

## Metodologia alternativa para determinação de teor de clorofila em soja

### RESUMO

Núbia Oliveira Silva  
[Nubia01595@gmail.com](mailto:Nubia01595@gmail.com)  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Campo  
Mourão, Paraná, Brasil.

Larissa Rocha  
[Larissa\\_cfd@hotmail.com](mailto:Larissa_cfd@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Campo  
Mourão, Paraná, Brasil.

Patrícia Valderrama  
[pativalderrama@gmail.com](mailto:pativalderrama@gmail.com)  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Campo  
Mourão, Paraná, Brasil.

Paulo Henrique Março  
[paulohmarco@gmail.com](mailto:paulohmarco@gmail.com)  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Campo  
Mourão, Paraná, Brasil.

Dada a importância mundial do cultivar soja, é imprescindível a aplicação de metodologias para o monitoramento eficiente dos parâmetros físico-químicos que determinam a qualidade dos grãos com agilidade e confiabilidade adequadas. Dentre os derivados de soja de grande valor comercial, pode-se mencionar a extração e comercialização do óleo. O teor de clorofila dos grãos influencia na qualidade e, conseqüentemente, no valor do óleo produzido. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias alternativas para esta finalidade pode trazer enormes benefícios. Este estudo propõe a utilização de Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) associada a métodos quimiométricos para construção de modelos multivariados capazes de determinar o teor de clorofila em soja. Para isto, foram avaliadas 246 amostras de soja da região noroeste do Estado do Paraná-Brasil, com resultados de teor de clorofila de 223 até 8.454 mg/kg (ppm). Os dados espectrais foram processados por meio do método PLS, onde o coeficiente de correlação foi de 0,8709, com RMSEC (Root Mean Square Error of Cross) 623,2972 e RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) de 621,9778. Os resultados sugerem que o modelo desenvolvido pode ser utilizado como uma metodologia alternativa para determinar o teor de clorofila em soja.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espectroscopia no infravermelho. Partial Least Square. Métodos quimiométricos.

## INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), por apresentar propriedades químicas e físicas muito importantes como fonte de matéria-prima para as indústrias alimentícias, possui potencial para exercer múltiplas funções em sistemas de produção. Devido a importância econômica, é necessário um rigoroso controle de produção dos grãos e dos padrões de comercialização, entretanto, a indústria tem apresentado problemas relacionados ao recebimento de grãos esverdeados (ARAUJO, 2014).

A coloração verde é devida a presença de clorofila em grãos colhidos ainda imaturos, e isso pode interferir na qualidade do óleo extraído, uma vez que é visível a coloração esverdeada comercialmente inadequada. Além de visualmente indesejável, a clorofila reduz a estabilidade oxidativa do óleo, levando a sua rancificação, o que reduz a eficiência do processo de hidrogenação (SINNECKER, 2002; BORRMANN, 2009). Outro ponto relevante, é que grãos imaturos apresentam um percentual de 2% a 3% menor de óleo em relação ao grão maduro, o que acarretará em uma maior acidez, além de ter um custo maior de refino e reduzindo o seu valor comercial (FRANÇA-NETO et al., 2012; MANDARINO, 2012).

Entretanto, análises físico-químicas tradicionais para manter o controle de qualidade dos grãos são demoradas, custosas, apresentam caráter destrutivo das amostras, além de gerarem resíduos químicos. Assim, a utilização de métodos ópticos, por suas diversas vantagens, se faz válida. O mais utilizado, dentre os métodos ópticos, é a espectroscopia na região do infravermelho, que se baseia na absorção de energia radiante, resultando em vibração molecular (PAULA et al., 2013). Para avaliar os resultados a partir de métodos ópticos a forma mais viável é através de métodos multivariados de análise, mais conhecidos como métodos quimiométricos complexos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; MARÇO, 2009; VALDERRAMA, 2009).

No caso de modelos para calibração multivariada, por se tratar de uma metodologia de ajuste linear das variáveis, o método quimiométrico mais aplicado é realizado por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*).

