

# DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E UMIDADE EM SOJA POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)

Maria Luísa Guerra Morato de Almeida<sup>1</sup>; Edmilson Renato de Castro<sup>2</sup>, Renata Borges do Nascimento<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Aluna de Iniciação Científica do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT);

<sup>2</sup> Professor do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT).

**Resumo.** *O estudo a seguir visa avaliar o efeito da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) na quantificação de proteínas em grãos de soja, consequentemente enfatizando a umidade presente nos grãos. Foram utilizados dois tipos de equipamentos para as medições necessárias: uma balança analisadora de umidade por infravermelho e uma estufa convencional. Para a determinação do conteúdo proteico, o método de Kjeldahl foi utilizado como referência. Os resultados obtidos indicam que é possível realizar um modelo de calibração para quantificação de proteína e umidade em soja através do NIRS porém mais amostras são necessárias para um melhor modelo de calibração.*

## Introdução

Nos últimos anos, houve um notável avanço tecnológico no setor de produção de grãos do Brasil. Isso permitiu aumentar a produtividade nos campos e reduzir o uso de insumos. Os mercados agora exigem gestão da qualidade (aptidão tecnológica e contaminantes), preservação da identidade do produto (segregação e rastreabilidade) e certificação do sistema de produção.

A qualidade e a eficiência do processo produtivo nas lavouras são prejudicadas por perdas qualitativas e quantitativas na fase pós-colheita devido a contaminantes e à falta de direcionamento da matéria-prima de acordo com as especificações do produto final. O tempo de execução do teste na pós-colheita de grãos é um fator limitante na escolha do método de análise.

A obtenção de métodos rápidos e eficientes para separar e rastrear lotes comerciais que possam ser usados na recepção de unidades armazenadoras é, portanto, uma das principais demandas na pós-colheita de grãos. Atualmente, alguns grãos, como o trigo, são segregados com base na classificação comercial da cultivar semeada.

No entanto, muitas vezes este indicativo de qualidade não é confirmado devido aos diversos fatores que influenciam a qualidade do produto colhido, como adubação, controle fitossanitário, manejo do solo, condições climáticas e manejos pré e pós-colheita, entre outros. Portanto, a definição pela segregação mais adequada só pode ser feita após uma avaliação adequada da qualidade na pós-colheita.

## Grãos de Soja

Atualmente, o grão de soja representa um alimento amplamente utilizado na alimentação cotidiana dos brasileiros, especialmente considerando que o Brasil se destaca como o maior exportador de soja do mundo, com uma produção superior a 156 milhões de toneladas.

Com o crescimento da população vegetariana e vegana, a proteína texturizada derivada dessa semente tornou-se bastante reconhecida, uma vez que possui um elevado teor proteico que, com a orientação de um profissional de saúde, pode substituir as proteínas de origem animal. Ademais, outro produto de origem da soja que apresenta alto consumo é o óleo de soja, que se destaca como uma das principais alternativas ao azeite, devido ao seu preço acessível.

## Espectroscopia de Infravermelho Próximo

A espectroscopia de Infravermelho Próximo, comumente designada pela sigla NIRS, é um método de análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, cujo objetivo é determinar suas características físico-químicas sem alterar sua estrutura. O infravermelho próximo refere-se a radiações eletromagnéticas que operam na faixa de comprimentos de onda entre 780 e 2500 nm. (Pasquini, 2003)

O princípio de análise da espectroscopia NIR baseia-se na aplicação de luz infravermelha próxima em diferentes comprimentos de onda. A partir das variadas características de absorção e dispersão da luz, essa técnica possibilita a avaliação quantitativa e qualitativa dos componentes moleculares. Essa técnica é amplamente usada para análises rápidas e precisas em diferentes campos, como agricultura, alimentos e controle ambiental. (Pasquini, 2018)

Uma das principais vantagens do NIRS com reflectância difusa é sua capacidade de analisar amostras em estado bruto, eliminando a necessidade de preparação prévia. Além disso, combina eficiência, rapidez e versatilidade, permitindo a análise de múltiplos parâmetros simultaneamente. Os espectros gerados contêm picos de absorção que correspondem a diferentes grupos funcionais, possibilitando a identificação e quantificação de compostos químicos por meio de modelos matemáticos avançados, como os métodos quimiométricos e regressões multivariadas (PLS). (Pasquini, 2018)

Essa técnica é particularmente útil na caracterização de solos, alimentos e biomassa, onde a presença de diferentes componentes pode ser correlacionada com a reflectância obtida. Seu uso tem crescido devido à sua aplicabilidade em análises no campo ou em laboratório, minimizando impactos ambientais e custos operacionais.

