al., 2009; Simko et al., 2015), avaliação da qualidade de produtos (Diezma et al., 2013; Ouyang et al., 2013), para detectar injúrias (Xu et al., 2007; Elmasry et al., 2008; Jones et al., 2010) além de outras aplicações de classificação (Du e Sun, 2006; Gowen et al., 2007; Zhao et al., 2015).

Neste contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter as assinaturas espectrais de três cultivares de alface (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo, visando melhorar o processo de classificação deste produto. Com base nesses dados, duas técnicas de modelagem matemática, a regressão não linear e a análise de componentes principais (PCA) foram avaliadas para a classificação automática pós-colheita de alface.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Aquisição de dados

Neste trabalho, foram utilizadas alfaces das cultivares Cristal (folhas crespas e verdes), Regina 2000 (folhas lisas e verdes) e Mimosa (folhas crespas e roxas) cultivadas no município de Capim Branco, Estado de Minas Gerais, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude 19°32'S, longitude 44°07'W e altitude de 757 m. O clima da região é caracterizado como tropical chuvoso, com inverno seco e estação chuvosa, predominantemente, de outubro a março. De acordo com Alvares et al. (2013), o clima é mesotérmico úmido (Cwa), segundo a classificação de Köppen.

As alfaces foram cultivadas sob os sistemas orgânico, hidropônico e sem agrotóxicos (SAT), com o objetivo de incorporar no modelo de classificação possíveis efeitos associados às diferenças entre as práticas do sistema sobre as alfaces. As parcelas experimentais foram dispostas em blocos casualizados com três repetições.

O sistema orgânico obedeceu às normas propostas para este tipo de produção, seguindo os processos da agricultura ecológica, em detrimento do uso de insumos químicos (fertilizantes e pesticidas). Neste sistema, as sementes foram semeadas em bandejas contendo húmus como substrato. Após 45 dias, as mudas foram transplantadas para os canteiros feitos a partir da mistura de terra e composto orgânico de esterco animal e restos vegetais. Ao 10º e

20° dia após o transplântio das mudas, foram aplicadas as caldas com urina de vaca a 10% e sulfocálcica a 1%, respectivamente. O experimento foi montado sob uma cobertura de polietileno de baixa densidade (150 µm) com dois anos de uso. A irrigação e a capina das plantas espontâneas foram realizadas conforme a necessidade da cultura.

O experimento em sistema hidropônico foi baseado na técnica de filme nutriente (NFT), em que a solução de nutrientes minerais flui abaixo das raízes das plantas. Neste sistema, as mudas foram feitas em bandejas contendo espuma fenólica. Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para um sistema de canaletas dispostas em bancadas. As canaletas continham uma solução nutritiva composta de água, fosfato monoamônico, nitrato de potássio, nitrato de cálcio, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio, micronutrientes (Mn, Zn e Bo) e Ferro que circulava durante 15 minutos e paravam por igual período. O controle de insetos foi realizado com o uso de iscas e lâmpadas dispostas em vários pontos dentro do ambiente de cultivo. Este sistema de cultivo foi montado no interior de ambiente protegido, revestido com filme plástico de polietileno de baixa densidade (150 µm). Abaixo desta cobertura plástica, foi instalada uma cortina horizontal de malha aluminizada, que bloqueia parcialmente a entrada de radiação solar (50% de abertura).

No sistema de cultivo SAT (sem agrotóxico ou organo-mineral), a semeadura foi realizada diretamente nos canteiros, que foram feitos a partir da mistura de terra e composto orgânico de esterco animal e restos vegetais, além da realização da adubação mineral com o composto NPK 4-14-8. Após a germinação, foi realizado um desbaste para que o espaçamento entre as plantas favorecessem o seu melhor desenvolvimento. A irrigação e a capina das plantas espontâneas foram realizadas conforme a necessidade da cultura. Não foi necessária a aplicação de nenhum produto para controle de pragas e doenças. O cultivo neste sistema ocorreu a céu aberto, sem o uso de cobertura.

A amostragem foi realizada da mesma forma em todos os sistemas de cultivo, escolhendo-se aleatoriamente dentro das parcelas experimentais uma planta de cada cultivar. Desta forma, em cada sistema de cultivo, utilizou-se um total de nove plantas. A colheita foi realizada sempre no período da manhã e as alfaces foram transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Engenharia Agrícola, situado na Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Sete Lagoas, Minas Gerais, a 22 km da área experimental.

Em laboratório, as plantas passaram por limpeza em água corrente e três folhas de cada planta coletada foram selecionadas aleatoriamente para análise espectrométrica, sendo

realizada uma medida em cada folha, gerando um total de 81 espectros de reflectância (3 sistemas de cultivo \times 3 cultivares \times 3 plantas \times 3 folhas). A medição foi realizada na superfície adaxial de cada folha, evitando as nervuras centrais e os limites.

Para a obtenção da assinatura espectral de cada folha, foi usado um espectrômetro portátil (JAZ-EL350, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA) acoplado a um computador. O espectrômetro foi conectado por meio de fibra ótica (300 μm) a uma esfera de integração com uma fonte de luz halógena de tungstênio (ISP-REF, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA) (Figura 1). Em função da folha de alface ser muito delgada, foi utilizada uma superfície de coloração preta fosca para evitar a contribuição da reflexão de luz posterior à sua transmissão pela folha. Neste intuito, a folha de alface foi posicionada, durante as medidas, entre a superfície preta fosca e o orifício de medida da esfera integradora. O espectrômetro foi configurado para capturar e armazenar dados de reflectância na região visível e infravermelho próximo do espectro (500 - 1023 nm), com uma resolução espectral de 0,36 nm.



Figura 1. Equipamentos e acessórios usados para medir a reflectância espectral de folhas de alface.

Foi considerado um tempo de dez minutos para o adequado aquecimento da fonte de luz antes do início das medidas, assim como para a calibração do equipamento. Esta calibração correspondeu à aquisição de reflectância do padrão de reflectância difusa com Spectralon™ (WS-1, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA), representando a reflectância máxima. Logo em seguida, procedeu-se a calibração na ausência de luz, representando a reflectância mínima, por meio da obstrução completa do orifício de medida da esfera de integração e do desligamento da fonte luminosa.

A reflectância espectral foi expressa como uma porcentagem relativa à reflectância máxima e mínima, como mostrado pela equação descrita por Xing e Baerdemaeker (2005):

$$\rho_{\lambda} = \left(\frac{S_{\lambda}^f - D_{\lambda}^{rm \text{ in}}}{\rho_{\lambda}^{rm \text{ áx}} - D_{\lambda}^{rm \text{ in}}} \right) 100 \quad (1)$$

em que:

ρ_{λ} = reflectância espectral da folha (%),

S_{λ}^f = intensidade da energia refletida na folha (adimensional),

$D_{\lambda}^{rm \text{ in}}$ = intensidade da energia refletida considerando a ausência de luz (adimensional), e

$\rho_{\lambda}^{rm \text{ áx}}$ = reflectância espectral do padrão Spectralon™ (adimensional).

Todos estes parâmetros foram aplicados considerando cada comprimento de onda λ .

Após a obtenção das assinaturas espectrais, procedeu-se a determinação da cor instrumental das amostras, avaliada por meio dos parâmetros L^* , a^* e b^* do modelo de cor CIELAB, realizado com o auxílio de um colorímetro (CR-400, Konica Minolta, Mahwah, New Jersey). Neste sistema de cores, o L^* corresponde à luminosidade que varia do preto (zero) ao branco (100), a cromaticidade a^* variando do verde (-100) ao vermelho (+100) e a cromaticidade b^* variando do azul (-100) ao amarelo (+100).

Foram realizadas três leituras, em pontos equidistantes, na face adaxial de cada folha de alface, sendo que posteriormente a média para cada folha foi calculada. Os dados de cor instrumental foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) utilizando-se o programa estatístico Sisvar 5.2 (Ferreira, 2011).

3.2.2 Processamento e análise de dados

Para a classificação automática das alfices, foram avaliadas duas técnicas de modelagem matemática, regressão polinomial e análise de componentes principais (PCA – “Principal Component Analysis”).

Para a análise por regressão polinomial utilizou-se o *software* SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, Canadá), seguindo a metodologia proposta pela Steidle Neto et al.

(2009), em que um modelo polinomial de 5º grau com seis parâmetros foi ajustado às assinaturas espectrais médias de cada uma das três cultivares de alface estudadas. Neste caso, foi considerada a faixa de comprimento de onda compreendida de 500 a 675 nm, onde foram verificadas as maiores variações visuais entre as assinaturas espectrais médias e que representa a região de maior absorção da radiação eletromagnética pelos pigmentos vegetais (Taiz e Zeiger, 2004; Vieira et al., 2010).

A partir das três equações geradas (uma regressão para cada cultivar), foram calculados os intervalos de confiança ($P < 0,05$) para cada parâmetro e os coeficientes de determinação (R^2) para cada modelo de regressão. Posteriormente, verificou-se a existência de intervalos de confiança que não se sobrepunham, o que indica a possibilidade de classificação automática através da técnica de regressão polinomial.

Para a validação da classificação, foram selecionadas aleatoriamente 27 assinaturas espectrais originais, representando três folhas de cada cultivar dentro de cada um dos três sistemas de cultivo. Estas amostras foram submetidas à regressão polinomial de 5º grau individualmente e os parâmetros obtidos foram comparados aos intervalos de confiança estabelecidos na primeira fase da análise.

A análise por PCA é uma técnica multivariada utilizada para analisar, classificar e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original e explicar a correlação entre um grande número de variáveis, como os espectros, sem perder muita informação. Com o objetivo de expressar as principais informações contidas nas variáveis originais em um número menor de variáveis, chamados de componentes principais, que descrevem as principais fontes de variação nos dados (Borrás et al., 2014; Kong et al., 2009; Zhang e Wang 2007).

Para a realização da PCA foi utilizado o *software* Scilab (Scilab Enterprises, Orsay, França) com um código desenvolvido especificamente para esta aplicação. Nesta análise, foram empregados os espectros completos (500 – 1023 nm) e os seguintes pré-tratamentos foram aplicados aos dados espectrais antes da geração do modelo PCA: normalização, correção de deformações, centralização e padronização. A PCA foi aplicada sobre as 81 assinaturas espectrais das folhas de alface, sendo 27 de cada cultivar.

Basicamente, as variáveis originais (comprimentos de onda das assinaturas espectrais pré-tratadas) foram transformadas em novas variáveis, conhecidas como componentes principais (PCs), sendo cada uma delas uma combinação linear das variáveis originais. Desta

forma, o *software* classificou os agrupamentos de dados, mostrando a relação entre as observações, nos quais as amostras similares foram localizadas próximas umas das outras (Ouyang et al., 2013).

3.3 Resultados e Discussão

As assinaturas espectrais médias obtidas para cada cultivar estudada nos três sistemas de cultivo (hidropônico, orgânico e SAT) são apresentadas na Figura 2. Os desvios padrão obtidos para os dados espectrais das cultivares Cristal, Regina 2000 e Mimosa foram de 1,3; 1,7 e 2,2% respectivamente. Os comportamentos espectrais obtidos neste estudo estão de acordo com aqueles obtidos por Pacumbaba e Beyl (2011) e Li et al. (2006) para alfaces submetidos a um controle completo de nutrientes, ao analisar mudanças nas assinaturas espectrais das folhas de alface em resposta a deficiências de macro e micronutrientes.

A cultivar Mimosa apresentou maiores desvios padrão (Figura 2c), acompanhando a variação na tonalidade roxa, medida pela cor instrumental de acordo com os parâmetros L^* , a^* e b^* do modelo de cor CIELAB, verificada principalmente para o sistema SAT (Tabela 1). As amostras da cultivar Mimosa, produzidas sob o sistema SAT, apresentaram-se mais roxas (com menores valores dos parâmetros L^* e b^* e maiores valores do parâmetro a^*) que as outras amostras da mesma cultivar produzidas nos sistemas hidropônico e orgânico. Provavelmente, estas diferenças ocorreram devido aos diferentes tipos de cobertura utilizados nos sistemas de cultivo, o que resultou em diferentes intensidades de radiação durante a produção de alface. Pérez-López et al. (2015b) também verificaram maiores variações na síntese de pigmentos em cultivares de alface roxa, quando cultivares de alface verde e roxa foram expostas a condições ambientais de diferentes intensidades de luz durante o cultivo. Marin et al. (2015) apontaram que a radiação mostrou uma correlação positiva com o teor de ácidos fenólicos e flavonoides, influenciando na variação da cor de diferentes cultivares de alface roxa.

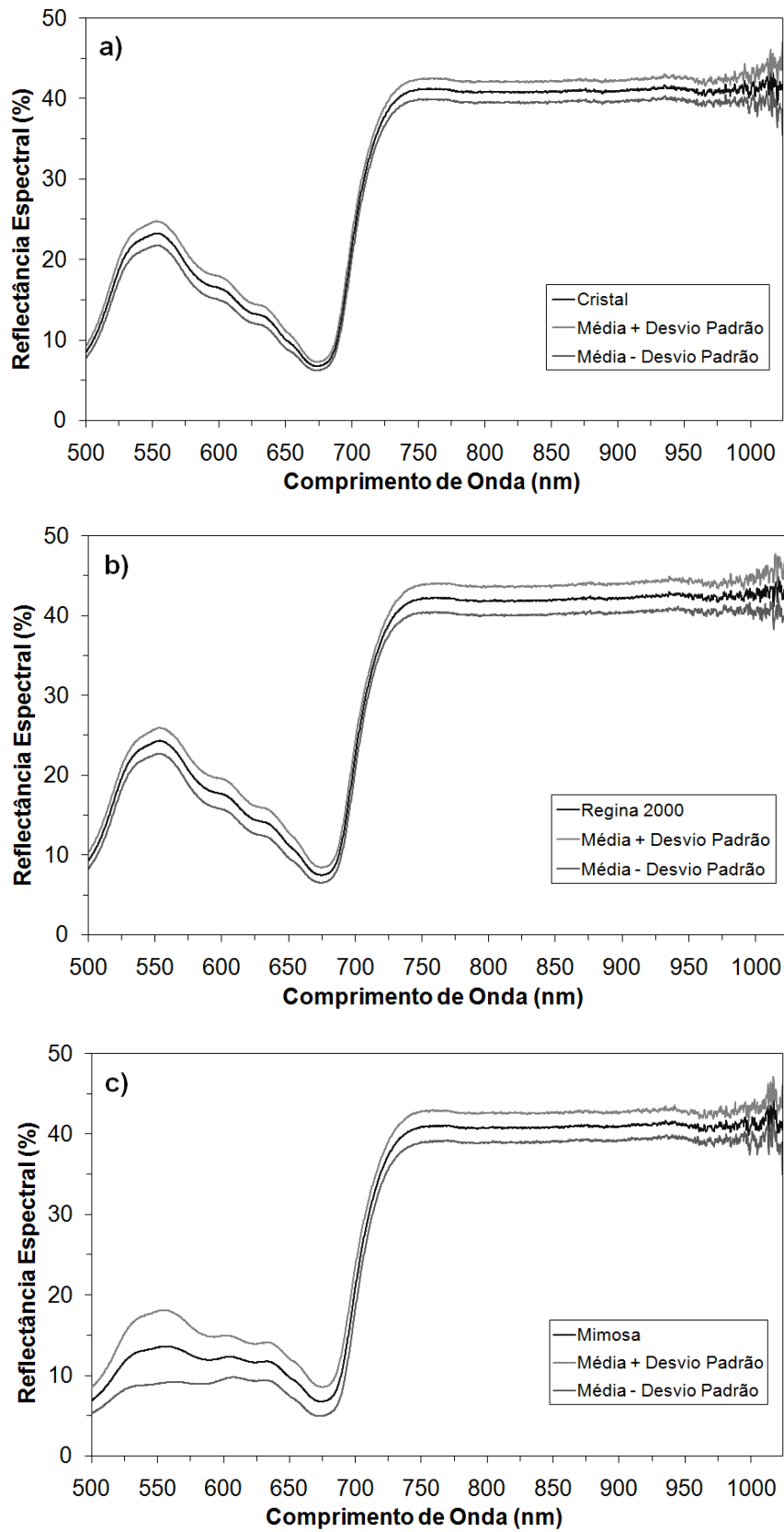


Figura 2. Média aritmética e desvios padrão dos espectros obtidos para as alfaves das cultivares Cristal (a), Regina 2000 (b) e Mimosa (c).

Tabela 1. Dados médios da cor instrumental avaliada através dos parâmetros L*, a* e b* do modelo de cor CIELAB, para a cultivar Mimosa, cultivada sob os sistemas hidropônico, orgânico e SAT.

Amostras	L	a*	b*
Mimosa Hidropônico	51,80 a	-16,88 a	32,74 a
Mimosa Orgânico	43,84 b	-7,19 b	26,49 a
Mimosa SAT	36,02 c	6,26 c	12,88 b
CV (%)	6,81	28,18	11,29

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Analisando as três cultivares em cada sistema de produção (Figura 3), é possível observar que as reflectâncias médias, na faixa de 500 a 650 nm, da cultivar Mimosa foram, na maioria dos casos, menores em comparação com as cultivares Cristal e Regina 2000. Além disso, nesta faixa de comprimentos de onda, o espectro médio da Cristal e da Regina 2000 ficaram sobrepostos para o sistema hidropônico. Uma sobreposição, também foi verificada entre espectros médios da Cristal e Regina 2000 na faixa de 700 – 930 nm para o sistema orgânico. Para todos os sistemas agrícolas em estudo, as assinaturas espectrais médias de alfaces cultivadas sob os sistemas hidropônico e orgânico foram muito semelhantes, enquanto a cultivar Mimosa produzida no sistema SAT apresentou um padrão de reflectância média diferente.

Estes dados são confirmados pela análise de cor instrumental considerando as três cultivares estudadas (Tabela 2), em que as alfaces Cristal e Regina 2000 foram iguais estatisticamente e se apresentaram mais verdes, ou seja, com maiores valores dos parâmetros L* e b* e menores valores do parâmetro a*. Já a cultivar Mimosa se diferiu das demais, apresentando-se mais roxa (com menores valores dos parâmetros L* e b* e maiores valores do parâmetro a*).