Deste modo, este trabalho tem como objetivo apresentar uma metodologia para determinação de teor de clorofila em soja utilizando a espectroscopia no infravermelho juntamente com o PLS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção da amostra de óleo de soja, foram fornecidas 246 amostras de diferentes cidades da região noroeste do Estado do Paraná. Cerca de 100 gramas da amostra foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 130°C por 1 hora. Em seguida as amostras secas foram trituradas em moinho de rotor (Marconi, modelo MA-090CFT), com mesh de 0,85 mm de abertura, e encaminhadas para análise em duplicata.

Para a quantificação da clorofila, utilizou-se a metodologia segundo a AOCS Official Method (1993), com aproximadamente 25 gramas da amostra e leitura de absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 630, 670 e 710 nm, em cubeta de 50 mm de caminho óptico.

Após a obtenção dos espectros, foi empregado o método quimiométrico de Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Para o tratamento dos dados foi empregado o software Matlab R2007b com as ferramentas do pacote PLS-Toolbox 5.2 (*Eingevector Research Inc.*). Utilizando para a construção do modelo PLS uma etapa de calibração e uma etapa de validação do modelo construído (KOWALSKI; BEEBE, 1987).

Posteriormente, a validação do modelo de calibração multivariada foi realizada através da determinação das figuras de mérito: exatidão, linearidade, ajuste, sensibilidade, sensibilidade analítica, limites de detecção e quantificação. Os cálculos foram realizados com base em trabalhos descritos na literatura (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). A relação de desempenho do desvio (RPD, *Residual Prediction Deviation*) foi avaliada de acordo com (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013).

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo multivariado e o valor tido como verdadeiro obtido pelo método de referência. Esse parâmetro é expresso através da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (RMSEC) e de Previsão (RMSEP) (MARTENS; NAES, 1996):

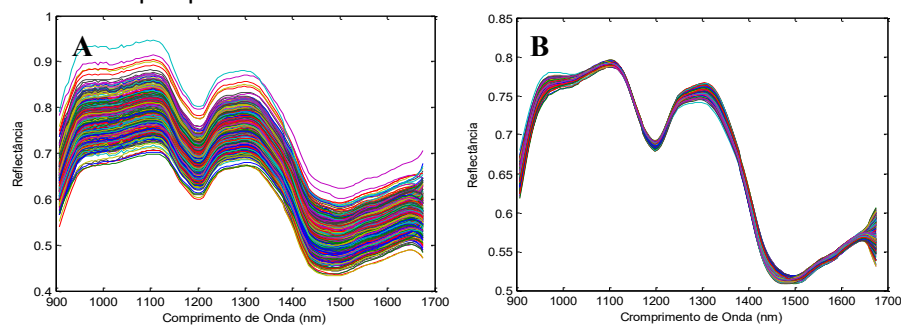
$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{nv} (y_i - \hat{y}_i)^2}{nv}} \quad (1) \quad RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{nc} (y_i - \hat{y}_i)^2}{nc}} \quad (2)$$

em que:  $y_i$  é o valor de referência,  $\hat{y}_i$  é o valor previsto pelo modelo multivariado,  $nv$  é o número de amostras na validação e  $nc$  é o número de amostras na calibração.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para determinação do teor de clorofila, os resultados obtidos através do método de referência, apresentaram variação extrema, com valores de 223 até 8.454 mg/kg (ppm). Os espectros obtidos no infravermelho próximo (NIR) da farinha de soja estão apresentados na Figura 1-A sem tratamento e 1-B com tratamento matemático.

**Figura 1:** (A) Espectros NIR das amostras de soja sem pré-tratamento e (B) Espectros NIR pré-processados.



A performance dos modelos desenvolvidos foi testada a partir dos valores das figuras de mérito, como mencionados anteriormente. Estes resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Figuras de Mérito do modelo PLS.