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define a quimiometria como a ciência que relaciona medições feitas em um sistema ou processo químico com o estado do sistema por meio da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos (Hibbert, 2016). Um dos tipos de métodos quimiométricos utilizados em espectros NIR é a calibração multivariada e, os principais métodos desta calibração são: regressão linear múltipla (RLM), regressão em componentes principais (PCR, principal component regression) e mínimos quadrados parciais (PLS, partial least squares).

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de calibração multivariada que utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre os espectros (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y). Quando existe apenas uma propriedade em estudo,  $y$  é um vetor e, neste caso, o método é denominado PLS 1. A propriedade de interesse muitas vezes é a concentração de um analito, porém não se limita somente a esta, podendo até mesmo abranger propriedades físico-químicas, tais como densidade e viscosidade, as quais são relacionadas a composição da amostra. (Souza, A. M., et al., 2013).

Visando a melhoria do processo de controle de qualidade na produção da soja, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de modelo de calibração para quantificação de proteína e umidade em soja para a avaliação de qualidade do grão utilizando a técnica da espectroscopia do infravermelho próximo.

## Material e Métodos

### Materiais

Em primeiro lugar, é necessário apresentar o reagente principal da pesquisa: o grão de soja. Sua principal característica é a sua composição proteica, com um teor de proteína que varia entre 36% e 40%, além de conter aproximadamente 30% de carboidratos. Adicionalmente, a soja é um grão que apresenta um conteúdo de umidade entre 13% e 15%, o que possibilita a realização de estudos acerca de sua capacidade de absorção de água.

Para tornar as amostras mais apropriadas para as análises, foi necessário proceder com a secagem das mesmas, utilizando dois equipamentos distintos: uma estufa Fanem, modelo 315 SE, e uma balança infravermelha Gehaka, modelo IV 2500. Isso foi necessário para facilitar sua trituração para posterior utilização.

No método primário utilizado, foram empregados dois reagentes: ácido sulfúrico PA e hidróxido de sódio, além de um catalisador, composto por 96% de Sulfato de Potássio ( $K_2SO_4$ ) e 4 % de Sulfato de Cobre ( $CuSO_4$ ), com o objetivo de acelerar a digestão da amostra, permitindo a realização das análises em um intervalo de tempo reduzido. A tabela 1, apresentada a seguir, detalha as quantidades dos reagentes utilizados, com vistas a garantir a precisão na determinação do teor de proteína.

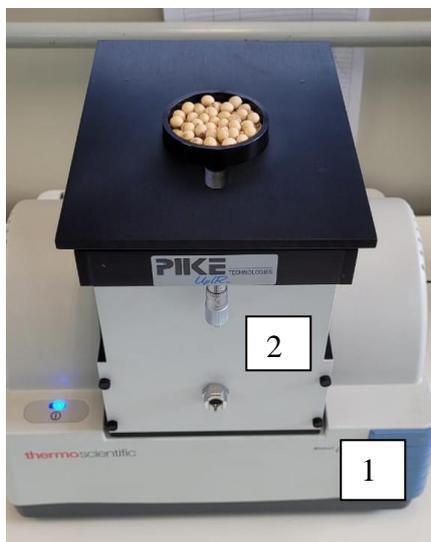
Tabela 1 – Reagentes Utilizados para Digestão da Soja Triturada

Reagente	Quantidade Utilizada
Grão de soja triturado	0,100 g
Catalisador	1,50 g
Ácido Sulfúrico PA	5,0 mL

Após esse período, os tubos são submetidos a uma reação com hidróxido de sódio (NaOH) em um destilador, gerando um subproduto, que será titulado com ácido clorídrico (HCl).

Para as análises no NIRS utilizou -se o equipamento espectrômetro do infravermelho próximo Thermo Scientific modelo Nicolet iS5N FT-NIR, acessório para leitura em reflectância (Figura 1), computador com softwares, TQ analyst e OMNIC

**Figura 1** – (1) Espectrômetro Nicolet iS5N FT-NIR; (2) acessório para leitura em reflectância



## Métodos

Para a caracterização da proteína, foi realizada uma análise primária, que foi a metodologia de Kjeldahl, e um método espectrométrico que foi a análise no NIRS.