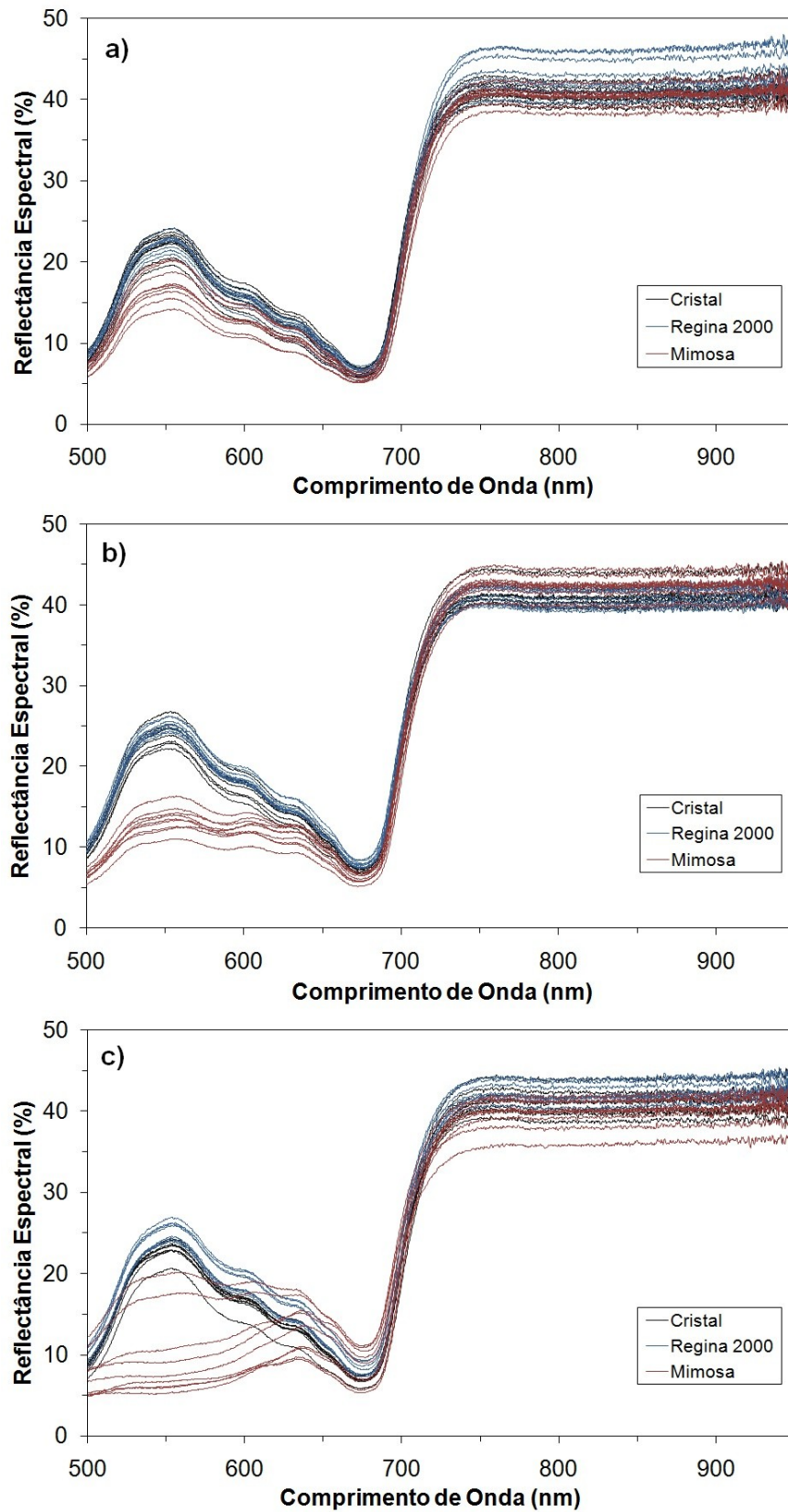


Figura 3. Espectros de reflectância obtidos para as cultivares Cristal, Regina 2000 e Mimosa, cultivadas sob os sistemas hidropônico (a), orgânico (b) e SAT (c).

Tabela 2. Dados médios da cor instrumental avaliada através dos parâmetros L*, a* e b* do modelo de cor CIELAB, para as cultivares Cristal, Regina 2000 e Mimosa, cultivadas nos sistemas hidropônico, orgânico e SAT.

Amostras	L	a*	b*
Cristal	57,50 a	-19,91 a	36,38 a
Regina 2000	59,06 a	-19,81 a	35,61 a
Mimosa	43,89 b	-5,94 b	24,03 b
CV (%)	8,33	39,43	16,63

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Como mencionado acima, a diferença da coloração apresentada pela cultivar Mimosa pode ser explicada pelos diferentes tipos de cobertura do sistema de cultivo, em que as plantas cultivadas no sistema SAT estavam mais roxas, no sistema orgânico apresentaram coloração roxa intermediária e no sistema hidropônico uma coloração roxa menos intensa. Provavelmente, as coberturas utilizadas nos sistemas hidropônico e orgânico podem ter influenciado na síntese de pigmentos roxos (antocianinas) nas alfaces, uma vez que estes pigmentos são produzidos através do metabolismo secundário das plantas e a sua concentração pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a radiação ultravioleta (Zhang et al., 2014) e a intensidade de luz (Zhong et al., 1991). Ainda, de acordo com Romani et al. (2002) e Hohl et al. (2001), as plantas de alface apresentam uma concentração maior de flavonoides (como as antocianinas) quando cultivadas no campo do que quando cultivadas em estufa, devido às diferentes intensidades de radiação solar que atingem as plantas. Isso ocorre porque os flavonoides e ácidos fenólicos são sintetizados através da via do fenilpropanoide, em que a enzima fenilalanina amoniliase tem a sua expressão dependente da luz (Leyva et al., 1995).

Os resultados referentes às regressões polinomiais aplicadas a cada assinatura espectral média das alfaces na faixa entre 500 e 675 nm são apresentados na Figura 4. Para todas as cultivares, as reflectâncias máximas foram observadas no comprimento de onda de 550 nm, assumindo maiores valores para as cultivares Cristal e Regina 2000, com coloração verde predominante. Além disso, para todas as cultivares, as reflectâncias mínimas foram observadas após 650 nm. Estes resultados estão de acordo com Taiz e Zeiger (2004), que afirmaram que na faixa espectral entre 400 e 700 nm, a clorofila absorve a radiação nos

comprimentos de onda do vermelho (635 – 700 nm) e do azul (450 – 490 nm), refletindo no verde (480 - 560 nm).

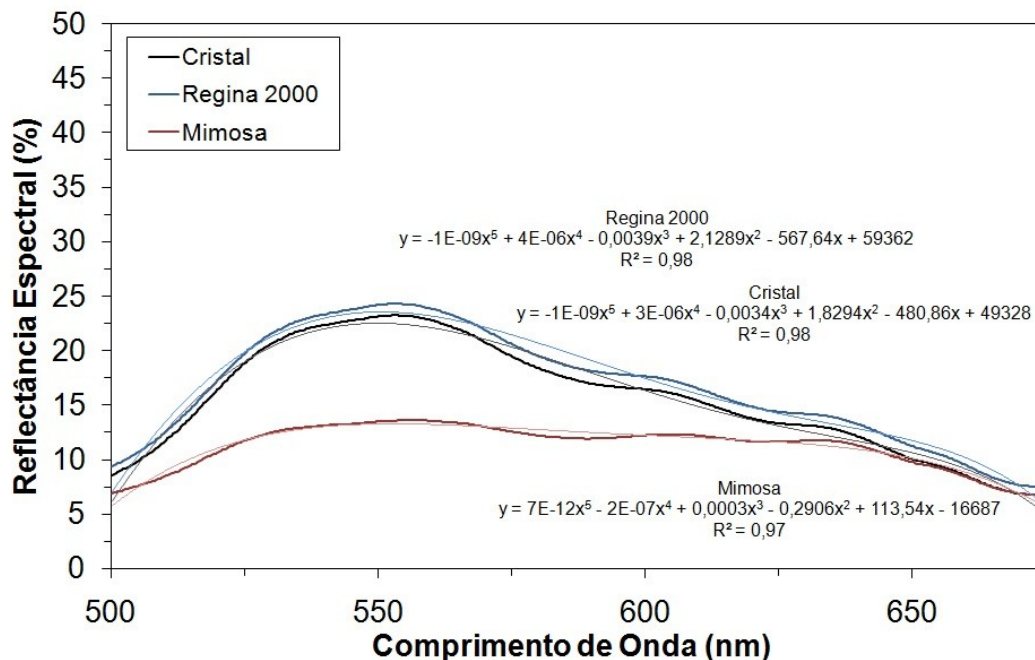


Figura 4. Assinaturas espectrais médias e regressões polinomiais de 5º grau das cultivares de alfaces Cristal, Regina 2000 e Mimosa.

O menor R^2 atribuído às alfaces da cultivar Mimosa pode ser explicado pela maior variação observada nas assinaturas espectrais, como discutido anteriormente e mostrado nas Figuras 2 e 3, e na Tabela 1. Steidle Neto et al. (2009) também obtiveram valores de R^2 superiores a 95% em regressões polinomiais aplicadas à classificação de estádios de maturação de flores de lírio. Valero et al. (2007) encontraram valores de R^2 variando de 30% a 70% com a utilização de regressões polinomiais para a classificação de pêssegos, nectarinas e ameixas em relação à sua firmeza, com resultados da classificação que variam de 61% a 98% durante a fase de calibração. O valor de R^2 representa a proporção da variação total dos valores observados que pode ser explicada pelo modelo de estimativa proposto. Estes valores podem variar de 0 (zero) a 1 (um), sendo que, quanto mais próximos de 1 (um), melhor o ajuste do modelo. Desta forma, neste estudo cerca de 98% das reflectâncias espectrais das alfaces verdes e 97% das reflectâncias espectrais das alfaces vermelhas foram explicadas pelas regressões polinomiais.

Os intervalos de confiança dos seis parâmetros obtidos com os modelos polinomiais de 5º grau para cada cultivar estão apresentados na Tabela 3.

Os intervalos de confiança das cultivares Cristal e Regina 2000 se sobrepuseram para todos os parâmetros. Porém nenhum dos intervalos de confiança das cultivares Cristal e Regina 2000 se sobrepôs aos da cultivar Mimosa (Tabela 4), sendo possível considerar estatisticamente que as curvas de reflectância espectral destes dois grupos (Cristal/Regina 2000 e Mimosa) são diferentes entre si ($P < 0,05$) e tornando possível a sua classificação automática com base na regressão polinomial proposta.

Tabela 3. Intervalos de confiança dos parâmetros das regressões polinomiais de 5º grau associados às cultivares de alface Cristal, Regina 2000 e Mimosa.

Parâmetro	Cultivar		
	Cristal	Regina 2000	Mimosa
A	[3,8E+04; 5,9E+04]	[4,8E+04; 6,9E+04]	[-2,2E+04; -1,1E+04]
B	[-5,6E+02; -3,8E+02]	[-6,5E+02; -4,7E+02]	[6,6E+01; 1,6E+02]
C	[1,5E+00; 2,1E+00]	[1,8E+00; 2,4E+00]	[-4,5E-01; -1,3E-01]
D	[-3,9E-03; -2,9E-03]	[-4,4E-03; -3,4E-03]	[0,0E+00; 6,0E-04]
E	[2,6E-06; 3,6E-06]	[3,1E-06; 4,0E-06]	[-3,8E-07; 8,9E-08]
F	[-1,3E-09; -9,7E-10]	[-1,4E-09; -1,1E-09]	[-7,5E-11; 8,5E-11]

Tabela 4. Intervalos de confiança dos parâmetros das regressões polinomiais de 5º grau associados às cores predominantes das alfaces (Cristal/Regina 2000 e Mimosa).

Parâmetro	Cristal/Regina2000 (verde)	Mimosa (roxa)
A	[3,8E+04; 6,9E+04]	[-2,2E+04; -1,1E+04]
B	[-6,5E+02; -3,8E+02]	[6,6E+01; 1,6E+02]
C	[1,5E+00; 2,4E+00]	[-4,5E-01; -1,3E-01]
D	[-4,4E-03; -2,9E-03]	[0,0E+00; 6,0E-04]
E	[2,6E-06; 4,0E-06]	[-3,8E-07; 8,9E-08]
F	[-1,4E-09; -9,7E-10]	[-7,5E-11; 8,5E-11]

Na validação do modelo de classificação automática por meio de regressão polinomial, 100% das amostras das cultivares Cristal/Regina 2000 foram corretamente discriminadas

como cultivares verdes e 87% das amostras da cultivar Mimosa foram classificadas como cultivares roxas. A menor porcentagem de acertos para a cultivar Mimosa pode ter ocorrido devido à maior variação na coloração das folhas, verificada entre os três sistemas de cultivo (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com outros estudos de classificação. Por exemplo, Sánchez et al. (2013) classificaram corretamente entre 82% e 84% de amostras de aspargos produzidos em sistemas orgânico e convencional, utilizando um espectrômetro portátil e modelos de regressão por mínimos quadrados parciais, demonstrando que a espectroscopia pode ser incorporada como uma tecnologia de pré e pós colheita para uso na indústria hortícola para autenticar produtos. Simko et al. (2015) encontraram quase 97% de precisão na classificação de amostras de alface minimamente processadas frescas ou deterioradas, testando em folhas roxa, verde escuro, verde, verde claro e amarela. Valero et al. (2007) obtiveram precisões na validação de 58% para 87% com a utilização de regressões não lineares para a classificação de pêssegos, nectarinas e ameixas em relação à sua firmeza.

Os resultados do modelo de PCA são apresentados na Figura 5, em que os dois primeiros componentes principais explicaram 75,1% (PC1 = 66,2% e PC2 = 8,9%) da variância entre cultivares verde e roxa. Assim como ocorreu com o método de classificação por regressão polinomial, só foi possível a separação entre as alfices roxa (Mimosa) e verdes (Cristal/Regina 2000), já que as duas cultivares com pigmentação predominantemente verde apresentaram sobreposição em seus escores, estando sempre associadas a valores de PC1 maiores ou iguais a 10. Já as amostras da cultivar Mimosa, apresentaram maior dispersão, mas não sobrepueram às outras cultivares, estando sempre associadas a valores de PC1 menores que 10. Utilizando este método foi possível a classificação correta em 100% das amostras avaliadas, sendo classificadas corretamente como cultivares verde ou roxa. Os resultados obtidos com a PCA são similares aos verificados por Serranti et al. (2013) que propuseram um sistema de classificação para diferenciar grãos de aveia com e sem casca, também alcançando 100% de acertos, e relatando PC1 igual a 66,3% e PC2 igual a 7,0%. Pereira et al. (2014) utilizando PCA para identificar alterações no metabolismo de folhas de alface em resposta à exposição ao pesticida mancozeb, também atingiram uma precisão de 100% e PC1 e PC2 contribuindo com 40 e 24% da variabilidade total dos dados, respectivamente. Llorack et al. (2008) utilizaram a técnica de PCA com a finalidade de discriminar amostras de escarola

de alface vermelha, obtendo um total de 93% da diferença explicada pela relação entre PC1 (72%) e PC2 (21%).

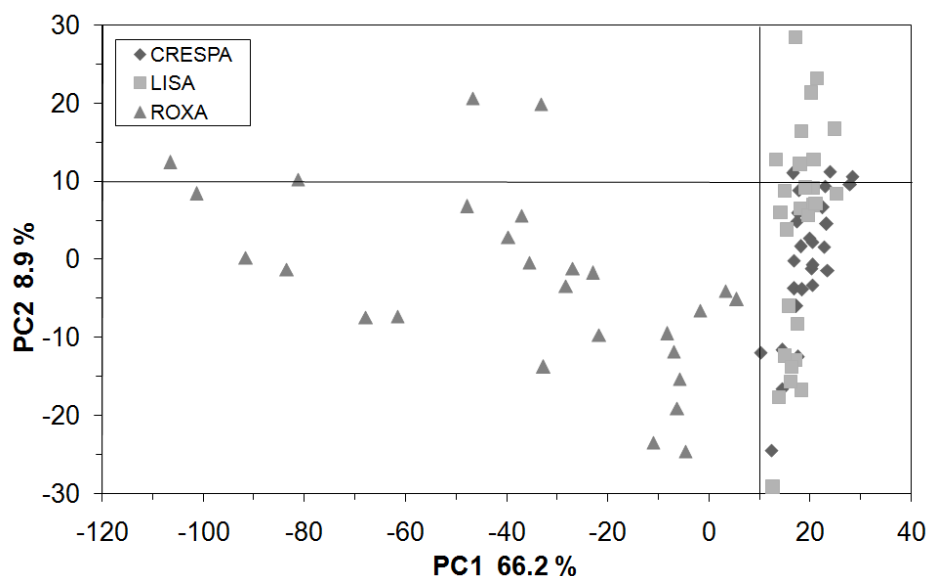


Figura 5. Gráfico de escores resultante da análise de PCA dos dados obtidos por espectrometria para alfaces Cristal, Regina 2000 e Mimosa.

3.4 Conclusão

A reflectância espectral possui grande potencial para distinguir cultivares de alface de diferentes cores (verde e roxa), podendo ser usada com sucesso como base para o desenvolvimento de ferramentas de classificação automática. O tipo de cobertura dos sistemas de produção influenciou na síntese de pigmentos das plantas de alface Mimosa, afetando as assinaturas espectrais e os modelos de classificação. As duas técnicas de modelagem matemática, regressão polinomial e análise de componentes principais, foram eficientes na classificação de cultivares de alface, sendo capazes de realizar a separação entre cultivares de coloração verde e roxa. A principal vantagem do modelo de regressão polinomial é a simplicidade de implementação, enquanto a principal vantagem do modelo baseado na PCA é a maior exatidão nas classificações. Assim, a escolha entre os métodos para utilização, fica vinculada principalmente à utilização dos *softwares* necessários aos procedimentos.

3.7 Referências Bibliográficas

- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol Z* 22(6): 711–728
- Aouidi F, Dupuy N, Artaud J, Roussos S, Msallem M, Perraud-Gaime I, Hamdi M (2012) Discrimination of five Tunisian cultivars by Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive *Olea europaea* leaves. *Food Chem* 131: 360–366
- Borrás E, Amigo JM, van den Berg F, Boqué R, Busto O (2014) Fast and robust discrimination of almonds (*Prunus amygdalus*) with respect to their bitterness by using near infrared and partial least squares discriminant analysis. *Food Chem* 153: 15–19
- Diago MP, Fernandes AM, Millan B, Tardaguila J, Melo-Pinto P (2013) Identification of grapevine varieties using leaf spectroscopy and partial least squares. *Comput Electron Agric* 99: 7–13
- Diezma B, Lleó L, Roger JM, Langreo AH, Lunadei L, Altisent MR (2013) Examination of the quality of spinach leaves using hyperspectral imaging. *Postharvest Biol Tech* 85: 8–17
- Du CJ, Sun DW (2006) Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: a review. *J Food Eng* 72: 39–55
- Elmasry G, Wang N, Vigneault C, Qiao J, Elsayed A (2008) Early detection of apple bruises on different background colors using hyperspectral imaging. *LWT Food Sci Tech* 41: 337–345
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistics Division (2013). Disponível em <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em 08/12/2015.
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnol* 35(6): 1039–1042
- Garrett R, Schmidt EM, Pereira LFP, Kitzberger CSG, Scholz MBS, Eberlin MN, Rezende CM (2013) Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *LWT Food Sci Technol* 50: 496–502
- Gouvinhas I, Almeida JMMM, Carvalho T, Machado N, Barros AIRNA (2015) Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Food Chem* 174: 226–232
- Gowen AA, O'Donnell CP, Cullen PJ, Downey G, Frias JM (2007) Hyperspectral imaging—an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends Food Sci Technol* 18: 590–598
- Hohl U, Neubert B, Pforte H, Schonhof I, Böhm H (2001) Flavonoid concentrations in the inner leaves of head lettuce genotypes. *Eur Food Res Technol* 213: 205–211
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil (2011). IBGE: Rio de Janeiro, p 150
- Jarimopas B, Jaisin N (2008) An experimental machine vision system for sorting sweet tamarind. *J Food Eng* 89: 291–297
- Jones CD, Jones JB, Lee WS (2010) Diagnosis of bacterial spot of tomato using spectral signatures. *Comput Electron Agric* 74: 329–335

