

COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS NITROGÊNIO DE KJELDAHL E NIRS PARA ANÁLISE DE PROTEÍNA BRUTA EM FARELO DE SOJA

VIANA, Valdomiro Teixeira¹

RU: 2801176

MACHADO, Fabio Pereira²

RESUMO

O presente trabalho, tem por objetivo identificar, através de um experimento, a coerência dos resultados das análises de proteína bruta em farelo de soja tostado, obtido através dos métodos analíticos Nitrogênio de Kjeldahl e Espectroscopia NIRS. Para isso, se fez necessário a compreensão dos principais aspectos envolvidos no experimento, desde a produção do farelo de soja, a utilização das análises químicas, uma descrição sucinta dos métodos e um levantamento dos principais interferentes na análise de proteína em cada um. Portanto uma pesquisa bibliográfica se fez necessário. Para o comparativo, utilizou-se, para este experimento, o teste de t de Student pareado, onde dez amostras foram analisadas nos dois métodos e os resultados foram comparados com o uso desta “ferramenta” estatística. Feitos os cálculos, concluiu-se que, para o conjunto de amostras analisados no experimento, os métodos produzem resultados estatisticamente idênticos, indicando que o método NIRS é confiável em relação ao método oficial Nitrogênio de Kjeldahl. Destaca-se que o experimento pode ser repetido com um número maior de amostras ou conjuntos de amostras ou ainda com análises de outras propriedades do produto para comparação do método NIRS com os métodos físico-químicos.

Palavras-chave: Nitrogênio de Kjeldahl. NIRS. Experimento. Comparativo. Controle de qualidade.

1. INTRODUÇÃO

O objetivo do experimento, foi verificar a confiabilidade do método alternativo NIRS em relação ao método oficial da AOCS (American Oil Chemists' Society), Nitrogênio de Kjeldahl na obtenção de proteína bruta em farelo de soja. Vários trabalhos trazem experimentos comparando os dois métodos, nos vários segmentos em que se aplicam.

Pode-se observar, na pesquisa de KRYEZIU et al., (2007) que, objetivou observar se o fabricante do equipamento NIRS, forneceu as calibrações capazes de produzir análises de proteína bruta em ingredientes de ração para aves, com a mesma precisão dos obtidos pelo método de Kjeldahl. Já ALMEIDA et al., (2016), traz um comparativo

entre os métodos Kjeldahl e elementar comparados com o método NIRS, na quantificação de Nitrogênio em amostras de solo.

Conforme exposto por PENERO, (2007), sobre a comparação dos métodos, apresenta que a Espectroscopia NIRS, mostrou-se adequada para análise de proteína, óleo e umidade em grãos de soja, no estado de Roraima, por apresentar resultados rápidos e por não destruir as amostras. O trabalho de JÚNIOR et al., (2006) avalia de forma positiva a utilização do NIRS em substituição ao método Kjeldahl para determinação da concentração de Nitrogênio total em grãos de soja.

Quanto ao tipo de pesquisa utilizado neste trabalho, trata-se de uma pesquisa qualitativa, miscigenando a bibliografia com coleta de dados do experimento, através da observação dos resultados obtidos nos dois métodos para compará-los. Desta forma, apresenta-se a seguir alguns aspectos relacionados à soja, as principais características do farelo de soja, uma descrição sucinta do método analítico Nitrogênio de Kjeldahl, identificando os possíveis erros de análise e do método NIRS, buscando elencar os possíveis erros e principais interferentes e ainda a aplicação do teste ***t de Student*** em um conjunto de dez resultados obtidos em cada método para uma mesma amostra.

A soja, é uma das principais fontes de proteína usada na alimentação animal, no Brasil e no mundo. No entanto, esta não pode ser usada *in-natura*, devido suas propriedades; presença de enzimas inibidoras da digestão. Portanto, esta é processada, da qual obtêm-se o óleo de soja e o farelo de soja (DE BRUM et al., 2006).

O óleo de soja é utilizado na alimentação humana e de animais e na produção de biodiesel, principalmente. O farelo de soja destina-se à alimentação animal, como ingrediente para a fabricação de rações. Entre a indústria esmagadora que processa a soja e comercializa o subproduto farelo e a fábrica de rações que o adquire como ingrediente, existe uma relação comercial. Diante disto, existe a necessidade que análises do produto sejam feitas para verificar se os níveis de garantia descritos no rótulo do produto serão atendidos, pois o fabricante faz a formulação da ração com bases nestes níveis, principalmente dos níveis de proteína que impactarão na nutrição dos animais que irão consumi-la; as análises do produto fazem parte do controle de qualidade da indústria. Os itens constantes como valores nutricionais no rótulo são, normalmente: umidade, proteína bruta, solubilidade, residual de óleo, fibras, cinzas e atividade ureática.