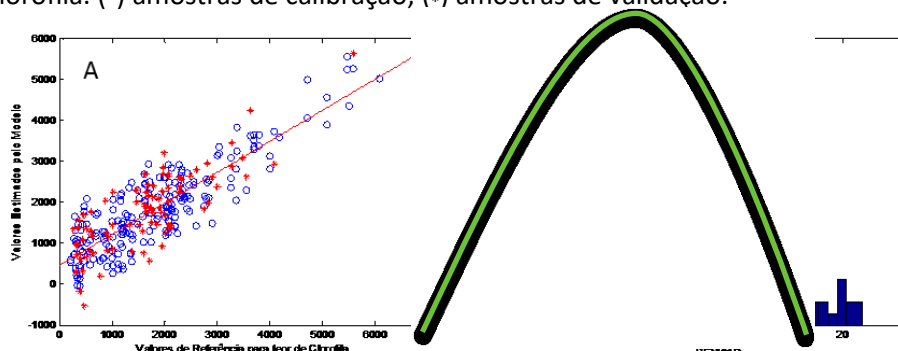
| Figuras de Mérito                  | Teor de clorofila       |
|------------------------------------|-------------------------|
| R <sub>cal</sub>                   | 0,8709                  |
| R <sub>val</sub>                   | 0,8073                  |
| RMSEC                              | 623,2972                |
| RMSEP                              | 621,9778                |
| Coeficiente de Correlação          | 0,8709                  |
| RPD <sub>cal</sub>                 | 1,5956                  |
| RPD <sub>val</sub>                 | 1,6295                  |
| Sensibilidade                      | 6,5675x10 <sup>-8</sup> |
| Sensibilidade Analítica            | 0,0033                  |
| Inversa da Sensibilidade Analítica | 300,6507                |
| Limite de Detecção                 | 992,1474 (ppm)          |
| Limite de Quantificação            | 300,65 (ppm)            |

Para avaliar o ajuste do modelo construído utiliza-se os parâmetros RMSEC e RMSEP, que são considerados indicadores de exatidão, porém são parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios, oriundos do método de referência. Sendo assim, um outro indicador de exatidão é a regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo, ou seja, o ajuste (R). O ajuste obtido para este modelo pode ser visualizado a partir da Figura 1, sendo o coeficiente de correlação de 0,8709. Esses resultados podem ser considerados adequados para estas previsões já que o método de referência apresentou ampla variação (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007a; FERREIRA; PALLONE; POPPI, 2013).

A linearidade do modelo PLS foi avaliada através do gráfico de resíduos (Figura 2-A). De acordo com os resultados é possível afirmar que os dados se ajustam a um modelo linear, pois a distribuição dos resíduos se assemelha a uma distribuição normal (Figura 2-B).

O valor de RPD do modelo de calibração (Tabela 1), foi de 1,6, sendo então considerado com uma capacidade preditiva do modelo satisfatória, já que de acordo com a literatura são classificados satisfatórios os que apresentam valores entre 2,4 e 1,5 (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013).

**Figura 2:** (A) Ajuste e (B) Resíduos do modelo PLS para determinação do teor de clorofila. (°) amostras de calibração; (\*) amostras de validação.



A sensibilidade e a sensibilidade analítica, considerando-se que a faixa de teor de clorofila utilizada no trabalho, variou de 223 até 8.454 mg/kg (ppm),



apresentaram resultados satisfatórios de  $(6,5675 \times 10^{-8})$  e  $(0,0033)$ , respectivamente. E pelo inverso da sensibilidade analítica foi possível fazer a distinção de amostras com diferença de teor de clorofila da ordem de 300,6507 mg/kg.

Os limites de detecção e quantificação do modelo foram de 992,1474 ppm e 300,65 ppm, respectivamente. Desta forma, a concentração mínima que pode ser medida confiavelmente pelo modelo empregando infravermelho é de 992,14 ppm, indicando que amostras abaixo deste teor podem ser medidas erroneamente. Como o limite de quantificação ficou em 300,65 ppm, significa que amostras que apresentem diferenças de concentração inferiores a esta não poderão ser diferenciadas. No entanto, como amostras com baixo teor de clorofila são desejadas pela indústria, os resultados sugerem a possibilidade de utilização de um modelo PLS como metodologia alternativa para determinação de teor de clorofila em soja sendo uma alternativa aos métodos convencionais com potencial para ser implementada para medidas em linha de produção.