- Jones HG, Vaughan RA (2010) Remote sensing of vegetation: principles, techniques and applications. Oxford University Press, Oxford
- Kong WJ, Zhao YL, Xiao XH, Jin C, Li ZL (2009) Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma coptidis chinensis* based on UPLC–PAD combined with chemometrics methods. *Phytomedicine* 16: 950–959
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinezzapater JM (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase messenger RNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light dependant manner. *Plant Physiol* 108: 39–46
- Li B, Liew OW, Asundo AK (2006) Pre-visual detection of iron and phosphorus deficiency by transformed reflectance spectra. *J Photochemistry Photobiol B Biol* 85: 131–139
- Li Z, Wang PP, Huang CC, Shang H, Pan SY, Li XJ (2014) Application of Vis/NIR spectroscopy for Chinese liquor discrimination. *Food Anal Methods* 7(6): 1337–1344
- Lleo L, Barreiro P, Ruiz-Altisent M, Herrero A (2009) Multispectral images of peach related to firmness and maturity at harvest. *J Food Eng* 93(2): 229–235
- Llorack R, Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán FA, Gil MI, Ferreres F (2008) Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem* 108: 1028–1038
- Marin A, Ferreres F, Barberá GG, Gil MI (2015) Weather variability influences color and phenolic content of pigmented baby leaf lettuces throughout the season. *J Agric Food Chem* 63(6): 1673–1681
- Ouyang Q, Zhao J, Chen Q, Lin H (2013) Classification of rice wine according to different marked ages using a novel artificial olfactory technique based on colorimetric sensor array. *Food Chem* 138: 1320–1324
- Pacumbaba RO Jr, Beyl CA (2011) Changes in hyperspectral reflectance signatures of lettuce leaves in response to macronutrient deficiencies. *Adv Space Res* 48: 32–42
- Pereira SI, Figueiredo PI, Barros AS, Dias MC, Santos C, Duarte ID, Gil AM (2014) Changes in the metabolome of lettuce leaves due to exposure to mancozeb pesticide. *Food Chem* 145: 291–298
- Pérez-López U, Miranda-Apodaca J, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A (2015a) Growth and nutritional quality improvement in two differently pigmented lettuce cultivars grown under elevated CO₂ and/or salinity. *Sci Hort* 195: 56–66
- Pérez-López U, Miranda-Appodaca J, Munoz-Rueda A, Mena-Petite A (2015b) Interacting effects of high light and elevated CO₂ on the nutraceutical quality of two differently pigmented *Lactuca sativa* cultivars (Blonde of Paris Batavia and Oak Leaf). *Sci Hort* 191: 38–48
- Pu H, Xie A, Sun DW, Jamruzzaman M, Ma J (2015) Application of wavelet analysis to spectral data for categorization of lamb muscles. *Food Bio Process Technol* 8: 1–16
- Romani A, Pinelli P, Galardi C, Sani G, Cimato A, Heimler D (2002) Polyphenols in greenhouse and open-air grown lettuce. *Food Chem* 79: 337–342
- Sánchez MT, Garrido-Varo A, Guerrero JE, Pérez-Marín D (2013) NIRS technology for fast authentication of green asparagus grown under organic and conventional production systems. *Postharvest Biol Technol* 85: 116–123
- Serranti S, Cesare D, Marini F, Bonifazi G (2013) Classification of oat and groat kernels using NIR hyperspectral imaging. *Talanta* 103: 276–284
- Simko I, Jimenez-Berni JA, Furbank RT (2015) Detection of decay in fresh-cut lettuce using hyperspectral imaging and chlorophyll fluorescence imaging. *Postharvest Biol Technol* 106: 44–52

- Steidle Neto AJ, Grossi JAS, Lopes DC, Anastácio EA (2009) Potential of spectral reflectance as postharvest classification tool for flower development of calla lily (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.). *Chilean J Agric Res* 69(4): 588–592
- Taiz L, Zeiger E (2004) *Fisiologia vegetal*. 3 edição. Artmed, PortoAlegre, p 722
- Valero C, Crisosto CH, Slaughter D (2007) Relationship between non destructive firmness measurements and commercially important ripening fruit stages for peaches, nectarines and plums. *Postharvest Biol Technol* 44: 248–253
- Vieira EL, Souza GS, Santos AR, Silva JS (2010) *Manual de fisiologia vegetal*. EDUFMA, São Luis, MA, p 230
- Vojin T, Snezana M, Aleksandar C, Marija P, Milana T, Dragana A, Jovan T, Angelina S (2014) Production of hairy root cultures of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Central Eur J Biol* 9(12): 1196–1205
- Wang L, Liu D, Pu H, Sun DW, Gao W, Xiong Z (2015) Use of hyperspectral imaging to discriminate the variety and quality of rice. *Food Anal Methods* 8: 515–523
- Xing J, Baerdemaeker JD (2005) Bruise detection on ‘Jonagold’ apples using hyperspectral imaging. *Postharvest Biol Technol* 37: 152–162
- Xu HR, Ying YB, Fu XP, Zhu SP (2007) Near-infrared spectroscopy in detecting leaf minor damage on tomato leaf. *Biosyst Eng* 96(4): 447–454
- Zhang H, Jordheim M, Lewis DH, Arathoon S, Andersen OM, Davies KM (2014) Anthocyanins and their differential accumulation in the floral and vegetative tissues of a shrub species (*Rhabdanthus solandri* A. Cunn). *Sci Hortic* 165: 29–35
- Zhang H, Wang J (2007) Detection of age and insect damage incurred by wheat, with an electronic nose. *J Stored Prod Res* 43(4): 489–495
- Zhao X, Dong S, Zheng W, Jiao L, Lang Y (2015) Discrimination of adulterated sesame oil using mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *Food Anal Methods* 8(9): 2308–2314
- Zhong J, Seki T, Kinoshita S, Yoshida T (1991) Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol Bioeng* 38: 653–658

4. DETERMINAÇÃO NÃO DESTRUTIVA DE PIGMENTOS EM ALFACES UTILIZANDO ESPECTROMETRIA E ANÁLISE MULTIVARIADA

Artigo escrito conforme as normas do periódico *Postharvest Biology and Technology*

RESUMO - Os pigmentos foliares desempenham importantes funções fisiológicas nas plantas e as medidas de reflectância espectral das folhas podem oferecer um método rápido e não destrutivo para a estimativa destes pigmentos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) para a estimativa do conteúdo foliar de clorofila, carotenoides e antocianinas em cultivares de alface. Para a calibração e validação dos modelos, foram utilizados dados de reflectância espectral de três cultivares de alface (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) cultivadas sob os sistemas orgânico, hidropônico e sem agrotóxicos - SAT. Foram determinadas as raízes dos erros quadráticos médios da calibração, da validação cruzada e da validação externa, além do erro médio de estimativa e o coeficiente de determinação da validação externa. Todos os modelos propostos apresentam resultados satisfatórios com relação aos índices estatísticos avaliados e altos níveis de acurácia, sendo os coeficientes de determinação obtidos para predição de clorofila, carotenoides e antocianinas iguais a 0,80, 0,76 e 0,88, respectivamente. O uso da espectrometria se confirmou como uma maneira rápida, não destrutiva e eficiente para determinar o teor de pigmentos em alfaces, apresentando-se como uma alternativa aos métodos convencionais.

Palavras-chave: Antocianinas, Carotenoides, Clorofilas, Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, Reflectância Espectral

NON-DESTRUCTIVE DETERMINATION OF PIGMENTS IN LETTUCES USING SPECTROMETRY AND MULTIVARIATE ANALYSIS

ABSTRACT - The leaf pigments play important physiological functions in plants and the leaf spectral reflectance measurements can provide a fast and non-destructive method for estimating these pigments. This study was carried out to develop partial least squares regression models (PLSR) for estimating the chlorophyll, carotenoid and anthocyanins

contents in lettuce cultivars. For the calibration and external validation of models spectral reflectance data of three lettuce cultivars (Crystal, Regina 2000 and Mimosa) cultivated under the organic, hydroponic systems and without pesticides were used. The root of the mean square error of calibration for the calibration with cross-validation and external validation, as well as the average estimation error and the coefficient of determination of the external validation were also determined. All proposed models showed satisfactory results, with high statistical indexes accuracy levels. The correlation coefficients obtained for prediction of chlorophyll, carotenoids and anthocyanins were 0.80, 0.76 and 0.88, respectively. The use of spectrometry was confirmed as a fast, non-destructive and efficient method to determine pigment contents in lettuce, acting as an alternative to conventional methods.

Keywords: Anthocyanins, Carotenoids, Chlorophylls, Partial Least Square Regression, Spectral Reflectance

4.1 Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça folhosa que possui grande quantidade de água nos seus tecidos, reduzido teor de lipídeos e baixo conteúdo energético. Além de ser uma importante fonte de vitaminas A, B1, B2, C e E, e sais minerais como ferro e cálcio (Nicolle et al., 2004a, 2004b).

As cultivares de alface possuem diversos formatos de cabeça, de folhas e várias cores. As cores exibidas pelas plantas de alface são decorrentes da presença de pigmentos vegetais (Allan et al., 2008). Além disso, estes pigmentos exercem importantes funções fisiológicas nas plantas, pois estão envolvidos em processos fotossintéticos, defesas contra estresse luminoso evitando a formação de espécies reativas de oxigênio, dentre outros (Taiz e Zeiger, 2004; Grotewold, 2006; Vieira et al., 2010; Sivankalyani et al., 2016).

Em geral, a clorofila é descrita como o pigmento mais abundante nos tecidos vegetais, sendo responsável pela absorção de luz utilizada no processo de fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2004). A clorofila presente nos vegetais possui propriedades anticancerígenas, efeito desintoxicante das células humanas e poder de inibição dos radicais livres (Rocha e Reed, 2014).

Os carotenoides são pigmentos que protegem a molécula de clorofila contra a foto-oxidação em condições de luz excessiva. Estes pigmentos refletem a radiação em comprimentos de onda do alaranjado ou do amarelo (aproximadamente de 575 a 675 nm) (Rodriguez-Amaya, 2001). Vários estudos descrevem a ação antioxidante dos carotenoides em sistemas biológicos, apresentando vários benefícios à saúde do homem (Carvalho et al., 2006; Maiani et al., 2009), além de apresentarem atividade pró-vitáminica A, que é essencial ao sistema imunológico, à visão, à diferenciação e desenvolvimento de tecidos humanos (Batista et al., 2006; Thurnham, 2007; Rodriguez-Amaya et al., 2008).

As antocianinas são pigmentos produzidos por meio do metabolismo secundário das plantas e a sua concentração pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a temperatura (Lo Piero et al., 2005; Ubi et al., 2006), a radiação UV (Zhou et al., 2007; Mes et al., 2008; Guo e Wang, 2010; Li et al., 2014), a intensidade da luz (Huang et al., 2009; Sun et al., 2014), o conteúdo de açúcar (Mori e Sakurai, 1994) e estresse osmótico (Do e Cormier, 1991). As antocianinas, como metabólitos secundários, desempenham um papel importante devido à sua atividade antioxidante, trazendo vários benefícios para a saúde humana, como o controle da hipertensão, distúrbios da visão, infecções microbianas e inibição da proliferação de células cancerosas (Butelli et al., 2008; Gould et al., 2009; Buer et al., 2010; Pascual-Teresa et al., 2010; Spencer, 2010; Chon et al., 2012).

A análise química de alimentos tem se tornado cada dia mais sofisticada, para que se possa quantificar corretamente as concentrações dos seus constituintes, diminuir o tempo despendido nas realizações destas análises, assegurar a qualidade dos resultados, além de garantir a biossegurança nas atividades laboratoriais (IAL, 2008).

Uma das vantagens obtidas com a modernização dos equipamentos de análise é o número de informações que podem ser extraídas em uma única amostra, como no caso da espectrometria, que detecta o comportamento espectral da amostra em vários comprimentos de onda. Para analisar este conjunto de dados, é necessário o uso de ferramentas mais sofisticadas para processar e extrair as informações relevantes (Cozzolino et al., 2011). Os modelos baseados na técnica multivariada, como a PLSR (*Partial Least Square Regression* - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais), permitem utilizar toda a informação espectral disponível, tornando a previsão dos constituintes dos produtos analisados mais exata, já que variações podem ocorrer não somente nos picos e vales, mas também em comprimentos de onda intermediários (Cunha Jr. et al., 2003).

Neste contexto, teve-se com este trabalho o objetivo de desenvolver um modelo para estimar os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas em cultivares de alface com folhas de coloração verde e roxa, utilizando-se a espectrometria e a análise multivariada.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Cultivo de alfaces

Neste trabalho, foram utilizadas alfaces das cultivares Cristal (folhas crespas e verdes), Regina 2000 (folhas lisas e verdes) e Mimosa (folhas crespas e roxas) cultivadas sob os sistemas orgânico, hidropônico e SAT (sem agrotóxico), no município de Capim Branco, Estado de Minas Gerais, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude 19°32'S, longitude 44°07'W e altitude de 757 m. O clima da região é caracterizado como tropical chuvoso, com inverno seco e estação chuvosa, predominantemente, de outubro a março. De acordo com Alvares et al. (2013), o clima é mesotérmico úmido (Cwa), segundo a classificação de Köppen.

No sistema orgânico, as sementes foram plantadas em bandejas de polipropileno contendo composto orgânico feito a partir de esterco bovino e restos vegetais como substrato. Após 45 dias, as mudas foram transplantadas para canteiros, que foram feitos a partir da mistura de solo com o mesmo composto utilizado inicialmente. Ao 20º dia após o transplante das mudas, foi aplicada calda sulfocálcica (50% de enxofre e 5% de cálcio) a 1%. O experimento foi montado sob uma cobertura de polietileno de baixa densidade (150 µm) com dois anos de uso. A irrigação e a capina das plantas espontâneas foram realizadas conforme a necessidade da cultura. O delineamento utilizado neste sistema foi o inteiramente casualizado composto de três blocos, onde cada um foi subdividido para dispor as três cultivares (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) aleatoriamente. Cada bloco foi composto por seis linhas de cultivo espaçadas em 0,2 m, contendo cinco plantas por linha. Assim, totalizaram-se 30 plantas em cada bloco, sendo 10 de cada cultivar.

No sistema hidropônico, as mudas foram cultivadas em espuma fenólica e, 15 dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para perfis hidropônicos dispostos em bancadas no interior de um ambiente protegido. Na parte interna dos perfis hidropônicos, foi aplicada uma lâmina de solução nutritiva composta de água, fosfato monoamônio, nitrato de

potássio, nitrato de cálcio, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio, micronutrientes (Mn, Zn e Bo) e Ferro, com condutividade elétrica variando de 1,0 a 1,5 dS m⁻¹, que circulava periodicamente durante 15 minutos e parava por igual período. Este sistema de cultivo foi montado no interior de ambiente protegido, revestido com filme plástico de polietileno de baixa densidade (150 µm). Abaixo desta cobertura plástica, foi instalada uma cortina horizontal de malha aluminizada, que bloqueia parcialmente a entrada de radiação solar (50% de abertura). O controle de pragas foi realizado com o uso de iscas e lâmpadas dispostas em vários pontos dentro do ambiente de cultivo. O delineamento experimental foi o mesmo utilizado no sistema orgânico. Cada bloco foi composto de seis canais de cultivo espaçados em 0,20 m, contendo cinco plantas em cada canal, totalizando 30 plantas em cada bloco, sendo 10 de cada cultivar.

No sistema de cultivo SAT (sem agrotóxico ou organo-mineral), a semeadura foi realizada diretamente nos canteiros, que foram feitos a partir da mistura de solo e composto orgânico de esterco bovino e restos vegetais, além da realização da adubação mineral com o fertilizante granulado NPK 4-14-8. Após a germinação, foi realizado um raleio para que o espaçamento entre as plantas favorecesse o seu melhor desenvolvimento. O cultivo neste sistema ocorreu a céu aberto, sem o uso de cobertura. A irrigação e a capina das plantas espontâneas foram realizadas conforme a necessidade da cultura. Não foi necessária a aplicação de nenhum produto para o controle de pragas e doenças. O delineamento experimental foi o mesmo utilizado nos outros sistemas, com um plantio de 10 linhas espaçadas em 0,2 m, contendo seis plantas por linha. Assim, totalizou-se 60 plantas em cada bloco, sendo 20 de cada cultivar.

A amostragem foi realizada da mesma forma em todos os sistemas de cultivo, escolhendo-se aleatoriamente, dentro de cada bloco uma planta de cada cultivar, considerando-se apenas as linhas centrais de cultivo. Desta forma, em cada sistema de cultivo, utilizou-se um total de nove plantas. As colheitas foram realizadas no período da manhã e as alfaces foram transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Engenharia Agrícola, situado na Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, a 22 km da área experimental, onde passaram por limpeza em água corrente.

4.2.2 Medidas de reflectância espectral

Para as medidas de espectrometria, foram destacadas três folhas aleatoriamente de cada planta coletada, sendo realizada uma medida em cada folha, gerando um total de 81 espectros de reflectância (3 sistemas x 3 cultivares x 3 plantas x 3 folhas).

Na obtenção da assinatura espectral de cada folha de alface foi usado um espectrômetro portátil (JAZ-EL 350, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA) conectado a um computador portátil. O espectrômetro foi acoplado a uma esfera de integração (ISP-REF, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA) por meio de fibra ótica (300 μm), que possui internamente uma fonte de luz halógena de tungstênio Vis/NIR (Figura 1).

As medidas foram realizadas posicionando o terço superior da face adaxial da folha no orifício da esfera de integração, evitando-se a nervura central e as bordas. Em função da folha de alface ser muito delgada, foi utilizada uma superfície de coloração preta fosca para evitar a contribuição da reflexão de luz posterior à sua transmissão pela folha. Neste intuito, a folha de alface foi posicionada entre a superfície preta fosca e o orifício de medida da esfera integradora.

O espectrômetro foi pré-configurado para capturar e armazenar dados de reflectância na região visível e infravermelho próximo do espectro (500 a 1.023 nm) com uma resolução espectral de 0,36 nm, através do *software* Spectra Suite[®] (Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA).



Figura 1. Equipamentos e acessórios usados para medir a reflectância espectral

Foi considerado um intervalo de tempo (aproximadamente 10 minutos) para o adequado aquecimento da fonte de luz antes do início das medidas, assim como para a calibração do equipamento. Esta calibração correspondeu à aquisição de reflectância do padrão de reflectância difusa com Spectralon[®] (WS-1, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA), representando a reflectância máxima. Logo em seguida, procedeu-se a calibração na

ausência de luz, representando a reflectância mínima, por meio da obstrução completa do orifício de medida da esfera de integração e do desligamento da fonte luminosa.

A reflectância espectral foi expressa como uma porcentagem relativa à reflectância máxima e mínima, calculada a partir da equação descrita por Xing e Baerdemaeker (2005):

$$\rho_{\lambda} = \left(\frac{S_{\lambda}^f - D_{\lambda}^{rmin}}{\rho_{\lambda}^{rmax} - D_{\lambda}^{rmin}} \right) 100 \quad (1)$$

em que:

ρ_{λ} = reflectância espectral da folha (%),

S_{λ}^f = intensidade da energia refletida na folha (adimensional),

D_{λ}^{rmin} = intensidade da energia refletida considerando a ausência de luz (adimensional), e

ρ_{λ}^{rmax} = reflectância espectral do padrão Spectralon™ (adimensional).

Todos estes parâmetros foram aplicados considerando cada comprimento de onda λ .

4.2.3 Medidas de pigmentos por métodos convencionais

Para a determinação do teor de clorofila macerou-se 1 g de amostra em 10 mL de água destilada, com o auxílio de almofariz e pistilo. O extrato foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando o seu volume com acetona 99,5% (pura para análise). Após 30 minutos de repouso no escuro e com o balão volumétrico envolvido em papel alumínio, realizou-se a filtração da amostra com papel de filtro quantitativo (com retenção de partículas de 4 – 7 μm), para dentro de outro balão volumétrico de 50 mL e seu volume foi completado com acetona. A leitura da absorbância do extrato foi efetuada em espectrofotômetro (700S, FEMTO, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 652 nm, utilizando uma cubeta de vidro com dois lados polidos de 7 cm³ (1,25 x 1,25 x 4,5 cm), a calibração foi feita com acetona. O teor de clorofila foi calculado utilizando a equação adotada por Engel e Poggiani (1991):

$$\text{Clorofila} = \left(\frac{A_{652} \times 1000 \times \frac{V}{1000W}}{34,5} \right) \times 100 \quad (2)$$

em que:

A_{652} = absorvância da amostra (em unidade de absorvância - u.a.),

V = volume final da amostra (extrato + acetona) (mL), e

W = peso da amostra (g).

Os resultados foram expressos em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de amostra fresca.