Todos os itens do rótulo precisam ser testados. No entanto, para este trabalho, devido a maior relevância perante os demais, buscou-se estudar mais a fundo as análises químicas do teor de proteína bruta em farelo de soja.

Diante disso, o presente trabalho busca comparar o método alternativo NIRS (*Near-Infrared Spectroscopy*) que em português significa espectroscopia no infravermelho próximo com o método oficial para análise de proteína bruta em farelo de soja da AOCS (American Oil Chemists' Society), Nitrogênio de Kjeldahl. O objetivo é identificar os possíveis erros que podem ocorrer nos dois métodos e ainda comparar os resultados obtidos nos dois métodos, com o uso de ferramentas estatísticas, nesse caso o teste de *t Student* pareado.

Para isso, foram coletados os resultados de 10 amostras analisadas nos dois métodos em uma indústria esmagadora de soja localizada no sudoeste do estado do Paraná, Brasil, no mês de setembro de 2021. A comparação entre os dois métodos pelo referido teste, mostrou-se satisfatório para o grau de liberdade utilizado e para o nível de confiança de 99%.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

Percebe-se a necessidade de abordar os principais pontos referentes ao processamento da matéria-prima; a soja, sobre o subproduto farelo de soja, e também comentar sobre as análises químicas e sobre os métodos utilizados no experimento. Para a realização do experimento utilizou-se o equipamento NIR DA700 da Perten instrumentos, para as análises via NIRS e um conjunto Macro-Kjeldahl para as análises no método Nitrogênio de Kjeldahl.

2.1 A Soja

Desde seu primeiro cultivo comercial, que se tem registro no Brasil, em Santa Rosa, Rio Grande do Sul, no ano de 1914, o cultivo de soja aumentou, fazendo tornar-se uma das principais *commodities* agrícolas do país (Dall'Agnol 2016). O Brasil é o principal produtor mundial de soja. De acordo com o terceiro levantamento da CONAB da safra 2020/2021, a produção nacional da oleaginosa atingiu 134.451,1 mil t (ACOMP, 2020).

Conforme apresentado por DALL'AGNOL, (2016), "a soja é proteína vegetal, que uma vez ingerida por humanos ou animais, transforma-se em proteína animal(...). Quase 70% do componente proteico de uma ração para animais produtores de carne, é soja".

De toda a soja produzida no Brasil, cerca de 45% é exportada, 10% ficam nos armazéns, e o restante é processada, sendo a maior parte com extração por solvente. Da

parte processada, obtêm-se cerca de 20% de óleo de soja degomado e 80% é o farelo de soja.

Antes do processo fabril em que se produz o óleo de soja e o farelo de soja, tem-se a necessidade de armazenar a oleaginosa em condições que assegurem a qualidade da matéria-prima. A umidade do grão é um parâmetro de grande importância para o armazenamento, pois se a umidade estiver acima de 13%, pode causar a queima dos grãos, prejudicando a qualidade do produto final, principalmente do óleo (MANDARINO, 2001).

2.2 O Farelo de soja

O farelo de soja é um dos principais subprodutos da soja. Utilizado em grande escala como ingrediente na formulação de rações para alimentação de ruminantes, aves e suínos.

O processo de esmagamento da soja pelo método extração por solvente Hexano (C_6H_{14}), começa com a recepção dos grãos, a limpeza, a secagem e o armazenamento. No processo de preparação, os grãos são quebrados em 8 partes, laminados e expandidos pela adição de vapor para melhorar a percolação do solvente. A soja expandida segue para o extrator, onde é banhada pelo solvente, obtendo-se duas frações: a miscela (mistura solvente com cerca de 30% de óleo de soja) e o farelo que vai para o DTSR (Dessolventizador, Tostador, Secador e Resfriador) onde é dessolventizado, tostado, secado e resfriado. Na etapa seguinte, é moído e armazenado (DE BRUM et al., 2006). Durante o processo fabril, faz-se necessário a realização de análises para verificar as propriedades do produto, dentre estas, destaca-se a análise de proteína bruta, a qual serve, também para determinar o tipo do produto, conforme a Tabela 01. Na indústria em que desenvolveu-se o experimento, produz-se farelo de soja tipo 02.