## **CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos foi possível desenvolver uma metodologia alternativa para determinação de teor de clorofila de forma rápida, não destrutiva e não invasiva para amostras de soja. A utilização de espectroscopia no infravermelho próximo, aliada a métodos quimiométricos, se apresenta como uma alternativa aos métodos convencionais, com um grande potencial para aplicação em larga escala em indústrias alimentícias, uma vez que a metodologia proposta é rápida, não emprega reagentes/solventes e não gera resíduos tóxicos.

## Alternative methodology to determine chlorophyll content in soybean

### ABSTRACT

Given the worldwide importance of soybean cultivars, it is essential to apply methodologies for the efficient monitoring of the physico-chemical parameters that determine a grain quality with adequate agility and reliability. Among the derivatives of soy of great commercial value, one can mention an extraction and commercialization of oil. The chlorophyll content of the grains influences the quality and, consequently, no production value. In this way, the development of alternative methodologies for this purpose can bring huge. This study proposes the use of Near Infrared Spectroscopy (NIR) associated with chemometric methods for the construction of multivariate models capable of determining the chlorophyll content in soybean. For this, 246 soybean samples from the northwest region of the State of Paraná-Brazil were evaluated, with results of chlorophyll content from 223 to 8.454 mg / kg (ppm). The data were processed using the PLS method, where the correlation coefficient was 0.8709, with Root Mean Square Error of Cross (RMSEC) 623.2972 and RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) of 621.9778. The results showed that the model developed can be used as an alternative methodology to determine the content of chlorophyll in soybean.

**KEYWORDS:** Infrared spectroscopy. Partial Least Square. Chemometric methods.

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. M. V. **Indicadores de qualidade em grãos de soja submetidos a diferentes condições de armazenamento.** [s.l.] Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical. 84 p., 2014.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja.** [s.l.] Universidade de São Paulo Tese (Doutorado), Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos. 117 p., 2002.

BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1416–1422, 2013.

BORRMANN, D. **Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores.** [s.l.] Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 125 p., 2009.

FERREIRA, D. S.; PALLONE, J. A. L.; POPPI, R. J. Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIRS) application to estimate Brazilian soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] composition. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 53–58, 2013.

FRANÇA-NETO, J. B. . et al. Semente Esverdeada de Soja: Causas e Efeitos Sobre o Desempenho Fisiológico. **Circular Técnica 91 Embrapa**, p. 1–16, 2012.

KOWALSKI, B. R.; BEEBE, K. R. An Introduction to Multivariate calibration and Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 1007–1017, 1987.

MANDARINO, J. M. G. Grãos verdes: influência na qualidade dos produtos à base de soja - Série Sementes. **Circular Técnica 90 Embrapa**, p. 1–5, 2012.

MARTENS, H.; NAES, T. (1996). Multivariate calibration. **Wiley**: New York, 1996.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S. .; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.

PAULA, E. F. E. et al. Determinação da Qualidade da Carne com Uso da Espectroscopia de Reflectância. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 4, p. 301–307, 2013.

VALDERRAMA, P. **Calibração Multivariada de Primeira e Segunda Ordem e Figuras de Mérito na Quantificação de Enantiômeros por Espectroscopia.** [s.l.] Tese - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. 219 p., 2009., 2009.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B. .; POPPI, R. J. Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of**

---

**Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8331–8338, 2007a.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 259–266, 2007b.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da Arte de Figuras de Mérito de Calibração Multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.



**Recebido:** 31 ago. 2017.

**Aprovado:** 02 out. 2017.

**Como citar:**

ILVA, N. O.; ROCHA, L.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, P. H. Metodologia alternativa para determinação de teor de clorofila em sojan. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos**. Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>. Acesso em: XXX.

**Correspondência:**

Paulo Henrique Março

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, Via Rosalina Maria dos Santos, 1233 CEP 87301-899 Caixa Postal: 271 Campo Mourão – Paraná-Brasil..

**Direito autoral:**

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