A determinação de carotenoides foi feita de acordo com a metodologia proposta por Rodriguez-Amaya (2001). Para a extração, 5 g de amostra foram maceradas com acetona em almofariz. Este extrato foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com progressivas adições de acetona até completar a descoloração. O extrato filtrado foi separado por partição com adição de éter de petróleo, 100% puro para análise, e água destilada. A absorvância do extrato foi medida por espectrofotometria a 450 nm no mesmo espectrofotômetro usado para clorofila, sendo a quantificação dos carotenoides calculada por meio da Equação 3.

$$\text{Carotenoides} = \frac{(A_{450} \times V \times 10^4)}{(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times P)} \quad (3)$$

em que:

A = absorvância da amostra (em unidade de absorvância - u.a.),

V = volume final da amostra (mL),

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção do β -caroteno em éter de petróleo (equivalente a 2592), e

P = peso da amostra (g).

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g } \text{g}^{-1}$.

As antocianinas foram determinadas pelo método do pH diferencial (Giusti e Wrolstad, 2001), utilizando-se a cianidina-3-glucosídeo como referência, que é a estrutura genérica da antocianina mais abundante em plantas de alface. As amostras foram maceradas e filtradas em tecido de organza, onde 1 mL deste conteúdo foi adicionado a metanol acidificado com HCl (0,1%) para a obtenção dos extratos. Após a centrifugação, o extrato foi diluído em soluções tampão (pH 1,0 e pH 4,5), separadamente, e após 30 minutos de estabilização no escuro, as absorvâncias das soluções foram medidas a 510 e 700 nm, com o auxílio do espectrofotômetro. As antocianinas foram quantificadas com base nas Equações 4 e 5.

$$\text{Absorbância} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (4)$$

$$\text{Antocianina} = \frac{A \times \text{PM} \times \text{Fo} \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (5)$$

em que:

A_{510} e A_{700} = absorbâncias da amostra (em unidade de absorbância - u.a.),

A = absorbância total calculada na Equação 4,

PM = peso molecular da cianidina-3-glucosídeo ($449,2 \text{ g mol}^{-1}$),

Fo = fator de diluição da amostra (26,67),

ϵ = coeficiente de absorvidade molar da cianidina-3-glucosídeo em solução tampão ($26.900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), e

L = caminho óptico da cubeta (1 cm).

Os resultados foram expressos em mg L^{-1} de cianidina-3-glucosídeo.

4.2.4 Análise de dados por regressão por mínimos quadrados parciais

A análise multivariada de regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Regression* - PLSR) foi aplicada com o propósito de construir modelos preditivos para os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas de alfaces relacionando dados espectrais pré-tratados com medidas de pigmentos determinadas por métodos convencionais. A análise por PLSR é uma técnica de modelagem matemática baseada em variáveis latentes (ou fatores). Neste trabalho, cada fator foi definido como uma combinação linear entre as variáveis originais das matrizes de reflectância espectral (X - variáveis independentes) e dos valores de clorofila, carotenoides ou antocianinas medidos em laboratório (Y - variáveis dependentes). O resultado foi uma equação linear descrita pela Equação 6 (Morgano et al., 2007):

$$Y_V = X_L b + Y_m \quad (6)$$

em que:

Y_V = valor predito da variável a ser avaliada (em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ para clorofila, $\mu\text{g g}^{-1}$ para carotenoides e mg L^{-1} para antocianinas),

X_L = matriz de variáveis correlacionadas, em que os comprimentos de onda originais são subtraídos de médias calculadas durante o processo de calibração (em nm),

b = vetor com os coeficientes da regressão obtidos durante a calibração, e

Y_m = valor médio das predições determinadas durante a calibração (mesmas unidades de Y_V).

A primeira variável latente corresponde ao maior autovalor do espaço X que descreve a máxima quantidade de variância das amostras. Quando a variância de um conjunto de amostras não puder ser explicada por apenas uma variável latente, uma segunda será utilizada, e assim por diante. Na regressão por PLS, determina-se um conjunto de variáveis latentes para os dados espectrais (*scores* de X) e um conjunto separado de vetores base para os dados das variáveis a serem analisadas (*scores* de Y), relacionando-os posteriormente (Cozzolino et al., 2011) a fim de obter uma relação linear. Neste processo também é criada uma matriz de pesos (ou *loadings*), que representa o peso que cada variável tem naquela combinação linear (Rocha, 2009).

As assinaturas espectrais das folhas medidas em laboratório foram submetidas à pré-tratamentos, sendo eles: correção de deformações (*detrending*), linearização (*smoothing*) e primeira derivada, avaliando-se qual a combinação de pré-tratamentos resultou em melhores predições na validação externa.

As variáveis independentes e dependentes foram divididas em dois conjuntos, sendo um para a calibração com validação cruzada e outro para a validação externa. Estes conjuntos foram organizados contendo dados representativos das amostras analisadas, sendo o conjunto de calibração constituído por 70% dos dados totais disponíveis (54 espectros) e o conjunto de validação constituído por 30% dos dados totais disponíveis (27 espectros). Cada assinatura espectral foi associada a uma medida de carotenoide, uma de clorofila e uma de antocianina.

O conjunto calibração foi utilizado para desenvolver o modelo. Já o conjunto de validação externa foi montado com medidas de amostras conhecidas, mas independentes das amostras usadas no conjunto calibração, sendo utilizado para avaliar o desempenho do modelo. Isto é, as amostras de validação externa foram tratadas como se seus valores não fossem conhecidos e utilizou-se a calibração construída com o conjunto de treinamento para estimá-los. Os valores estimados foram então comparados com os valores medidos em laboratório pelos métodos convencionais para avaliar o desempenho da calibração em amostras desconhecidas.

Durante a calibração, a validação cruzada foi empregada, deixando-se algumas amostras de fora da construção do modelo e, então, as utilizando para predição e cálculo de resíduos (erros associados). O processo foi repetido com outros subconjuntos de amostras de calibração até que todas as amostras foram utilizadas para predição. Na etapa seguinte, todos os resíduos foram combinados para computar a variância residual da validação cruzada e só então uma calibração final foi calculada com todas as amostras. A validação cruzada foi importante para ajustar os modelos e selecionar o número ótimo de variáveis latentes (Liu et al., 2014).

A capacidade preditiva do modelo foi avaliada por meio de índices estatísticos, sendo eles, a raiz do erro quadrático médio (REQM) (Equação 7), o erro médio de estimativa (EME) (Equação 8), o coeficiente de determinação (R^2) (Equação 9) e o erro relativo médio (ERM) das predições (Equação 10).

$$\text{REQM} = \sqrt{\sum (y_p - y_r)^2 / n} \quad (7)$$

$$\text{EME} = \sum (y_p - y_r) / n \quad (8)$$

$$R^2 = \frac{[\sum (y_p - \bar{y}_p)(y_r - \bar{y}_r)]^2}{\sum (y_p - \bar{y}_p)^2 \sum (y_r - \bar{y}_r)^2} \quad (9)$$

$$\text{ERM} = \left(\frac{y_p - y_r}{y_r} \right) \times 100 \quad (10)$$

em que:

y_r = valor de referência obtido pelo método convencional,

y_p = valor estimado pelo modelo,

n = número de amostras,

\bar{y}_r = média dos valores de referência obtidos pelo método convencional, e

\bar{y}_p = média dos valores estimados pelo modelo.

O número ótimo de variáveis latentes (VL) foi determinado considerando o valor mínimo de REQM após validação cruzada no conjunto de calibração, visando garantir uma boa generalização do modelo preditivo. Os outros parâmetros estatísticos foram aplicados à validação externa.

O *software* utilizado para aplicar os pré-tratamentos e para o desenvolvimento dos modelos foi o Scilab 5.5.1 (Scilab Enterprises, Orsay, França).

4.3 Resultados e Discussão

Os números ótimos de variáveis latentes utilizados para prever os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas de alfaces a partir dos modelos PLSR são apresentados na Tabela 1, juntamente com os erros quadráticos médios da calibração e da validação cruzada (REQMC e REQMVC).

Tabela 1. Número ótimo de variáveis latentes, raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração (REQMC) e raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada (REQMVC) utilizados no ajuste dos modelos PLSR para predição dos teores de clorofila, carotenoides e antocianina em alfaces.

Pigmento	Número de Variáveis Latentes	REQMC	REQMVC	Faixa de variação
Clorofila	2	8,9765	11,1030	50 - 85
Carotenoides	9	1,3827	2,2355	9 - 18
Antocianina	4	7,0494	10,0496	1 - 40

REQMC ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), REQMVC ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) e Faixa de variação ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

O uso de modelos com um número maior de variáveis latentes que o ideal resulta em superestimativa (*overfit*), aumentando o ruído e os erros de modelagem. Ao contrário, quando se utiliza modelos com um número de variáveis latentes inferior ao ideal, ocorrem problemas de subestimativa (*underfit*), em que a informação contida no conjunto de dados não é considerada na sua totalidade (Rocha, 2009; Morgano et al., 2007). Desta forma, as quantidades de variáveis latentes obtidas com o modelo PLSR possibilitaram descrever praticamente toda a variabilidade tanto dos dados da matriz X (dados de reflectância) como da matriz Y (valores de referência) utilizados na calibração. Este resultado depende muito do número de amostras usadas para desenvolver o modelo e, em geral, mais amostras originam previsões mais precisas (Naes et al., 2002; Cozzolino et al., 2009).

Outro fator que influencia nestes resultados é a aplicação ou não de pré-tratamentos nos espectros, que podem melhorar a calibração dos modelos, removendo eventuais ruídos e informações superpostas das variáveis de interesse, bem como de interferências (Morgano et al., 2007). Neste trabalho os melhores resultados foram obtidos aplicando-se a correção de deformações (*detrending*) aos espectros originais para análise de clorofila, a linearização

(*smoothing*) para análise de carotenoides e a primeira derivada para análise de antocianinas, não havendo a combinação de pré-tratamentos.

Alguns trabalhos avaliando o teor de pigmentos em alface por meio de métodos convencionais de análise, encontraram valores de clorofila variando de 30 a 50 mg 100g⁻¹ em alface lisa (Santos et al., 2001). Teores de carotenoides são relatados com variações de 11,3 a 19,7 mg 100g⁻¹ em alface crespa (Niizu e Rodriguez-Amaya, 2005) e de 9,9 a 25 mg 100g⁻¹ em alfaves crespas, lisas e roxas (Rodriguez-Amaya et al., 2008). Para antocianinas, existem trabalhos que encontraram os teores variando de 10 a 70 mg 100g⁻¹ em nove cultivares de alface, incluindo verdes e roxas (Gazula et al., 2007). Estas faixas de variações encontradas pelos autores são semelhantes com as obtidas neste trabalho.

O modelo de predição que requereu o maior número de variáveis latentes foi o de carotenoides. Por outro lado, foi este modelo o que apresentou menores valores de REQMC e REQMVC. Os valores de REQMC e REQMVC expressam a precisão do modelo de estimativa, fornecendo uma informação em relação à dispersão dos valores. Desta forma, quanto menor for o valor de REQMC, mais preciso será o modelo e menos dispersos estarão os dados. Entretanto, como este índice está relacionado com a unidade em que a propriedade é expressa, ele sempre deve ser avaliado, considerando-se também a faixa de valores verificada no conjunto de amostras (Tabela 1). Assim, tanto os valores de REQMC quanto os de REQMVC, podem ser considerados satisfatórios, uma vez que todos eles são baixos quando comparados às faixas de valores observados nas amostras utilizadas durante a calibração.

Os resultados obtidos neste trabalho são similares aos encontrados por outros autores que também utilizaram espectrometria e análise multivariada para estimar variação de pigmentos em produtos vegetais, obtendo resultados considerados eficazes para determinação de parâmetros de qualidade. Yu et al. (2014) propuseram um modelo para previsão de clorofila em folhas de cevada, utilizando três variáveis latentes, que é um valor muito próximo do encontrado neste trabalho. Os valores de REQMC e REQMVC obtidos por estes pesquisadores foram 141,1 mg 100g⁻¹ e 119,5 mg 100g⁻¹, respectivamente, sendo que os teores de clorofila das amostras variaram entre 251,2 e 1512,8 mg 100g⁻¹. Petisco et al. (2004), por meio de um modelo para prever o teor de clorofila em folhas de alface, encontraram um REQMC de 23 mg 100g⁻¹ e REQMCV de 35 mg 100g⁻¹, com sete variáveis latentes, para um conjunto de dados variando entre 39 e 460 mg 100g⁻¹. Yi et al. (2014) utilizaram nove variáveis latentes em um modelo para estimar o teor de carotenoides em

dossel de algodão, com um REQMC de $8,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. O número de variáveis latentes foi o mesmo encontrado neste trabalho para a predição do pigmento em folhas de alface, mas o REQMC encontrado para as folhas de alface foi menor. Entretanto, vale ressaltar que a faixa de valores de carotenoides estudados por Yi et al. (2014) variou de $25,6$ a $100,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, enquanto que, para a alface, as variações estiveram entre 9 e $18 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. Asner et al. (2015) desenvolveram um modelo para predizer o teor de clorofila e de carotenoides em dossel de uma floresta com diferentes espécies, em um conjunto de dados variando entre $265 - 853 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $69 - 184 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente. Eles encontraram cinco variáveis latentes para ambos os modelos e um REQMC de $84 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para clorofila e $16 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para carotenoides. Chen et al. (2015) estimando o teor de antocianinas em uvas por meio da reflectância espectral, após ter aplicado o mesmo pré-tratamento (primeira derivada) utilizado para as alfaces ao conjunto de dados, chegou a 13 variáveis latentes para o modelo, com um valor de REQMC de $0,14 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. Neste caso, os valores variaram de 20 a $140 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$.

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam os coeficientes de regressão (coeficientes B) obtidos com o número ótimo de variáveis latentes para os modelos PLSR de predição dos teores de clorofila, carotenoides e antocianinas, respectivamente. No modelo PLSR, os coeficientes B representam a contribuição de cada preditor (comprimento de onda) para o modelo. Quanto mais próximo de zero está o coeficiente, menor é a utilidade da banda para ser associada ao modelo, e conseqüentemente à variável de interesse (Yi et al., 2014). Assim, as bandas espectrais mais importantes são aquelas posicionadas graficamente nos picos e vales.

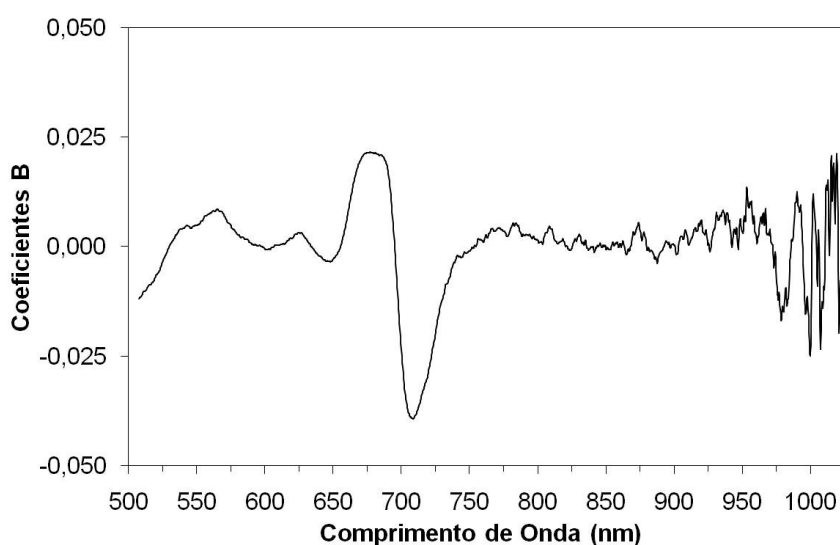


Figura 2. Coeficientes B para o modelo PLSR de predição do teor de clorofila.

Os coeficientes B obtidos no modelo para clorofila mostram que a sensibilidade máxima para a variação do pigmento se encontra na faixa espectral de 650 a 700 nm, onde foram identificados um pico e um vale. Taiz & Zeiger (2004) afirmam que a clorofila é o pigmento mais abundante no tecido vegetal, sendo suas maiores absorções verificadas nas regiões do azul (≈ 430 nm) e do vermelho (≈ 660 nm) do espectro. Na região do verde (≈ 550 nm), a clorofila é pouco eficiente em absorver, sendo a maior parte refletida, dando às plantas a sua coloração verde característica. A região do vermelho, próximo a 650 nm, é também mencionada como forte para a absorção da radiação pela clorofila por Nordey et al. (2014), Merzlyak et al. (2003) e Gitelson et al. (2001). Esta também é a região utilizada (652 nm) para quantificar o teor de clorofila pelo método laboratorial proposto por Engel e Poggiani (1991).

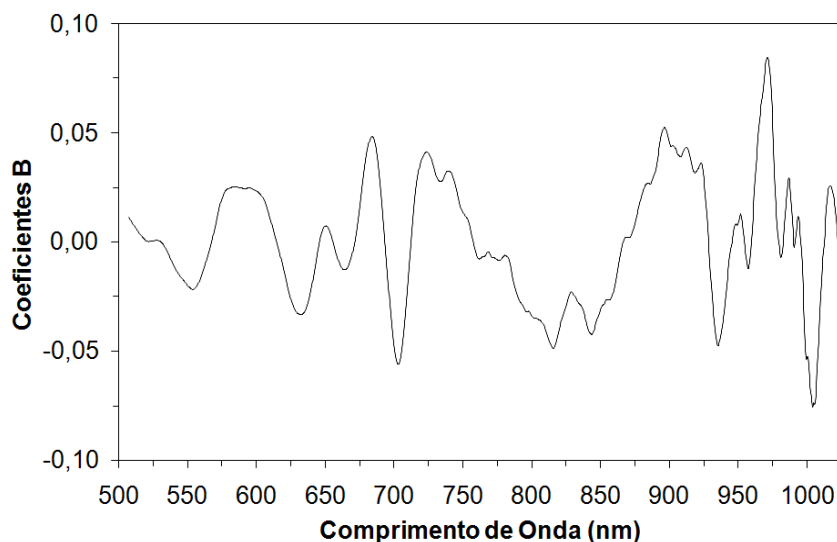


Figura 3. Coeficientes B para o modelo PLSR de predição do teor de carotenoides.

No modelo para carotenoides, quase todas as faixas do espectro contribuíram para representar as variações do pigmento. Ressalta-se, entretanto a formação de picos e vales nas regiões do laranja e do vermelho, com comprimentos de onda de 600 a 725 nm, que são regiões onde estes pigmentos refletem a radiação (Kira et al., 2015; Yi et al., 2014). Além disso, nas regiões acima de 950 nm também são identificados picos e vales de grande intensidade. De acordo com Rodriguez-Amaya (2001), a maior absorção da radiação pelos carotenoides ocorre na região de 400 – 500 nm, que não fez parte da região espectral utilizada

neste trabalho devido à presença de ruídos de considerável magnitude no início da faixa espectral de medida do equipamento.

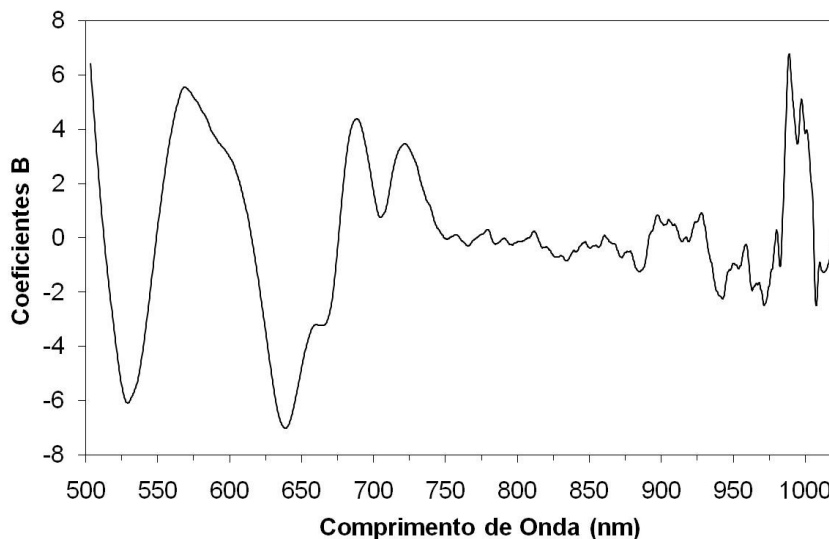


Figura 4. Coeficientes B para o modelo PLSR de predição do teor de antocianinas.