Como mencionado anteriormente, foi realizada a secagem das amostras. Na estufa, foram realizadas seis repetições, cada uma com 10 g de soja foram deixadas para secar por aproximadamente 2 dias, em uma temperatura 105 °C.

Já na balança, foram feitas três repetições, cada uma com 10 g cada, e deixadas por 60 min a 105 °C, para que dessa maneira, a balança pudesse determinar a umidade relativa da soja, e ao mesmo tempo, seca-lá. Após o processo de secagem, parte das amostras foi armazenada para análise no NIRS, enquanto outra parte foi triturada para análises de nitrogênio pelo método de Kjeldahl.

Na análise de Kjeldahl, que quantifica o teor de proteína em alimentos, os grãos triturados são distribuídos em três tubos de ensaio, cada um contendo 1,5 g de catalisador, como apresentado na Figura 2. Vale ressaltar que um dos tubos serve como controle, branco, sem adição de soja, para seu valor de titulação ser descontado depois. Em seguida, é adicionado ácido sulfúrico PA a cada tubo, que são então colocados em um digestor por aproximadamente 2h.

Figura 2 - Tubos de Ensaio com Grãos de Soja Triturados para Digestão



Após esse período, os tubos são submetidos a uma reação com hidróxido de sódio (NaOH) em um destilador, gerando um subproduto que será utilizado para medir a quantidade de nitrogênio presente, como a figura 3 apresenta.

Figura 3 - Amostras Destiladas e Prontas para a Quantificação de Nitrogênio



Nesta metodologia, é realizado um cálculo previamente desenvolvido para achar a porcentagem de proteína, apresentado na figura 4 a seguir:

Figura 4 - Fórmula utilizada para calcular a porcentagem de proteína

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{K \times V \times \text{Fator}}{P}$$

No qual:

$K = Fc \cdot 0,0014 \cdot 100$

Fc = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N

P = massa da amostra em gramas

V = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação

Fator = fator de conversão de nitrogênio para proteína (varia conforme o alimento). Para o Grão de Soja, esse valor é de 5,71.

Para a preparação das amostras para análise de umidade, 100 g de soja seca foram umedecidas com 5, 10, 15 e 20 % de água destilada e deixadas por 2 horas até total absorção da água. Após este período as amostras foram analisadas via balança infravermelha e NIRS.

Para a análise no NIRS dois softwares foram utilizados para a obtenção dos espectros, usou-se o OMNIC, que apresenta o espectro da % reflectância em função do número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ), e o TQ ANALIST, para geração do modelo de calibração a partir dos espectros obtidos.

## Resultados e Discussão

A partir dos dados coletados, com 5 diferentes amostras de soja, foi possível chegar em diferentes valores de proteína para cada um dos grãos de soja, utilizando a metodologia de Kjeldahl para tal. A seguir, na tabela 2, é possível observar como a porcentagem proteica variou com a amostra estudada:

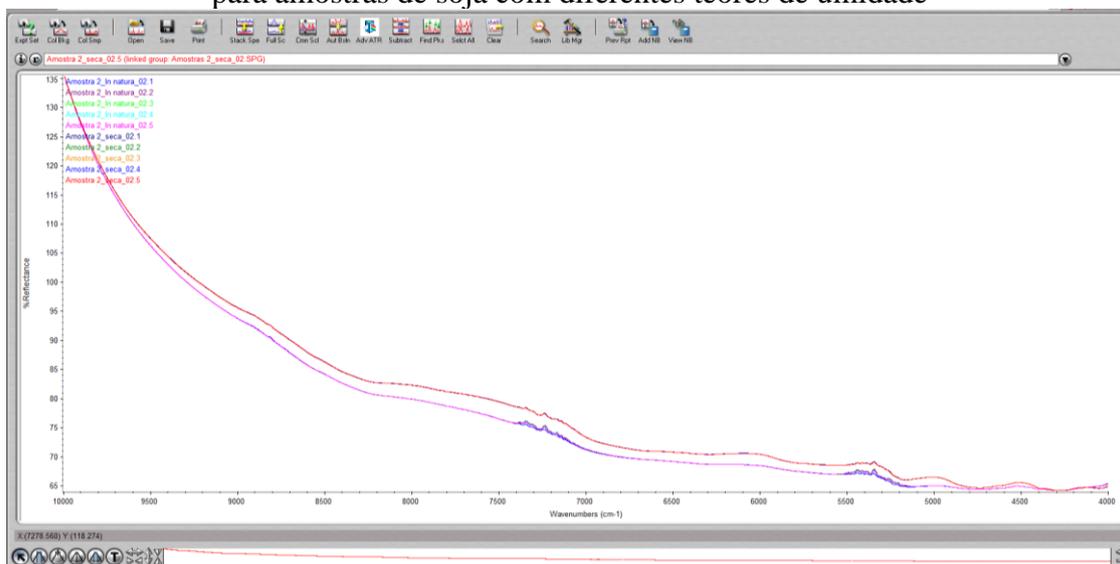
Tabela 2 - Relação entre Amostra de Soja e porcentagem proteica

Amostra de Grão de Soja	Porcentagem Proteica Obtida
1	29,26%
2	31,45%
3	32,04%
4	28,19%
5	29,48%

Esses resultados foram utilizados para o desenvolvimento do modelo de calibração no NIRS.

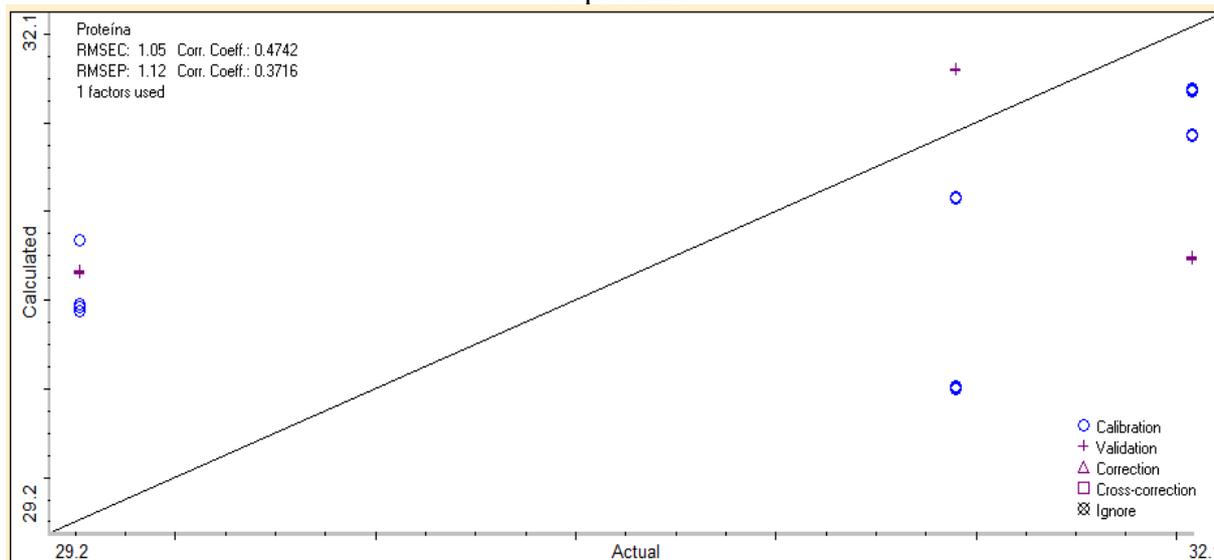
Em relação aos resultados obtidos do NIR, pode-se observar no aplicativo OMNIC a diferença das curvas entre a soja *in natura* (curva rosa) e a soja seca (curva vermelha) na Figura 5:

Figura 5 - Curvas de porcentagem de reflectância em função do número de ondas para amostras de soja com diferentes teores de umidade