Para antocianinas, as principais oscilações se encontram na faixa espectral de 500 – 725 nm e próximo a 975 nm. A variação da reflectância entre 550 e 700 nm também foi associada às variações na absorção pela antocianina em trabalhos de Nordey et al. (2014), Merzlyak et al. (2003) e Gitelson et al. (2001).

Os resultados da validação externa podem ser constatados nas Figuras 5, 6 e 7, juntamente com os valores dos coeficientes de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio da validação externa (REQM), erro médio de estimativa (EME) e erro relativo médio (ERM) para as predições dos teores de clorofila, carotenoides e antocianinas de alfaces, respectivamente.

Quampah et al. (2012), Moghimi et al. (2010) e Liu et al. (2009) consideram que os melhores modelos para a predição apresentam altos valores de R^2 e valores baixos para REQM e EME. O valor de R^2 representa a proporção da variação total dos valores medidos que pode ser explicada pelo modelo de estimativa proposto. Estes valores podem variar de 0 (zero) a 1 (um), sendo que, quanto mais próximos de 1 (um), melhor o ajuste do modelo. Já o EME representa o erro sistemático entre os valores preditos e os valores medidos, sendo que os valores próximos a zero indicam modelos mais acurados (Matsimbe et al., 2015). Valores negativos do EME indicam subestimativa, enquanto que, valores positivos indicam

superestimativa dos valores observados. Para a análise do EME, também é importante considerar a faixa de variação das amostras analisadas.

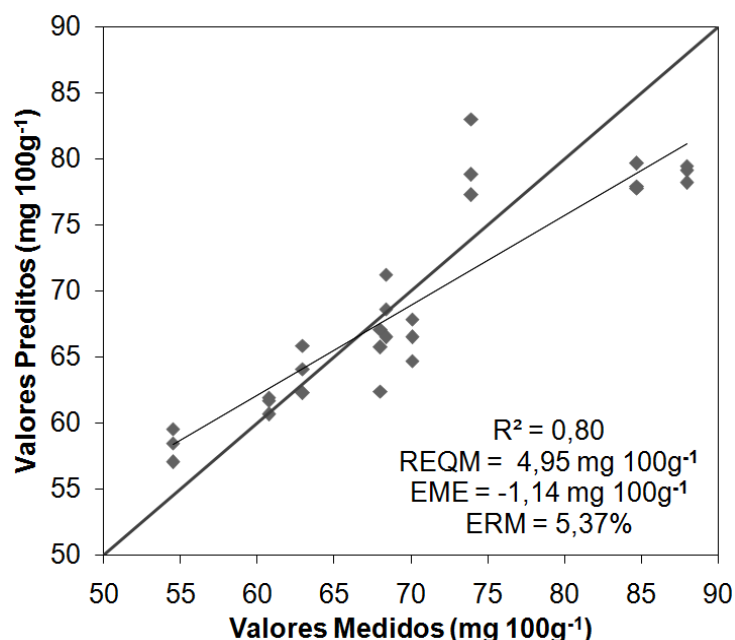


Figura 5. Validação externa para o modelo PLSR de predição do teor de clorofila de alfaces.

Nas estimativas do teor de clorofila para as folhas de alface, verificou-se que, aproximadamente, 80% dos valores medidos pelo método convencional foram adequadamente representados pelo modelo, que na maioria dos casos, subestimou ligeiramente os valores reais. Constatou-se também, baixa dispersão entre os dados preditos e medidos, podendo-se considerar que o modelo foi preciso nas estimativas com dados independentes da calibração. Os valores de REQM e EME correspondem a 14% e 3%, respectivamente, da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados para clorofila. Kira et al. (2015) estimando, por meio de PLSR, o conteúdo de clorofila em três espécies vegetais, alcançaram um R^2 superior (0,97) e um EME de $-6,2 \text{ mg m}^{-2}$, correspondendo a 1% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados, indicando que o modelo desenvolvido também subestimou os valores reais, em suas estimativas com dados independentes da calibração, porém o EME foi menor ao obtido neste trabalho. Em contrapartida, Yu et al. (2014) encontraram um R^2 inferior (0,73) no modelo para predição do teor de clorofila em folha de cevada.

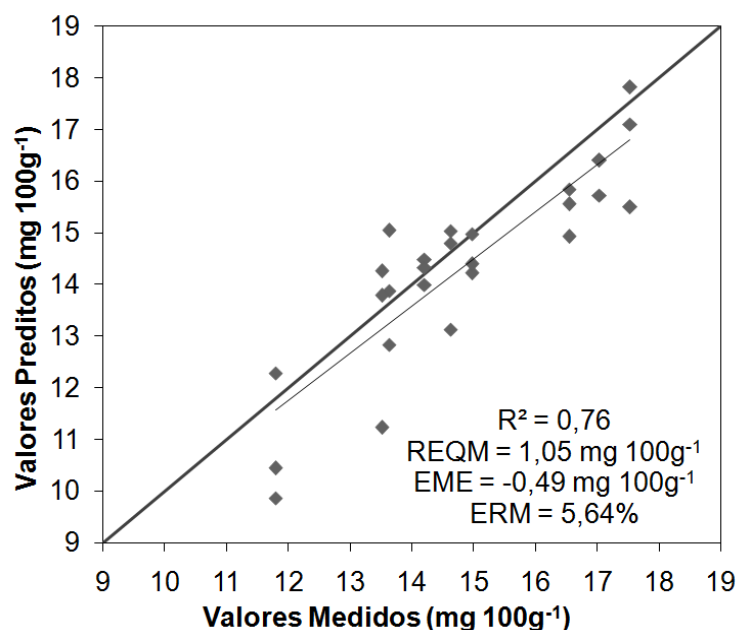


Figura 6. Validação externa para o modelo PLSR de predição do teor de carotenoides de alfaces.

O modelo para predição do teor de carotenoides para as folhas de alface foi o que apresentou menor R^2 para a validação externa em relação aos de clorofila e antocianinas. Os valores de REQM e EME ficaram próximos aos obtidos nos outros dois modelos, correspondendo a 12% e 5%, respectivamente, da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados para carotenoides. O EME também subestimou ligeiramente os valores reais e sendo considerado preciso nas estimativas com dados independentes da calibração. Comparando-se os resultados obtidos com os verificados por Kira et al. (2015), estimando, por meio de PLSR, o conteúdo de carotenoides em três espécies vegetais ($R^2 = 0,91$ e $EME = -4,5 \text{ mg m}^{-2}$, correspondendo a 4% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados), o modelo proposto para as folhas de alface apresentou menor R^2 e um EME parecido. Yi et al. (2014) obteve um R^2 muito inferior (0,45) e o EME de $6,8 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, correspondendo a 9% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados do modelo de predição de carotenoides em dossel de algodão, valor superior ao encontrado neste trabalho.

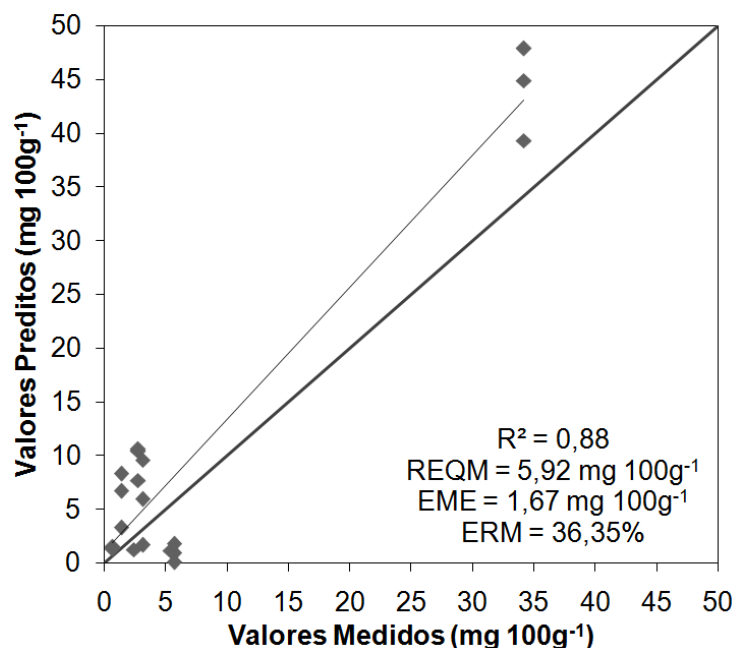


Figura 7. Validação externa para o modelo PLSR de predição do teor de antocianinas de alfases.

O modelo para predição do teor de antocianinas para as folhas de alface foi o que apresentou maior R^2 para a validação externa em comparação com os demais deste trabalho. E os valores de REQM e EME, correspondem a 15% e 4%, respectivamente, da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados para antocianinas. O EME obtido neste modelo foi único a superestimar os valores reais. Ainda assim, este modelo pode ser considerado preciso quando comparado a outros modelos semelhantes para a predição de antocianinas, como Janik et al. (2007) que encontraram, para o modelo com uvas, um R^2 de 0,84 e EME igual a $-111 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, que corresponde a 37% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados.

Na comparação entre os modelos de estimativa, é recomendável avaliar também o erro relativo médio (ERM), pois pode ser comparado a outros trabalhos independentemente da unidade de medida utilizada e das faixas de valores, para se avaliar a exatidão das predições. No caso dos modelos propostos, os valores de clorofila variaram de 50 a $85 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, e apresentaram um erro relativo médio na validação externa de 5,37%. Já os valores de carotenoides variaram de 9 a $18 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, gerando erro relativo médio de 5,64%. Finalmente, os valores de antocianina variaram entre 1 e $40 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, sendo o erro relativo médio da validação externa igual a 36,35%.

Os valores de erro relativo encontrados neste trabalho para os teores de clorofila e carotenoides revelam grande potencial da aplicação das técnicas de modelagem propostas para estes pigmentos em alfaces, principalmente quando comparados a outros dados de literatura que apresentaram erros relativos bem mais altos. Yi et al. (2014), por exemplo, obtiveram erro relativo igual a 14,69% na estimativa de carotenoides em dossel de algodão.

O maior erro relativo associado às estimativas de antocianinas sugere que é possível melhorar o modelo, mediante análises com amostras contendo teores de antocianina nas faixas de valores inexistentes neste trabalho (entre 10 e 30 mg 100g⁻¹). Outros fatores a serem considerados são as características ópticas das antocianinas, que segundo Castañeda-Ovando et al. (2009), são afetadas por diversas variáveis, como pH, temperatura, luminosidade, presença de enzimas, flavonoides e íons metálicos, devendo a modelagem deste pigmento ser baseada em amostras representativas destas variações.

4.4 Conclusões

Os resultados demonstraram a viabilidade de estimar os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas em alfaces com folhas lisas ou crespas e com coloração verde ou roxa, utilizando reflectância espectral na faixa de 500 – 1.023 nm juntamente com a análise multivariada por mínimos quadrados parciais. O modelo para a previsão dos pigmentos realizado com base em análise PLSR obteve altos coeficientes de determinação e baixos erros médios de estimativa na validação externa, confirmando uma alta correlação entre os dados espectrais e os teores destes pigmentos em alfaces. O uso de pré-tratamentos de dados espectrais foi aplicada ao espectro original com a finalidade de atingir um elevado desempenho dos modelos preditivos. Os pré-tratamentos que geraram os melhores resultados neste trabalho foram: a correção de deformações (*detrending*) para análise de clorofila, a linearização (*smoothing*) para análise de carotenoides e a primeira derivada para análise de antocianinas.

O uso da espectrometria se confirma como uma maneira rápida, não destrutiva e eficiente para determinar o teor de pigmentos em vegetais, apresentando-se como uma alternativa aos métodos convencionais.

4.6 Referências Bibliográficas

- Allan, A.C., Hellens, R.P., Laing, W.A., 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*, 13, 99–102.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G., 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728.
- Asner, G.P., Martin, R.E., Anderson, C.B., Knapp, D.E., 2015. Quantifying forest canopy traits: Imaging spectroscopy versus field survey. *Remote Sensing of Environment*, 158, 15–27.
- Batista, M.A., Sant'Ana, H.M.P., Chaves, J.B.P., Moraes, F.A., 2006. Carotenos e provitamina A em bortalha e ervas aromáticas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais, durante as quatro estações do ano. *Acta Scientiarum Health Sciences*, 28(1), 93-100.
- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A., 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 98–111.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E.G., Hall, R.D., Bovy, A.G., Luo, J., 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, 26, 1301–1308.
- Carvalho, P.G.B., Machado, C.M.M., Moretti, C.L., Fonseca, M.E.N., 2006. Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira*, 24(4), 397-404.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.D.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Chen, S., Zhang, F., Ning, J., Liu, X., Zhang, Z., Yang, S., 2015. Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 172, 788–793.
- Chon, S., Boo, H., Heo, B., Gorinstein, S., 2012. Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(1), 45–48.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Shah, N., Smith, P., 2009. Multivariate methods in grape and wine analysis. *International Journal of Wine Research*, 1, 123–130.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Shah, N., Smith, P., 2011. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. *Food Research International*, 44, 1888–1896.
- Cunha Jr., A.P., Cunha, V.P.P., Silveira Jr., L., Martin, A.A., 2003. Modelo de calibração da concentração de metilmetacrilato em solução aquosa utilizando espectroscopia de absorção no ultravioleta. *Química Nova*, 26(6), 850-854.
- Do, C.B., Cormier, F., 1991. Accumulation of peonidin-3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24, 49–54.
- Engel, V.L., Poggiani, F., 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 3(1), 39 - 45.
- Gazula, A., Kleinhenz, M.D., Scheerens, J.C., Ling, P.P., 2007. Anthocyanin levels in nine lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars: Influence of planting date and relations among analytic, instrumented, and visual assessments of color. *Hort Science*, 42(2), 232–238.

- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., 2001. Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochemistry and Photobiology*, 74, 38 - 45.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2001. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: R.E. Wrolstad (Ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
- Gould, K., Davies, K., Winefield, C., 2009. *Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications*. 90p. New York: Springer Science and Business Media, LLC.
- Grotewold, E., 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 761–780.
- Guo, J., Wang, M.H., 2010. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 62, 1–8.
- Huang, C., Yu, B., Teng, Y., Su, J., Shu, Q., Cheng, Z., Zeng, L., 2009. Effects of fruit bagging on coloring and related physiology, and qualities of red Chinese sand pears during fruit maturation. *Scientia Horticulturae*, 121, 149–158.
- IAL - Instituto Adolfo Lutz, 2008. Zenebon, O., Pascuet, N.S. & Tiglia, P. (Coordenadores). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 1020p. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- Janik, L.J., Cozzolino, D., Damberg, R., Cynkar, W., Gishen, M., 2007. The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 594, 107 – 118.
- Kira, O., Linker, R., Gitelson, A., 2015. Non-destructive estimation of foliar chlorophyll and carotenoid contents: Focus on informative spectral bands. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 38, 251–260.
- Li, D., Luo, Z., Mou, W., Wang, Y., Ying, T., Mao, L., 2014. ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 90, 56-62.
- Liu, F., Jiang, Y., He, Y., 2009. Variable selection in visible/near infrared spectra for linear and nonlinear calibrations: A case study to determine soluble solids content of beer. *Analytica Chimica Acta*, 634(1), 45-52.
- Liu, D., Sun, D.W., Qu, J.H., Zeng, X.A., Pu, H.B., Ma, J., 2014. Feasibility of using hyperspectral imaging to predict moisture content of porcine meat during salting process. *Food Chemistry*, 152, 197–204.
- Lo Piero, A.R., Puglisi, I., Rapisarda, P., Petrone, G., 2005. Anthocyanins accumulation and related gene expression in red orange fruit Induced by low temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9083–9088.
- Maiani, G., Periago Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorenzo, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., et al., 2009. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 194–218.
- Matsimbe, S.F.S., Motoike, S.Y., Pinto, F.A.C., Leite, H.G., Marcatti, G.E., 2015. Prediction of oil content in the mesocarp of fruit from the macauba palm using spectrometry. *Revista Ciência Agronômica*, 46(1), 21-28.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Gitelson, A.A., 2003. Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 197–211.

- Mes, P.J., Boches, P., Myers, J.R., Durst, R., 2008. Characterization of tomatoes expressing anthocyanin in the fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133, 262–269.
- Moghimi, A., Aghkhani, M.H., Sazgarnia, A., Sarmad, M., 2010. Vis/NIR spectroscopy and chemometrics for the prediction of soluble solids content and acidity (pH) of kiwi fruit. *Biosystems Engineering*, 106(3), 295-302.
- Morgano, M.A., Faria, C.G., Ferrão, M.F., Ferreira, M.M.C., 2007. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. *Química Nova*, 30(2), 346-350.
- Mori, T., Sakurai, M., 1994. Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; effects of sugar and nitrogen. *Journal of Food Science*, 59, 588–593.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T., 2002. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. 420p. Chichester, UK: NIR Publications.
- Nicolle, C., Cardinault, N., Gueu, E., Jaffrelo, L., Rock, E., Mazur, A., Amouroux, P., Rémésy, C., 2004a. Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clinical Nutrition*, 23, 605–614.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P., Rémésy, C., 2004b. Characterization and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 2061-2069.
- Niizu, P.Y., Rodriguez-Amaya, D.B., 2005. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 739–749.
- Nordey, T., Joas, J., Davrieux, F., Génard, M., Léchaudel, M., 2014. Non-destructive prediction of color and pigment contents in mango peel. *Scientia Horticulturae*, 171, 37–44.
- Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C., 2010. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1679–1703.
- Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez De Aldan, B.R., Zabalgogezcoa, I., García, L., García-Ciudad, A., 2004. Estimación rápida de clorofila en hojas frescas de alfalfa mediante NIRS usando sonda de fibra óptica. *Pastos y Ganadería Extensiva*, 467–472.
- Quampah, A., Huang, Z.R., Wu, J.G., Liu, H.Y., Li, J.R., Zhu, S.J., Shi, C.H., 2012. Estimation of oil content and fatty acid composition in Cotton seed kernel powder using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 89(4), 567-575.
- Rocha, J.T.C., 2009. Emprego de espectrometria no infravermelho e métodos quimiométricos para a identificação e quantificação de petróleos a partir de misturas de frações de diesel. 122p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo.
- Rocha, D.S., Reed, E., 2014. Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde. *Estudos*, 41(1), 76-85.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. 71p. Campinas: UNICAMP.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M., Amaya-Farfan, J. (Eds.), 2008. *Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos*. 100p. Brasília: MMA/SBF.

- Santos, R.H.S., Silva, F., Casali, V.W.D., Condé, A.R., 2001. Conservação pós colheita de alface cultivada com composto orgânico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(3), 521-525.
- Sivankalyani, V., Feygenberg, O., Diskin, S., Wright, B., Alkan, N., 2016. Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 132-139.
- Spencer, J.P.E., 2010. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, 104, S40–S47.
- Sun, Y., Qian, M., Wu, R., Niu, Q., Teng, Y., Zhang, D., 2014. Postharvest pigmentation in red Chinese sand pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in response to optimum light and temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 64-71.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Fisiologia Vegetal*. 722p. 3 ed, Porto Alegre: Artmed.
- Thurnham, D.I., 2007. Bioequivalence of b-carotene and retinol. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 87(1), 13-39.
- Ubi, B.E., Honda, C., Bessho, H., Kondo, S., Wada, M., Kobayashi, S., Moriguchi, T., 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. *Plant Science*, 170, 571–578.
- Vieira, E.L., Souza, G.S., Santos, A.R., Silva, J.S., 2010. *Manual de Fisiologia Vegetal*. 230p. São Luis: EDUFMA.
- Xing, J., Baerdemaeker, J.D., 2005. Bruise detection on ‘Jonagold’ apples using hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 152-162.
- Yi, Q., Jiapaer, G., Chen, J., Bao, A., Wang, F., 2014. Different units of measurement of carotenoids estimation in cotton using hyperspectral indices and partial least square regression. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 91, 72–84.
- Yu, K., Lenz-Wiedemann, V., Chen, X., Bareth, G., 2014. Estimating leaf chlorophyll of barley at different growth stages using spectral indices to reduce soil background and canopy structure effects. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 97, 58–77.
- Zhou, B., Li, Y.H., Xu, Z.R., Yan, H.F., Homma, S., Kawabata, S., 2007. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *Journal of Experimental Botany*, 58, 1771–1781.