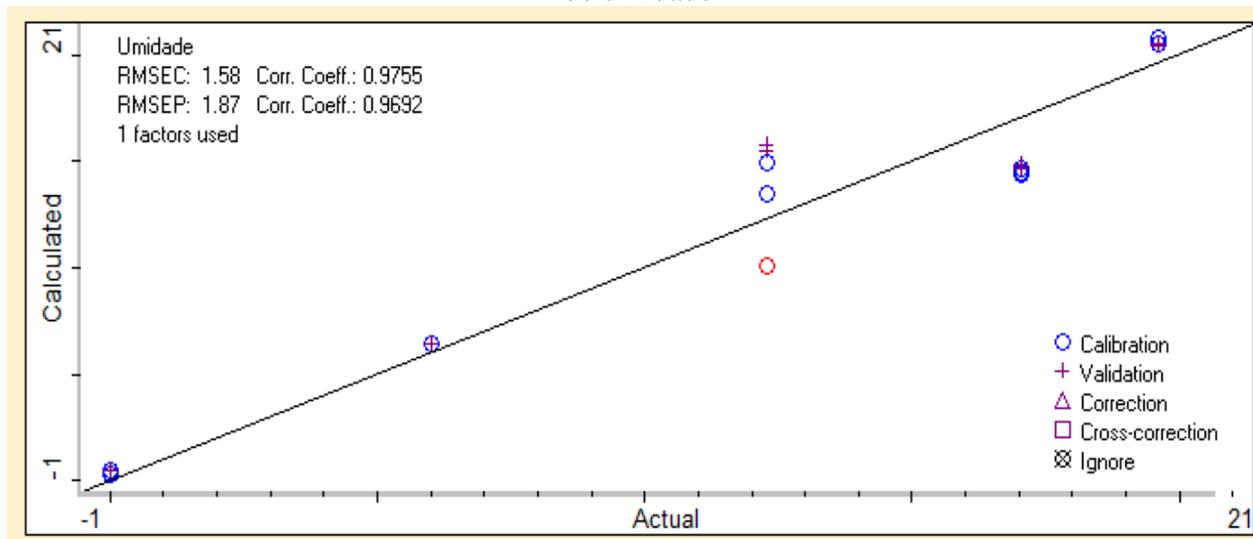
Além disso, com o software TQ Analyst, o estudo das curvas de calibração também foi possível, permitindo dessa maneira analisar a qualidade experimental de todos os dados obtidos, e dessa maneira, guiando quais deveriam ser os próximos passos a serem tomados e quais mudanças deveriam ser feitas. A figura 6 mostra um exemplo de modelo gerado com algumas amostras de soja:

Figura 6 – Modelo de calibração gerado a partir das diferentes amostras de soja para quantificação de proteína



A partir da análise apresentada na Figura 6, observa-se a viabilidade de gerar um modelo de calibração para a quantificação de proteína utilizando espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). Apesar do baixo coeficiente de correlação inicial, é notável o aumento na porcentagem de reflectância observada nos espectros obtidos. Para aprimorar o modelo, recomenda-se a aplicação de pré-tratamentos nos espectros, como o uso de derivadas de primeira ou segunda ordem, que podem reduzir ruídos e melhorar a separação dos sinais relevantes, otimizando a precisão e robustez da calibração.

Figura 7 – Modelo de calibração gerado a partir das diferentes amostras de soja para determinação de umidade



A partir da figura 7 é possível observar que é possível quantificar umidade em soja, com uma boa precisão. Ao se analisar o coeficiente de correlação obtidos, observa-se que os valores foram relativamente altos e RMSEP e RMSEC forma baixo o que demonstra um bom ajuste dos dados ao modelo. Porém mais pontos seriam interessantes para melhorar o modelo desenvolvido.

## Conclusões

Com base no trabalho desenvolvido, obtiveram-se resultados relevantes ao utilizar espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e o método Kjeldahl para quantificar proteínas em grãos de soja. Esse estudo destaca-se pela inovação ao aplicar a tecnologia NIR, que proporciona maior rapidez e praticidade na análise do teor proteico em comparação com métodos convencionais.

Os resultados indicaram que a espectroscopia NIR é uma técnica promissora para a quantificação dos teores de proteína e umidade em amostras de soja. Além disso, ela apresenta benefícios significativos, como a redução no consumo de reagentes químicos, contribuindo para a sustentabilidade ambiental, e a diminuição do consumo de energia elétrica. Essa abordagem otimiza os processos de segregação e rastreamento de lotes no período pós-colheita, trazendo ganhos de eficiência e sustentabilidade para o setor agrícola.

## Referências Bibliográficas

Hibbert, David B. (2016) *Vocabulary of concepts and terms in chemometrics*. N° 4. *Pure and Applied Chemistry*, **88**, 407-443.

*Introdução sobre espectroscopia*. [s.l.]: [s.n.], [data desconhecida]. Disponível em: <file:///C:/Users/gmari/Downloads/Introdução%20sobre%20espectroscopia%20(3).pdf>. Acesso em: 25 nov. 2024. PDF.

Pasquini, Celio (2018) Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives-A review . *Analytica chimica acta* **1096**, 8-36

Souza, A.M., Breitzkreitz, M.C., Filgueiras, P.R., Rohwedder, J.J.R. and Poppi, R.J., (2013) Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Química Nova*, **36**,1057-1065.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**. Método Kjeldahl. Disponível em: <<https://lume-re-demonstracao.ufrgs.br/composicaoalimentos/proteinas/kjeldahl.php>>. Acesso em: 25 nov. 2024.