5. ESTIMATIVA DE CLOROFILA, CAROTENOIDES E ANTOCIANINAS EM ALFACES CULTIVADAS EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO POR MEIO DE ÍNDICES ESPECTRAIS

Artigo escrito conforme as normas do periódico *Food Chemistry*

RESUMO - Índices espectrais têm sido muito utilizados na predição de pigmentos vegetais de forma não destrutiva, por meio dos dados de reflectância espectral. O objetivo com este trabalho foi estimar os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas em três cultivares de alface (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) cultivadas sob os sistemas orgânico, hidropônico e sem agrotóxicos (SAT), com base em índices espectrais. Os dados de reflectância espectral das folhas de alface foram utilizados para a calibração dos modelos baseados no Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI), no Índice de Razão Simples (SRI) e no Índice de Diferença Espectral (DSI), utilizando ainda os ajustes exponencial, linear, potência e logarítmico. Foram determinados os coeficientes de correlação (r) da calibração e da validação externa, além do erro médio de estimativa (EME), o índice de concordância de Willmott (d) e a raiz do erro quadrático médio (REQM) da validação externa. Os modelos apresentaram r superior a 0,61 na validação externa, REQM abaixo de 9,15, 1,44 e 4,55 mg 100g⁻¹ e EME abaixo de -4,01, -0,74 e 0,88 mg 100g⁻¹ para clorofila, carotenoides e antocianinas, respectivamente, mostrando a viabilidade de estimar estes pigmentos por meio de índices espectrais. Os modelos baseados no DSI e que utilizaram o ajuste exponencial apresentaram os melhores desempenhos.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., pigmentos, reflectância espectral, espectrometria.

ESTIMATE OF CHLOROPHYL, CAROTENOIDS AND ANTHOCYANINS IN LETTUCES CULTIVATED IN DIFFERENT FARMING SYSTEMS BY SPECTRAL INDICES

ABSTRACT - Spectral indices have long been used for non-destructively predicting plant pigments by spectral reflectance data. The objective of this study was to estimate the chlorophyll, carotenoid and anthocyanin contents in three lettuce cultivars (Crystal, Regina

2000 and Mimosa) grown under the organic, hydroponic and alternative farming systems based on spectral indices. The spectral reflectance data of the lettuce leaves were used for calibrating models based on the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) the Simple Ratio Index (SRI) and the Difference Spectral Index (DSI), using the exponential, linear, logarithm and power fits. The correlation coefficients (r) of calibration and external validation, beyond the mean bias error (BIAS), the Wilmott index of agreement (d) and the root mean square error (RMSE) of external validation were determined. All the models presented r above 0.61 in external validation, RMSE smaller than 9.15, 1.44 and 4.55 mg 100g⁻¹ and BIAS smaller than -4.01, -0.74 and 0.88 mg 100g⁻¹ to chlorophyll, carotenoid, and anthocyanin, respectively. Results indicated the feasibility of estimating lettuce pigments based on spectral indices. The models based on DSI using exponential fit showed the best results.

Keywords: *Lactuca sativa* L., pigments, spectral reflectance, spectrometry.

5.1 Introdução

No Brasil, a alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais cultivadas e consumidas (IBGE, 2011), sendo uma fonte rica em vitaminas A, B1, B2, C e E; sais minerais como ferro e cálcio, além de compostos bioativos, como os carotenoides (Llorach et al., 2008). Adicionalmente, possui grande quantidade de água nos seus tecidos, reduzido teor de lipídeos e baixo conteúdo energético (Nicolle et al., 2004a, 2004b).

As cultivares de alface possuem diferentes colorações das folhas, decorrentes da presença de pigmentos vegetais como a clorofila, os carotenoides e as antocianinas. Estes pigmentos exercem importantes funções fisiológicas nas plantas, envolvendo-se nos processos fotossintéticos, nas defesas contra o estresse luminoso, evitando a formação de espécies reativas de oxigênio, dentre outras (Taiz e Zeiger, 2004; Vieira et al., 2010).

A clorofila é fundamental no processo de absorção de luz utilizada na fotossíntese, sendo descrita como o pigmento mais abundante nos tecidos vegetais (Taiz e Zeiger, 2004). Os carotenoides são pigmentos que protegem a molécula de clorofila contra a foto-oxidação em condições de luz excessiva (Rodriguez-Amaya, 2001), além de possuírem ação antioxidante (Maiani et al., 2009; Carvalho et al., 2006) e apresentarem atividade pró-

vitamínica A (Rodríguez-Amaya et al., 2008; Thurnham, 2007, Batista et al., 2006). As antocianinas são pigmentos produzidos através do metabolismo secundário das plantas, desempenhando um papel importante devido à sua atividade antioxidante e trazendo vários benefícios para a saúde humana (Wang et al., 2000; Kang et al., 2003; Hou, 2003; Lila, 2004; Chon et al., 2012).

As tecnologias desenvolvidas para a realização de análises químicas de alimentos têm se tornado mais sofisticadas a cada dia, com o intuito de quantificar corretamente as concentrações dos seus constituintes, diminuir o tempo despendido nas realizações destas análises, assegurar a qualidade dos resultados, além de garantir a biossegurança nas atividades laboratoriais (IAL, 2008). O uso da espectrometria, por exemplo, tem gerado bons resultados neste tipo de análises (Richardson et al., 2002).

A análise do comportamento espectral de uma amostra vegetal é uma forma não destrutiva de se extrair um grande número de informações (Cozzolino et al., 2011). Com estes dados é possível quantificar os pigmentos contidos na vegetação (Gitelson et al., 2006; Wu et al., 2008; Schlemmer et al., 2013; Dobrota et al., 2015), o conteúdo de água (Seelig et al., 2008; Féret et al., 2011; Rallo et al., 2014), o conteúdo de nutrientes (Zhao et al., 2005; Li et al., 2014; Nigon et al., 2015), sólidos solúveis totais (Stagakis et al., 2012), o estágio de maturação (Merzlyak et al., 1999; Jha et al., 2014), presença de doenças e injúrias (Yao et al., 2012; Cao et al., 2013; Mahlein et al., 2013), dentre outros atributos.

Os índices espectrais são muito utilizados como forma de extrair informações de produtos biológicos, por meio da combinação de dois ou mais comprimentos de onda mais representativos para alguma propriedade da amostra estudada (Liesenberg et al., 2007). Dentre eles destacam-se o Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (*Normalized Difference Vegetation Index* - NDVI), o Índice de Razão Simples (*Simple Ratio Index* - SRI) e o Índice de Diferença Espectral (*Difference Spectral Index* - DSI) que são utilizados para estimar o teor de pigmentos (Sims e Gamon, 2002; le Maire et al., 2004; Garriga et al., 2014; Dobrota et al., 2015), a concentração de nutrientes (Nigon et al., 2015; Schlemmer et al., 2013) e o conteúdo de água (Rallo et al., 2014) da vegetação.

A maior parte dos índices espectrais empregados para estimar atributos de produtos biológicos utiliza informações de reflectâncias contidas nas regiões do vermelho e do infravermelho próximo do espectro. Isso ocorre porque estas regiões expressam mais de 90% da variação da resposta espectral da vegetação. Desta forma, estes índices realçam o

comportamento espectral da vegetação, correlacionando-os com os parâmetros biofísicos da mesma (Rosendo, 2005). Mas, os mesmos índices podem ser aplicados com comprimentos de onda correspondentes a outras regiões do espectro.

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estimar os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas em alface, com base em índices espectrais.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Cultivo de alfaces

Neste trabalho, foram utilizadas alfaces das cultivares Cristal (folhas crespas e verdes), Regina 2000 (folhas lisas e verdes) e Mimosa (folhas crespas e roxas) cultivadas sob os sistemas orgânico, hidropônico e SAT (sem agrotóxico), para que os modelos desenvolvidos sejam eficientes em determinar pigmentos em amostras heterogêneas. O cultivo foi no município de Capim Branco, Estado de Minas Gerais, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude 19°32'S, longitude 44°07'W e altitude de 757 m. O clima da região é caracterizado como tropical chuvoso, com inverno seco e estação chuvosa, predominantemente, de outubro a março. De acordo com Alvares et al. (2013), o clima é mesotérmico úmido (Cwa), segundo a classificação de Köppen.

No sistema orgânico, as sementes foram plantadas em bandejas de polipropileno contendo composto orgânico feito a partir de esterco bovino e restos vegetais como substrato. Após 45 dias, as mudas foram transplantadas para canteiros, que foram feitos a partir da mistura de solo com o mesmo composto utilizado inicialmente. Ao 20º dia após o transplante das mudas, foi aplicada calda sulfocálcica (50% de enxofre e 5% de cálcio) a 1%. O experimento foi montado sob uma cobertura de polietileno de baixa densidade (150 µm) com dois anos de uso. A irrigação e a capina das plantas espontâneas foram realizadas conforme a necessidade da cultura. O delineamento utilizado neste sistema foi o inteiramente casualizado composto por três blocos, onde cada um foi subdividido para dispor as três cultivares (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) aleatoriamente. Cada bloco foi composto por seis linhas de cultivo espaçadas em 0,2 m, contendo cinco plantas por linha. Assim, totalizou-se 30 plantas em cada bloco, sendo 10 de cada cultivar.

No sistema hidropônico, as mudas foram cultivadas em espuma fenólica e após 15 dias foram transplantadas para perfis hidropônicos dispostos em bancadas. Na parte interna dos perfis hidropônicos, foi aplicada uma lâmina de solução nutritiva composta por água, fosfato monoamônio, nitrato de potássio, nitrato de cálcio, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio, micronutrientes (Mn, Zn e Bo) e Ferro, com condutividade elétrica variando de 1,0 a 1,5 dS m⁻¹, que circulava periodicamente durante 15 minutos e parava por igual período. Este sistema de cultivo foi montado no interior de ambiente protegido, revestido com filme plástico de polietileno de baixa densidade (150 µm). Abaixo desta cobertura plástica, foi instalada uma cortina horizontal de malha aluminizada, que bloqueia parcialmente a entrada de radiação solar (50% de abertura). O controle de pragas foi realizado com o uso de iscas e lâmpadas dispostas em vários pontos dentro do ambiente de cultivo. O delineamento experimental foi o mesmo utilizado no sistema orgânico. Cada bloco foi composto por seis canais de cultivo espaçados em 0,20 m, contendo cinco plantas em cada canal, totalizando 30 plantas em cada bloco, sendo 10 de cada cultivar.

No sistema de cultivo sem agrotóxicos (SAT), também denominado organo-mineral, a semeadura foi realizada diretamente nos canteiros, que foram feitos a partir da mistura de solo e composto orgânico de esterco bovino e restos vegetais, além da realização da adubação mineral com o fertilizante granulado NPK 4-14-8. Após a germinação, foi realizado um raleio para que o espaçamento entre as plantas favorecesse o seu melhor desenvolvimento. O cultivo neste sistema ocorreu a céu aberto, sem o uso de cobertura. A irrigação e a capina das plantas espontâneas foram realizadas conforme a necessidade da cultura. Não foi necessária a aplicação de nenhum produto para o controle de pragas e doenças. O delineamento experimental foi o mesmo utilizado nos outros sistemas, com um plantio de 10 linhas espaçadas em 0,2 m, contendo seis plantas por linha. Assim, totalizou-se 60 plantas em cada bloco, sendo 20 de cada cultivar.

A amostragem foi realizada da mesma forma em todos os sistemas de cultivo, escolhendo-se aleatoriamente dentro de cada bloco uma planta de cada cultivar, desprezando as cultivadas nas bordaduras. Desta forma, em cada sistema de cultivo, utilizou-se um total de nove plantas. A colheita foi realizada sempre no período da manhã e as alfaces foram transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Engenharia Agrícola, situado na Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, a

22 km da área experimental, onde passaram por limpeza em água corrente para a remoção de sujidades.

5.2.2 Medidas de reflectância espectral

Para as medidas de espectrometria, foram destacadas três folhas aleatoriamente de cada planta colhida, sendo realizada uma medida em cada folha, gerando um total de 81 espectros de reflectância (3 sistemas de cultivo x 3 cultivares x 3 plantas x 3 folhas).

Na obtenção da assinatura espectral de cada folha de alface foi usado um espectrômetro portátil (JAZ-EL350, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA) conectado a um computador portátil. O espectrômetro foi acoplado a uma esfera de integração (ISP-REF, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA) por meio de fibra ótica (300 μm), que possui internamente uma fonte luminosa artificial Vis/NIR.

As medidas foram realizadas posicionando o terço superior da face adaxial da folha no orifício da esfera de integração, evitando-se a nervura central e as bordas. Em função da folha de alface ser muito delgada, foi utilizada uma superfície de coloração preta fosca para evitar a contribuição da reflexão de luz posterior à sua transmissão pela folha. Neste intuito, a folha de alface foi posicionada entre a superfície preta fosca e o orifício de medida da esfera integradora.

O espectrômetro foi pré-configurado para capturar e armazenar dados de reflectância de 500 a 1.023 nm, com resolução espectral de 0,36 nm, por meio do *software* Spectra Suite[®] (Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA).

Foi considerado um intervalo de tempo (≈ 10 min) para o adequado aquecimento da fonte de luz antes do início das medidas, assim como para a calibração do equipamento. Esta calibração correspondeu à aquisição de reflectância do padrão de reflectância difusa com Spectralon[®] (WS-1, Ocean Optics, Dunedin, Florida, EUA), representando a reflectância máxima. Logo em seguida, procedeu-se a calibração na ausência de luz, representando a reflectância mínima, por meio da obstrução completa do orifício de medida da esfera de integração e do desligamento da fonte luminosa.

A reflectância espectral foi expressa como uma percentagem relativa à reflectância máxima e mínima, calculada a partir da equação descrita por Xing e Baerdemaeker (2005):

$$\rho_{\lambda} = \left(\frac{S_{\lambda}^f - D_{\lambda}^{rm\ in}}{\rho_{\lambda}^{rm\ \acute{a}x} - D_{\lambda}^{rm\ in}} \right) 100 \quad (1)$$

em que:

ρ_{λ} = reflectância espectral da folha (%),

S_{λ}^f = intensidade da energia refletida pela folha (adimensional),

$D_{\lambda}^{rm\ in}$ = intensidade da energia refletida considerando a ausência de luz (adimensional), e

$\rho_{\lambda}^{rm\ \acute{a}x}$ = reflectância espectral do padrão Spectralon™ (adimensional).

Todos estes parâmetros foram aplicados considerando-se cada comprimento de onda (λ).

5.2.3 Medidas de pigmentos por métodos convencionais

Para a determinação do teor de clorofila nas folhas de alface, macerou-se 1 g de amostra fresca em 10 mL de água destilada, com auxílio de almofariz e pistilo. O extrato foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando o seu volume com acetona 99,5% (pura para análise). Após 30 minutos de repouso no escuro e com o balão volumétrico envolvido em papel alumínio, realizou-se a filtração da amostra com papel de filtro quantitativo (retenção de partículas de 4 a 7 μ m), para dentro de outro balão volumétrico de 50 mL e seu volume foi completado com acetona. A leitura da absorbância do extrato foi efetuada em espectrofotômetro (700S, FEMTO, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 652 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com dois lados polidos de 7 cm³ (1,25 x 1,25 x 4,5 cm), sendo a calibração foi feita com acetona. O teor de clorofila foi calculado utilizando-se a equação adotada por Engel e Poggiani (1991).

$$\text{Clorofila} = \left(\frac{A_{652} \times 1000 \times \frac{V}{1000 W}}{34,5} \right) \times 100 \quad (2)$$

em que:

A_{652} = absorbância da amostra (em unidade de absorbância - u.a.),

V = volume final da amostra (extrato + acetona) (mL), e

W = peso da amostra (g).

Os resultados foram expressos em mg 100g⁻¹.

A determinação de carotenoides nas folhas de alface foi feita de acordo com a metodologia proposta por Rodriguez-Amaya (2001). Para a extração, 5 g de amostra fresca foram maceradas com acetona em almofariz. Este extrato foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com progressivas adições de acetona até completar a descoloração. O extrato filtrado foi separado por partição com adição de éter de petróleo (puro para análise) e água destilada. A absorbância do extrato foi medida por espectrofotometria a 450 nm no mesmo espectrofotômetro usado para clorofila, sendo a quantificação dos carotenoides calculada por meio da Equação 3.

$$\text{Carotenoides} = \frac{(A \times V \times 10^4)}{(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times P)} \quad (3)$$

em que:

A = absorbância da amostra (em unidade de absorbância - u.a.),

V = volume final da amostra (mL),

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção do β -caroteno em éter de petróleo (equivalente a 2.592), e

P = peso da amostra (g).

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$.

As antocianinas foram determinadas pelo método do pH diferencial (Giusti e Wrolstad, 2001), utilizando a cianidina-3-glucosídeo como referência, que é a estrutura genérica da antocianina mais abundante em plantas de alface. As amostras foram maceradas e filtradas em tecido de organza, sendo que 1 mL deste conteúdo foi adicionado a metanol acidificado com HCl (0,1%) para a obtenção dos extratos. Após a centrifugação, os extratos foram diluídos em soluções tampão (pH 1,0 e pH 4,5), separadamente, e após 30 minutos de estabilização no escuro, as absorbâncias das soluções foram medidas a 510 e 700 nm, com o auxílio do espectrofotômetro. As antocianinas foram quantificadas com base nas Equações 4 e 5:

$$\text{Absorbância} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (4)$$

$$\text{Antocianina} = \frac{A \times \text{PM} \times F_0 \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (5)$$

em que:

A_{510} e A_{700} = absorbâncias da amostra (em unidade de absorvância - u.a.),

A = absorvância total calculada na Equação 4,

PM = peso molecular da cianidina-3-glucosídeo (449,2 g mol⁻¹),

F₀ = fator de diluição da amostra (26,67),

ϵ = coeficiente de absorvância molar da cianidina-3-glucosídeo em solução tampão (26.900 L cm⁻¹ mg⁻¹), e

L = caminho óptico da cubeta (1 cm).

Os resultados foram expressos em mg L⁻¹ de cianidina-3-glucosídeo.

5.2.4 Índices espectrais e modelos matemáticos

Modelos de regressão baseados em diferentes índices espectrais foram avaliados com o propósito de estimar os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas de alfaces, relacionando os dados espectrais com as medidas de pigmentos determinadas pelos métodos convencionais. Assim, os dados de reflectância das 81 amostras de alface obtidos por meio do espectrômetro e as suas respectivas medidas das análises convencionais passaram por uma inspeção inicial, onde alguns deles foram considerados anômalos, pois apresentaram comportamentos muito diferentes dos demais, sendo excluídos da análise. Após este procedimento, os conjuntos de dados foram divididos em duas partes, sendo aproximadamente $\frac{2}{3}$ dos dados utilizados para a calibração dos modelos e $\frac{1}{3}$ dos dados para a validação externa, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Número de dados utilizados na calibração e na validação externa dos modelos para determinar o teor de clorofila, carotenoides e antocianinas em alfaces.

Pigmentos	Dados da calibração	Dados da validação externa	Total de dados
Clorofila	54	24	78
Carotenoides	48	27	75
Antocianinas	45	24	69

O conjunto de calibração foi utilizado para desenvolver os modelos. Já o conjunto de validação externa foi montado com medidas de amostras independentes das usadas no conjunto calibração. Os valores estimados a partir dos modelos, usando as amostras de validação externa foram comparados com os valores medidos em laboratório pelos métodos convencionais para avaliar o desempenho da calibração em amostras desconhecidas.

A calibração dos modelos foi realizada utilizando-se o programa computacional Spectra, desenvolvido em linguagem C++, especialmente para esta finalidade. Para cada pigmento, foram testados três índices espectrais: o DSI, que corresponde à subtração da reflectância na região espectral do infravermelho próximo pela reflectância na região do vermelho do espectro visível (Equação 6); o NDVI, obtido pela razão entre a reflectância na região espectral do infravermelho próximo e a reflectância na região do vermelho do espectro visível (Equação 7); e o SRI, obtido por meio da razão dos valores de reflectância na região espectral do infravermelho próximo por aqueles contidos na região do vermelho do espectro visível (Equação 8). Para cada índice espectral foram testados quatro ajustes: exponencial, linear, potência e logarítmico.

$$DSI = \lambda_1 - \lambda_2 \quad (6)$$

$$NDVI = (\lambda_1 - \lambda_2)/(\lambda_1 + \lambda_2) \quad (7)$$

$$SRI = \lambda_1/\lambda_2 \quad (8)$$

em que:

λ_1 e λ_2 = diferentes comprimentos de onda (nm).

Os dados de reflectância foram agrupados dois a dois em intervalos de 10 em 10 nm, totalizando 3.540 combinações de comprimentos de onda para cada ajuste testado. Portanto, foram gerados 42.480 modelos, com valores dos coeficientes de correlação (r) da calibração já calculados, para cada pigmento avaliado (3 índices espectrais x 4 possibilidades de ajuste x 3.540 combinações de comprimentos de onda).

Os modelos que resultaram nos maiores valores de r, para cada tipo de ajuste e índice espectral testados, foram selecionados como os mais eficientes para determinar os teores de pigmentos, totalizando 36 modelos para cada pigmento. Em planilha eletrônica, cada um destes modelos foi então aplicado ao conjunto de dados reservado para a validação externa,

considerando-se o índice espectral como variável independente e o teor do pigmento avaliado como variável dependente.

Para avaliar os resultados da validação externa, os índices estatísticos empregados foram a Raiz do Erro Quadrático Médio (REQM) (Equação 9), Erro Médio de Estimativa (EME) (Equação 10), o Índice de Concordância de Willmott (d) (Equação 11) e o coeficiente de correlação da validação externa (r) (Equação 12).

$$\text{REQM} = \sqrt{\sum (y_p - y_r)^2 / n} \quad (9)$$

$$\text{EME} = \sum (y_p - y_r) / n \quad (10)$$

$$d = 1 - \left[\frac{\sum (y_p - y_r)^2}{\sum (|y_p - \bar{y}_r| + |y_r - \bar{y}_p|)^2} \right] \quad (11)$$

$$r = \frac{\sum (y_p - \bar{y}_p)(y_r - \bar{y}_r)}{\sqrt{\sum (y_p - \bar{y}_p)^2 \sum (y_r - \bar{y}_r)^2}} \quad (12)$$

em que:

y_r = valor de referência obtido pelo método laboratorial,

y_p = valor estimado pelo modelo,

n = número de amostras,

\bar{y}_r = média dos valores de referência obtidos pelo método laboratorial, e

\bar{y}_p = média dos valores estimados pelo modelo.

Os modelos com melhores resultados tanto na calibração quanto na validação externa foram então selecionados como adequados para a estimativa dos teores de clorofila, carotenoides e antocianinas das alfices.

5.3 Resultados e Discussão

Na Tabela 2, estão relacionados os três modelos mais eficientes para estimativa do teor de clorofila em alfices, considerando cada índice espectral avaliado. Dentre os quatro tipos de ajuste, o exponencial foi o que propiciou os maiores coeficientes de correlação.

Tabela 2. Índices espectrais e os ajustes mais eficientes para prever os teores de clorofila em alface.

Calibração			Validação			
Índice espectral	Equação	r	REQM	EME	d	r
804,72 - 822,07	$63,989 * \exp(0,723 * x)$	0,66	7,36	-3,55	0,78	0,71
822,07 - 804,72	$63,989 * \exp(-0,723 * x)$	0,66	7,36	-3,55	0,78	0,71
778,44 - 822,07	$64,443 * \exp(0,592 * x)$	0,58	7,65	-2,46	0,70	0,61
$(804,72 - 822,07) / (804,72 + 822,07)$	$64,013 * \exp(59,968 * x)$	0,66	7,43	-3,39	0,78	0,70
$(822,07 - 804,72) / (822,07 + 804,72)$	$64,013 * \exp(-59,968 * x)$	0,66	7,43	-3,39	0,78	0,70
$(873,25 - 881,66) / (873,25 + 881,66)$	$65,739 * \exp(31,441 * x)$	0,57	9,15	-4,01	0,74	0,61
804,72 / 822,07	$6,556E-12 * \exp(29,909 * x)$	0,66	7,43	-3,39	0,78	0,70
822,07 / 804,72	$7,251E+14 * \exp(-30,06 * x)$	0,66	7,43	-3,39	0,78	0,70
873,25 / 881,66	$1,025E-5 * \exp(15,673 * x)$	0,57	9,15	-3,99	0,74	0,61

REQM (mg 100 g⁻¹), EME (mg 100 g⁻¹), d (adimensional) e r (adimensional).

Os valores de r obtidos para os modelos de estimativa indicam que existe uma correlação razoável entre as variáveis, variando de 0,57 a 0,66 na calibração e de 0,61 a 0,71 na validação externa. Este índice representa o grau de correlação entre as variáveis, ou seja, o quanto da variação dos pigmentos pode ser explicado pelos índices espectrais.

Os resultados encontrados condizem com os obtidos por Zarco-Tejada et al. (2005), que avaliaram índices para a determinação de clorofila em dossel de videira, alcançando na validação externa r de 0,71 e 0,75 para NDVI e SRI, respectivamente, também com ajustes exponenciais. Croft et al. (2014) predizendo os teores de clorofila para espécies florestais, obtiveram na validação externa r de 0,55; 0,79 e 0,76 para DSI, NDVI e SRI, respectivamente.

Apenas o r não é suficiente para definir a exatidão e a precisão de um modelo, pois este não estabelece o tipo e a magnitude das diferenças entre o valor de referência e o valor predito pelo modelo de estimativa (Barros et al., 2009). Desta forma, o REQM, o EME e o d se apresentam como índices fundamentais na interpretação dos resultados e, neste trabalho, os seus valores podem ser considerados satisfatórios.

O REQM expressa a precisão do modelo de estimativa, fornecendo uma informação em relação à dispersão dos valores. Na validação externa dos modelos para estimar o teor de clorofila, os valores de REQM variaram de 7,36 a 7,65 mg 100g⁻¹ empregando-se o DSI e de 7,43 a 9,15 mg 100g⁻¹ quando o NDVI e o SRI foram utilizados. Ressalta-se que o conjunto

de dados variou de 50 a 85 mg 100g⁻¹. Estes erros correspondem a aproximadamente 21% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados para os índices DSI e 24% para NDVI e SRI. Xiaobo et al. (2011) avaliaram modelos para estimar o teor de clorofila em folhas de pepino através dos índices espectrais DSI, NDVI e SRI com diferentes comprimentos de onda, e encontraram valores de REQM de 35,60 mg 100g⁻¹ nos modelos baseados em DSI, variando de 27,01 a 38,34 mg 100g⁻¹ para NDVI e de 22,91 a 38,94 mg 100g⁻¹ para SRI, em que o conjunto de dados variou entre 51,88 e 232,21 mg 100g⁻¹. Estes valores de REQM correspondem a 20%, 18% e 17% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados para os índices DSI, NDVI e SRI, respectivamente. Estes valores estão muito próximos dos encontrados neste trabalho.

O EME representa o erro sistemático entre os valores preditos e os valores medidos, sendo que os valores próximos a zero indicam modelos mais exatos, os valores negativos indicam subestimativa e os valores positivos indicam superestimativa dos valores observados (Matsimbe et al., 2015). Nestes modelos para estimar clorofila, todos os valores para EME foram negativos, indicando uma sutil subestimativa dos valores observados. Com base na amplitude da faixa de variação do conjunto de dados, os valores de EME encontrados representam 9% para DSI e 11% para os índices NDVI e SRI.

Neste trabalho, os melhores modelos identificados para previsão de clorofila apresentaram valores de índices de concordância (d) variando entre 0,70 e 0,78. Este índice representa a exatidão do modelo de estimativa, avaliando o grau de concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores obtidos pelo método de referência, podendo variar entre 0 e 1. Ressalta-se que, quanto mais próximo de um, melhor o desempenho do modelo e, quanto mais próximo de zero, pior é o desempenho. Assim, este índice indica o quanto a linha de tendência de um ajuste difere da linha 1:1. Estimando o teor de clorofila em dossel de trigo, Bannari et al. (2008) obtiveram índice de concordância (0,66) inferior ao encontrado neste trabalho para o modelo de estimativa baseado em NDVI.

Os melhores modelos obtidos para estimar o teor de carotenoides em alfaces e os resultados dos índices estatísticos para a calibração e a validação externa estão apresentados na Tabela 3. O ajuste exponencial foi o mais adequado para o DSI e o linear para o NDVI e SRI, sendo que os modelos que utilizaram o ajuste exponencial se mostraram mais eficientes do que os que utilizaram o ajuste linear, apresentando maiores valores de r na calibração e na validação externa. Yi et al. (2014) estimando carotenoides em dossel de algodão através de

NDVI, também observaram uma superioridade do ajuste exponencial em relação ao linear, onde os valores de r foram de 0,76 e 0,74, respectivamente, na validação externa.

Tabela 3. Índices espectrais e os ajustes mais eficientes para prever os teores de carotenoides em alface.

Calibração			Validação			
Índice espectral	Equação	r	REQM	EME	d	r
500,17-697,82	$31,402 * \exp(0,071 * x)$	0,65	1,39	-0,74	0,82	0,75
697,82-500,17	$31,402 * \exp(-0,071 * x)$	0,65	1,39	-0,74	0,82	0,75
509,86-697,82	$22,745 * \exp(0,053 * x)$	0,64	1,44	0,54	0,80	0,69
(567,43-576,94) / (567,43+576,94)	$56,871 * x + 12,103$	0,60	1,40	-0,26	0,80	0,66
(576,94-567,43) / (576,94+567,43)	$-56,871 * x + 12,103$	0,60	1,40	-0,26	0,80	0,66
(567,43-586,41) / (567,43+586,41)	$30,457 * x + 12,308$	0,60	1,42	-0,26	0,79	0,65
576,94 / 567,43	$-29,888 * x + 42,011$	0,60	1,40	-0,26	0,80	0,66
567,43 / 576,94	$26,883 * x + (-14,791)$	0,60	1,40	-0,26	0,79	0,66
586,41 / 567,43	$-16,405 * x + 28,775$	0,60	1,42	-0,27	0,79	0,65

REQM (mg 100 g⁻¹), EME (mg 100 g⁻¹), d (adimensional) e r (adimensional).

Assim como ocorreu para os dados de clorofila, os valores de r obtidos para carotenoides variaram entre 0,60 e 0,65 na calibração e entre 0,65 e 0,75 na validação externa. Estes valores estão próximos ao obtido por Yi et al. (2014) em dossel de algodão, utilizando um modelo baseado no NDVI, verificando um r de 0,61 na validação externa. Já Gamon et al. (1990), para prever o pigmento em folhas de girassol utilizando o NDVI, verificaram na validação externa valor um pouco mais elevado (0,82) em relação a este trabalho.

Os valores de REQM obtidos na validação externa dos modelos para estimar o teor de carotenoides em alfaces variaram de 1,39 a 1,44 mg 100g⁻¹ para DSI e de 1,40 a 1,42 mg 100g⁻¹ para NDVI e SRI, sendo que o conjunto de dados variou de 9 a 18 mg 100g⁻¹. Em porcentagem, estes erros associados aos índices DSI, NDVI e SRI representam, aproximadamente, 16% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados. Yi et al. (2014) encontraram REQM de 10,8 mg 100g⁻¹ no modelo para a predição de carotenoides em dossel de algodão utilizando NDVI, no qual a variação do pigmento foi de 25,6 a 100,9 mg 100g⁻¹. Este REQM representa 14% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados, muito próximo do encontrado neste trabalho para os índices avaliados.

Assim como para clorofila, a maioria dos valores de EME também foi negativo para o teor de carotenoides, com exceção do erro associado a um dos modelos baseados no DSI. Este resultado indica que os modelos tiveram uma tendência de subestimar os valores observados. Entretanto, os valores de EME ficaram muito próximos de zero (Tabela 3), indicando exatidão do modelo. Com base na amplitude da faixa de variação do conjunto de dados, os valores de EME encontrados representam apenas 1% para DSI e 3% para os índices NDVI e SRI. Yi et al. (2014) encontraram um EME de $7,3 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ no modelo para prever o teor de carotenoides em folhas de algodão, que representa 10% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados, que variou entre 25,6 e $100,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$.

Os valores obtidos para o índice estatístico d foram superiores a 0,79, mostrando que nos modelos gerados existe uma alta concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores obtidos pelo método de referência para o conjunto independente de dados.

Os modelos baseados em DSI, NDVI e SRI utilizados para determinar o teor de antocianinas de alfaces, os índices estatísticos (r, REQM, EME e d) e os ajustes que apresentaram melhores resultados (exponencial e linear) estão apresentados na Tabela 4. O ajuste exponencial foi selecionado novamente como o mais eficiente, apresentando altos valores de r e baixos valores de REQM e EME, seguido pelo ajuste linear que também apresentou resultados satisfatórios para estimar os teores de antocianinas combinados com os índices DSI e NDVI.

Tabela 4. Índices espectrais e os ajustes mais eficientes para prever os teores de antocianinas em alface.

Calibração			Validação			
Índice espectral	Equação	r	REQM	EME	d	r
529,16-538,77	$43,568 * \exp (1,732 * x)$	0,76	3,91	0,17	0,98	0,98
538,77-529,16	$43,568 * \exp (-1,732 * x)$	0,76	3,91	0,17	0,98	0,98
529,16-548,35	$45,223 * \exp (1,226 * x)$	0,75	3,41	0,03	0,98	0,98
$(529,16-538,77) / (529,16+538,77)$	$706,005 * x + 34,478$	0,75	3,84	0,88	0,98	0,93
$(538,77-529,16) / (538,77+529,16)$	$-706,005 * x + 34,478$	0,75	3,84	0,88	0,98	0,93
$(519,52-538,77) / (519,52+538,77)$	$219,603 * x + 37,845$	0,75	3,70	0,82	0,98	0,94
538,77/509,86	$-38,501 * x + 76,893$	0,76	4,12	0,84	0,97	0,93
538,77/500,17	$-22,676 * x + 61,242$	0,75	4,55	0,58	0,97	0,91
548,35/509,86	$-35,816 * x + 74,227$	0,75	4,10	0,83	0,97	0,93

REQM ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), EME ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), d (adimensional) e r (adimensional).

Dos três pigmentos analisados neste trabalho, a determinação de antocianinas em alfaces por meio de índices espectrais foi a que obteve melhores resultados, apresentando altos valores de r na validação externa, variando entre 0,91 e 0,98. Garriga et al. (2014) encontraram r de 0,84 na validação externa em um modelo para determinar antocianinas em folhas de morango, também utilizando índices espectrais.

Os valores de REQMs obtidos na validação externa dos modelos para estimar o teor de antocianinas variaram de 3,41 a 3,91 mg 100g⁻¹; 3,70 a 3,84 mg 100g⁻¹ e de 4,10 a 4,55 mg 100g⁻¹ para DSI, NDVI e SRI, respectivamente, em um conjunto de dados que variou entre 1 e 40 mg 100g⁻¹. Estes REQMs correspondem a 9%, 10% e 11% da amplitude da faixa de variação do conjunto de dados para os índices DSI, NDVI e SRI, respectivamente. Steele et al. (2009) predizendo o teor de antocianinas em folhas de videira através de um modelo baseado em SRI encontraram um REQM de 7,63 nmol cm⁻², que corresponde a 19% da amplitude do conjunto de dados, que variou de 3,90 a 44,43 nmol cm⁻².

Para o EME, os valores foram todos positivos e muito próximos de zero, apresentando variação de 0,03 a 0,88 mg 100g⁻¹. Estes erros representam 0,3% para o modelo baseado em DSI e 2% aos índices NDVI e SRI com base na amplitude da faixa de variação do conjunto de dados. Isto indica que, apesar dos modelos terem apresentado uma sutil superestimativa dos valores observados, o modelo foi exato para prever os teores de antocianinas das alfaces.

Os comprimentos de onda que se mostraram mais representativos para a estimativa da clorofila com base nos índices espectrais estão entre 778 e 882 nm, como mostrado na Figura 1.

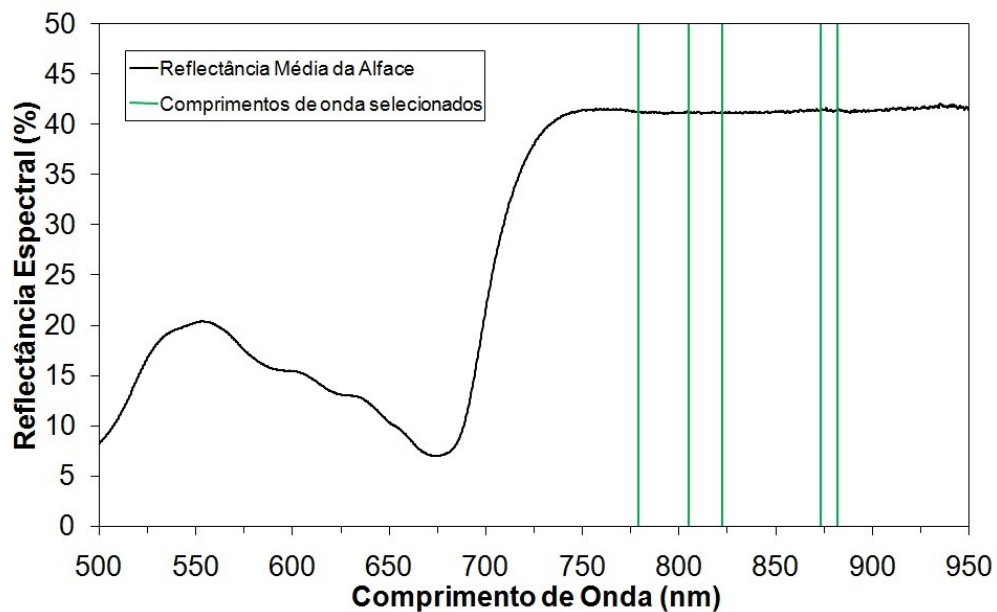


Figura 1. Comprimentos de onda utilizados nos modelos de predição de clorofila.

Os comprimentos de onda selecionados para estimar clorofila neste trabalho se diferem das faixas utilizadas em alguns outros para detectar este pigmento. Como Garriga et al. (2014), que concluíram que os comprimentos de onda 369, 516, 700 e 1.140 nm foram eficientes na determinação de clorofila; e Schlemmer et al. (2013), em que a faixa espectral em torno de 740 nm foi obtida como a ideal para a estimativa do pigmento. Além disso, nas análises convencionais de laboratório, as leituras de absorvância em espectrofotômetro são realizadas em 652 nm.

Porém, os comprimentos de onda dos modelos estão próximos aos descritos por Gitelson (2011), Féret et al. (2011), Ustin et al. (2009) e Blackburn (2006), que afirmaram que a reflectância na região final do espectro visível (730 – 750 nm) pode fornecer estimativas precisas do conteúdo de clorofila foliar em avaliações não destrutivas. De acordo com Rouse et al. (1974) e Viña e Gitelson (2011), a vegetação reflete altamente a radiação na região do infravermelho próximo, de 750 – 900 nm, devido à estrutura celular da folha.

Os comprimentos de onda empregados nos modelos selecionados como mais eficientes para estimar o teor de carotenoides com base nos índices espectrais estão entre 500 e 697 nm (Figura 2).

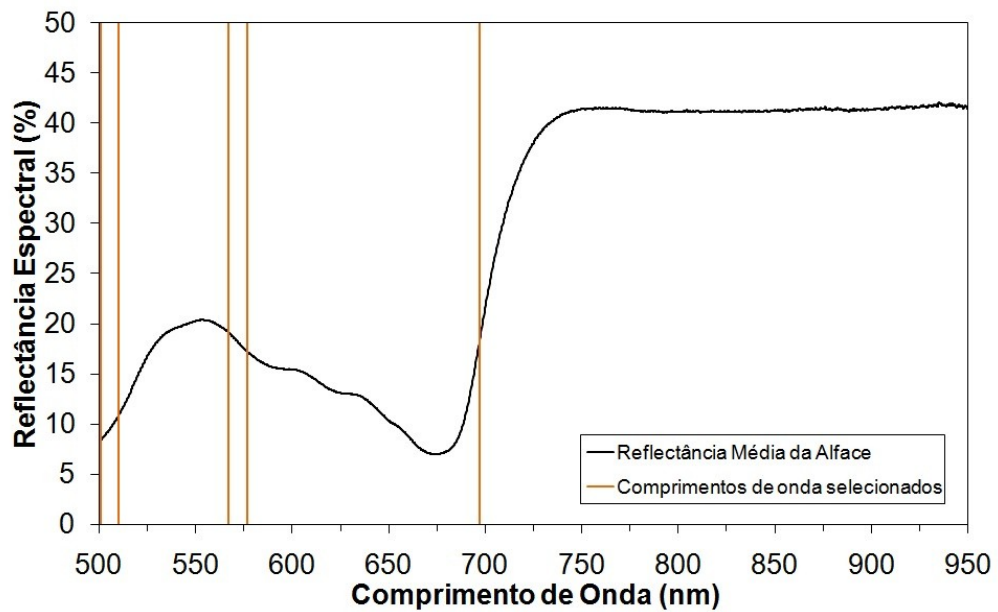


Figura 2. Comprimentos de onda utilizados nos modelos de predição de carotenoides.

Gitelson et al. (2002) e Merzlyak et al. (2003) concluíram que os comprimentos de onda 510, 550 e 700 nm são eficientes na determinação de carotenoides em folhas vegetais. Em modelos de previsão do teor de carotenoides em folhas de soja, Chappelle et al. (1992) concluíram que 500 e 760 nm são os comprimentos de onda ideais para estimar este pigmento por meio de índices espectrais. Estes comprimentos de onda estão próximos aos encontrados nos melhores modelos desenvolvidos neste trabalho.

Os melhores modelos selecionados para predição de antocianinas com base nos índices espectrais neste trabalho utilizam comprimentos de onda que estão entre 500 e 548 nm (Figura 3).

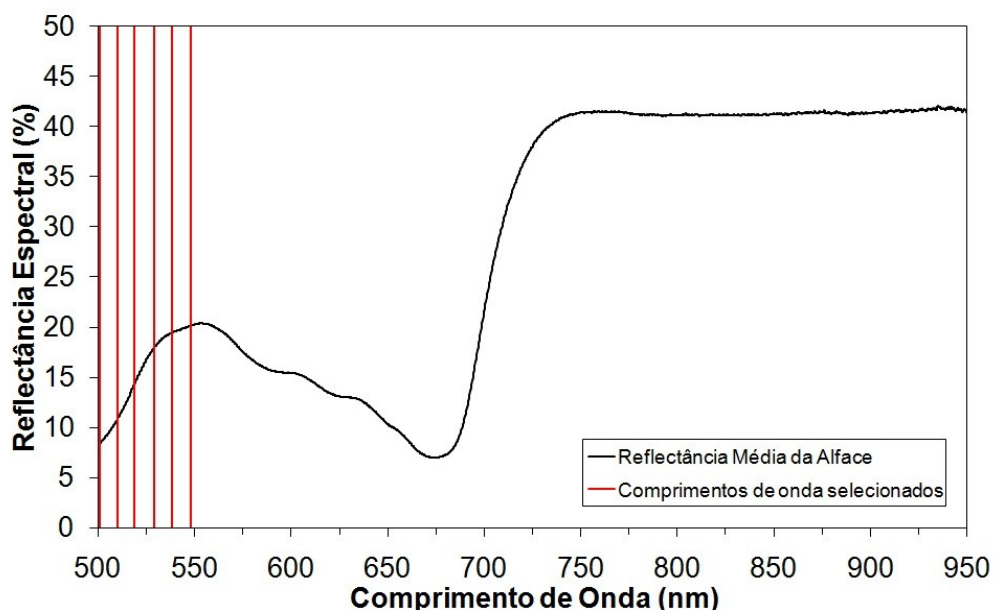


Figura 3. Comprimentos de onda utilizados nos modelos de predição de antocianinas.

De acordo com Merzlyak et al. (2003) e Viña e Gitelson (2011), as antocianinas absorvem radiação principalmente na região verde do espectro visível, em torno de 540 a 560 nm. Por isso, a maioria dos índices de vegetação que utilizam esta região espectral normalmente responde bem à presença deste pigmento.

5.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a viabilidade de estimar os teores de clorofila, carotenoides e antocianinas em alfaces de três cultivares diferentes (Cristal, Regina 2000 e Mimosa) e cultivadas em três diferentes sistemas de cultivo, utilizando a reflectância espectral na faixa de 500 a 1.023 nm por meio de índices espectrais.

Os modelos desenvolvidos para estimar antocianinas foram os mais eficientes, em comparação com os outros pigmentos, apresentando maiores valores do coeficiente de determinação, tanto na calibração quanto na validação externa, e do índice de concordância de Willmott.

Para os três pigmentos analisados, os modelos baseados no DSI (Índice de Diferença Espectral) e que utilizaram o ajuste exponencial apresentaram os melhores resultados para os índices estatísticos utilizados.

Desta forma, confirma-se que o uso da espectrometria e de índices espectrais é uma maneira rápida, não destrutiva e eficiente para determinar o teor de pigmentos em vegetais, apresentando-se como uma alternativa aos métodos convencionais.

5.5 Referências bibliográficas

- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M. & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728.
- Bannari, A., Khurshid, K.S., Staenz, K. & Schwarz, J. (2008). Potential of Hyperion EO-1 hyperspectral data for wheat crop chlorophyll content estimation. *Canadian Journal of Remote Sensing*, 34(1), 139-157.
- Barros, V.R., Souza, A.P., Fonseca, D.C. & Silva, L.B.D. (2009). Avaliação da evapotranspiração de referência na Região de Seropédica, Rio de Janeiro, utilizando lisímetro de pesagem e modelos matemáticos. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 4(2),198-203.
- Batista, M.A., Sant'ana, H.M.P., Chaves, J.B.P. & Moraes, F.A. (2006). Carotenos e provitamina A em bortalha e ervas aromáticas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais, durante as quatro estações do ano. *Acta Scientiarum Health Sciences*, 28(1), 93-100.
- Blackburn, G.A. (2006). Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *Journal of Experimental Botany*, 58, 855–867.
- Carvalho, P.G.B., Machado, C.M.M., Moretti, C.L. & Fonseca, M.E.N. (2006). Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira*, 24(4), 397-404.
- Cao, X., Luo, Y., Zhou, Y., Duan, X. & Cheng, D. (2013). Detection of powdery mildew in two winter wheat cultivars using canopy hyperspectral reflectance. *Crop Protection*, 45, 124-131.
- Chappelle, E.W., Kim, M.S. & McMurtrey III, J.E. (1992). Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sensing of Environment*, 39, 239–247.
- Chon, S., Boo, H., Heo, B. & Gorinstein, S. (2012). Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(1), 45–48.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Shah, N. & Smith, P. (2011). Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. *Food Research International*, 44, 1888–1896.
- Croft, H., Chen, J.M. & Zhang, Y. (2014). The applicability of empirical vegetation indices for determining leaf chlorophyll content over different leaf and canopy structures. *Ecological Complexity*, 17, 119–130.
- Dobrota, C., Lazar, L. & Baciú, C. (2015). Assessment of physiological state of *Betula pendula* and *Carpinus betulus* through leaf reflectance measurements. *Flora*, 216, 26–34.

- Engel, V.L. & Poggiani, F. (1991). Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 3(1), 39 - 45.
- Féret, J.B., François, C., Gitelson, A.A., Barry, K.M., Panigada, C., Richardson, A.D. & Jacquemoud, S. (2011). Optimizing spectral indices and chemometric analysis of leaf chemical properties using radiative transfer modeling. *Remote Sensing of Environment*, 115, 2742–2750.
- Gamon, J.A., Field, C.B., Bilger, W., Bjorkman, O., Fredeen, A.L. & Penuelas, J. (1990). Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia*, 85, 1–7.
- Garriga, M., Retamales, J.B., Romero-Bravo, S., Caligari, P.D.S. & Lobos, G.A. (2014). Chlorophyll, anthocyanin, and gas exchange changes assessed by spectroradiometry in *Fragaria chiloensis* under salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(5), 505–515.
- Gitelson, A.A., Zur, Y., Chivkunova, O.B. & Merzlyak, M.N. (2002). Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 75(3), 272–281.
- Gitelson, A.A., Keydan, G.P. & Merzlyak, M.N. (2006). Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophysical Research Letters*, 33, 1-5.
- Gitelson, A.A. (2011). Chapter 6: Non-destructive estimation of foliar pigment (chlorophylls, carotenoids and anthocyanins) contents: Espousing a semi-analytical three-band model. p141–165. In: Thenkabail, P.S., Lyon, J.G. & Huete, A. (Eds.). *Hyperspectral Remote Sensing of Vegetation*. New York: CRC Press- Taylor and Francis.
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
- Hou, D.X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, 3(2), 149–159.
- IAL, Instituto Adolfo Lutz, Zenebon, O., Pascuet, N.S. & Tiglea, P. (Coordenadores). (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 1020p. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2011). *Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. 150p. Rio de Janeiro: IBGE.
- Jha, S.N., Narsaiah, K., Jaiswal, P., Bhardwaj, R., Gupta, M., Kumar, R. & Sharma, R. (2014). Nondestructive prediction of maturity of mango using near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 124, 152-157.
- Kang, S., Seeram, N., Nair, M. & Bourquin, L. (2003). Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc (Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 194(1), 13–19.
- Le Maire, G., François, C. & Dufrêne, E. (2004). Towards universal broad leaf chlorophyll indices using PROSPECT simulated database and hyperspectral reflectance measurements. *Remote Sensing of Environment*, 89(1), 1–28.
- Li, F., Mistele, B., Hu, Y., Chen, X. & Schmidhalter, U. (2014). Reflectance estimation of canopy nitrogen content in winter wheat using optimized hyperspectral spectral indices and partial least squares regression. *European Journal of Agronomy*, 52, 198-209.

- Liesenberg, V., Ponzoni, F.J. & Galvão, L.S. (2007). Análise da dinâmica sazonal e separabilidade espectral de algumas fitofisionomias do cerrado com índices de vegetação dos sensores MODIS/TERRA e AQUA. *Revista Árvore*, 31(2), 295-305.
- Lila, M.A. (2004). Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306–313.
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. & Ferreres, F. (2008). Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 108, 1028-1038.
- Mahlein, A.K., Rumpf, T., Welke, P., Dehne, H.W., Plümer, L., Steiner, U. & Oerke, E.C. (2013). Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sensing of Environment*, 128, 21-30.
- Maiani, G., Periago Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., et al. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 194–218.
- Matsimbe, S.F.S., Motoike, S.Y., Pinto, F.A.C., Leite, H.G. & Marcatti, G.E. (2015). Prediction of oil content in the mesocarp of fruit from the macauba palm using spectrometry. *Revista Ciência Agronômica*, 46(1), 21-28.
- Merzlyak, M.N., Gitelson, A.A., Chivkunova, O.B. & Rakitin, V.Y. (1999). Non-destructive optical detection of leaf senescence and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 106, 135-141.
- Merzlyak, M.N., Gitelson, A.A., Chivkunova, O.B., Solovchenko, A.E. & Pogosyan, S.I. (2003). Application of reflectance spectroscopy for analysis of higher plant pigments. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(5), 704–710.
- Nicolle, C., Cardinault, N., Gueu, E., Jaffrelo, L., Rock, E., Mazur, A., Amouroux, P. & Rémésy, C. (2004a). Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clinical Nutrition*, 23, 605–614.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P. & Rémésy, C. (2004b). Characterization and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 2061-2069.
- Nigon, T.J., Mulla, D.J., Rosen, C.J., Cohen, Y., Alchanatis, V., Knight, J. & Rud, R. (2015). Hyperspectral aerial imagery for detecting nitrogen stress in two potato cultivars. *Computers and Electronics in Agriculture*, 112, 36–46.
- Rallo, G., Minacapilli, M., Ciralo, G. & Provenzano, G. (2014). Detecting crop water status in mature olive groves using vegetation spectral measurements. *Biosystems Engineering*, 128, 52-68.
- Richardson, A.D., Duigan, S.P. & Berlyn, G.P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185–194.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. 71p. Campinas: UNICAMP.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Kimura, M. & Amaya-Farfan, J. (Eds.). (2008). *Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos*. 100p. Brasília: MMA/SBF.
- Rosendo, J.S. (2005). Índices de vegetação e monitoramento do uso do solo e cobertura vegetal na bacia do rio Araguari – MG utilizando dados do sensor MODIS. 152p.

- Dissertação (Mestrado em Geografia e Gestão do Território), Universidade de Uberlândia, MG, Uberlândia.
- Rouse, J.W., Haas, R.H., Schell, J.A. & Deering, D.W. (1974). Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS, NASA SP-351. In: *Proc. 3rd ERTS-1 Symp.*, 1, 309–317.
- Schlemmer, M., Gitelson, A., Schepers, J., Ferguson, R. & Peng, Y. (2013). Remote estimation of nitrogen and chlorophyll contents in maize at leaf and canopy levels. *International Journal of Applied Earth Observation*, 25, 47–54.
- Seelig, H.D., Hoehn, A., Stodieck, L.S., Klaus, D.M., Adams III, W.W. & Emery, W.J. (2008). Relations of remote sensing leaf water indices to leaf water thickness in cowpea, bean, and sugarbeet plants. *Remote Sensing of Environment*, 112(2), 445–455.
- Sims, D.A. & Gamon, J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81, 337–354.
- Stagakis, S., González-Dugo, V., Cid, P., Guillén-Climent, M.L. & Zarco-Tejada, P.J. (2012). Monitoring water stress and fruit quality in an orange orchard under regulated deficit irrigation using narrow-band structural and physiological remote sensing indices. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 71, 47–61.
- Steele, M.R., Gitelson, A.A., Rundquist, D.C. & Merzlyak, M.N. (2009). Nondestructive estimation of anthocyanin content in grapevine leaves. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(1), 87-92.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3 ed, 722p. Porto Alegre: Artmed.
- Thurnham, D.I. (2007). Bioequivalence of b-carotene and retinol. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 87(1), 13-39.
- Ustin, S.L., Gitelson, A.A., Jacquemoud, S., Schaepman, M., Asner, G.P., Gamon, J.A. & Zarco-Tejada, P. (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sensing of Environment*, 113, 67–77.
- Vieira, E.L., Souza, G.S., Santos, A.R. & Silva, J.S. (2010). *Manual de Fisiologia Vegetal*. 230p. São Luis, MA: EDUFMA.
- Viña, A. & Gitelson, A.A. (2011). Sensitivity to foliar anthocyanin content of vegetation indices using green reflectance. *IEEE Geoscience And Remote Sensing Letters*, 8(3), 463-467.
- Wang, C., Wang, J., Lin, W., Chu, C., Chou, F. & Tseng, T. (2000). Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38(5), 411–416.
- Wu, C., Niu, Z., Tang, Q & Huang, W. (2008). Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices, modeling and validation. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148, 1230–1241.
- Xiaobo, Z., Jiyong, S., Limin, H., Jiewen, Z., Hanpin, M., Zhenwei, C., Yanxiao, L. & Holmes, M. (2011). In vivo noninvasive detection of chlorophyll distribution in cucumber (*Cucumis sativus*) leaves by indices based on hyperspectral imaging. *Analytica Chimica Acta*, 706, 105–112.
- Xing, J. & Baerdemaeker, J.D. (2005). Bruise detection on ‘Jonagold’ apples using hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 152-162.
- Yao, H., Huang, Y., Hruska, Z., Thomson, S.J & Reddy, K.N. (2012). Using vegetation index and modified derivative for early detection of soybean plant injury from glyphosate. *Computers and Electronics in Agriculture*, 89, 145–157.

- Yi, Q., Jiapaer, G., Chen, J., Bao, A. & Wang, F. (2014). Different units of measurement of carotenoids estimation in cotton using hyperspectral indices and partial least square regression. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 91, 72–84.
- Zarco-Tejada, P.J., Berjón, A., López-Lozano, R., Miller, J.R., Martín, P., Cachorro, V., González, M.R. & De Frutos, A. (2005). Assessing vineyard condition with hyperspectral indices: Leaf and canopy reflectance simulation in a row-structured discontinuous canopy. *Remote Sensing of Environment*, 99, 271–287.
- Zhao, D.H., Li, J.L. & Qi, J.G. (2005). Identification of red and NIR spectral regions and vegetative indices for discrimination of cotton nitrogen stress and growth stage. *Computers and Electronics in Agriculture*, 48, 155–169.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias utilizadas neste trabalho para estimar o conteúdo de pigmentos (clorofila, carotenoides e antocianinas) em folhas de alface de diferentes colorações cultivadas sob diferentes sistemas de produção, são inovadoras, empregando-se técnicas de quimiometria e de espectrometria. Os modelos desenvolvidos para análise dos dados espectrais obtiveram desempenhos bastante satisfatórios, demonstrando assim, que a técnica espectrométrica combinada a ferramentas quimiométricas, tais como PLSR, PCA, regressão polinomial e os índices espectrais podem ser usados para a quantificação dos pigmentos em folhas de alface e para a classificação das cultivares quanto à coloração das folhas. Neste trabalho, os modelos gerados apresentaram baixos valores dos erros (REQM e EME) e altos valores de R^2 , r e d .

Com base nisso e em trabalhos de outros pesquisadores, a reflectância espectral pode ser utilizada como um meio alternativo, rápido e não destrutivo para a determinação dos teores dos pigmentos, gerando resultados em tempo real, podendo realizar medidas pontuais ou em áreas extensas. Por outro lado, esta técnica ainda possui um alto custo, além de necessitar de mão de obra qualificada.

Novos equipamentos podem ser desenvolvidos com o intuito de incrementar este tipo de tecnologia em sistemas de classificação e análise de plantas de alface após a colheita. Assim como existem sistemas automáticos para o processamento mínimo das alfaces, no qual ocorre a higienização, corte e embalagem deste produto, pode-se inserir elementos para a separação (classificação) de alfaces roxas e verdes.

Além disso, diante de um mercado consumidor cada vez mais preocupado com a qualidade do alimento, informações a respeito da quantidade de pigmentos presentes no produto podem servir de um atrativo a mais no momento da aquisição, uma vez que os pigmentos são compostos bioativos que apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e vários outros benefícios à saúde humana.

Os modelos desenvolvidos com base nos índices espectrais, para predição dos pigmentos, devem ser melhores avaliados. Uma vez que, os comprimentos de onda selecionados por meio da metodologia proposta neste trabalho, podem não ser os mais adequados para esta finalidade. Em análises futuras a cerca destes comprimentos de onda ideais, pode-se levar em consideração os valores dos coeficientes b (ou coeficientes de regressão) obtidos através da análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR).

É necessário o desenvolvimento de novos trabalhos nesta linha de pesquisa, para que a modelagem utilizando este tipo de análise multivariada seja mais precisa e exata na determinação dos pigmentos, de forma a se tornarem mais competitivos com as metodologias convencionais.