Tabela 01 – Tipos de farelo de soja tostado

	Teor de Proteína
Tipo 01	Mínimo 48%
Tipo 02	Mínimo 46%
Tipo 03	Mínimo 44%

fonte: Codapar (adaptado)

2.3 Química analítica – análises químicas

Historicamente, as análises químicas podem ser ilustradas com as técnicas utilizadas na antiguidade (Era antes de Cristo) para determinar a pureza de metais como o ouro e a prata. No mundo moderno, esse tipo de análise, continuou a desenvolver-se e atualmente faz parte do nosso cotidiano em vários aspectos, como a ciência dos materiais, ciência forense, biotecnologia, por exemplo e em vários aspectos comerciais (HAGE e CARR, 2012). Também, as análises químicas são uma ferramenta muito importante no controle de qualidade de diversos produtos, principalmente na área de alimentos.

Devida à grande diversidade de componentes dos materiais, dentro da química analítica, várias técnicas são necessárias, distribuídas em métodos analíticos que, para HAGE e CARR, (2012), podem ser divididos em três categorias: métodos clássicos, métodos instrumentais e métodos de separação.

Métodos clássicos: análise gravimétrica e titulação;

Métodos instrumentais: técnicas espectroscópicas, técnicas eletroquímicas e outras técnicas.

Métodos de separação: Catação, extrações, cromatografia entre outros.

Os métodos comparados neste trabalho são o Nitrogênio de Kjeldahl Total, método clássico de titulação e Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIRS), método instrumental espectroscópico.

Dentro dos tipos gerais de titulação, tem-se a titulação de retorno, usada caso a reação entre o analito e o titulante seja lenta ou não apresente uma constante de equilíbrio grande o suficiente (HAGE e CARR, 2012).

O método Nitrogênio de Kjeldahl, encaixa-se nesse tipo de titulação:

Nela, um excedente da quantidade conhecida de um reagente é adicionado a uma amostra para reagir com o analito. A quantidade de reagente que resta desse processo é, então, determinada por titulação. A diferença entre a quantidade original do reagente e a quantidade titulada serve para determinar quanto analito havia na amostra.

A titulação de retorno faz parte de uma importante técnica analítica conhecida como **Método de Kjeldahl**, usada para medir o teor de Nitrogênio em amostras orgânicas (HAGE e CARR, 2012, p. 287).

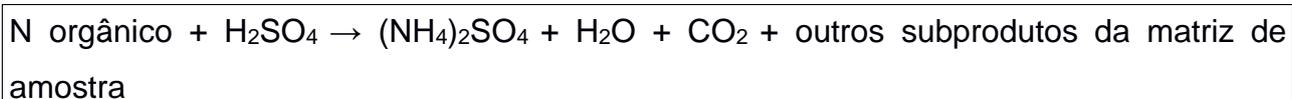
Para ambos os métodos, um item muito importante é a amostragem. O nível de dificuldade em obter-se uma boa amostra, depende do tipo de material que se está coletando; se for um líquido ou um gás, basta coletar uma quantidade suficiente para os

testes. Já para amostras sólidas, faz-se necessário observar como o analito está distribuído para obter uma amostra representativa. Um plano de amostragem deve ser adotado para cada estado físico, do tamanho da amostra e da uniformidade do material (HAGE e CARR, 2012). No caso do farelo de soja, para a obtenção de uma amostra representativa, é imprescindível que se faça o quarteamento da amostra.

2.4 Nitrogênio de Kjeldahl total

A determinação de Nitrogênio tem uma longa história na área de química analítica. Johan Kjeldahl apresentou pela primeira vez o método nitrogênio de Kjeldahl em 1883 (LABCONCO, 2005). Desde então, o método teve grande aceitação e atualmente é utilizado numa grande quantidade de produtos como alimentos e bebidas, carnes, rações, grãos, águas, residuais, solos, dentre outros (LABCONCO, 2005). sobre a sua importância, HAGE e CARR (2012) traz que: “o método de Kjeldahl é provavelmente a mais comum de todas as titulações ácido base em laboratórios modernos”. A aceitação pode ser comprovada pelo fato de ter se tornado o método oficial de várias associações, dentre elas a AOCS (*American Oil Chemists' Society*) ou em português (Sociedade Americana dos químicos de óleo), que é a associação que determina as metodologias oficiais para análises em óleos e gorduras e derivados.

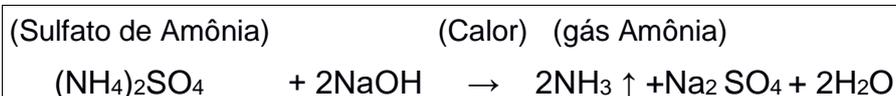
O método consiste em três fases: digestão, destilação e titulação. Na digestão, ocorre a decomposição do Nitrogênio (N) na forma orgânica, utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, em alta temperatura (a cima do ponto de ebulição do $\text{H}_2\text{SO}_4 \approx 337^\circ\text{C}$), na presença de catalisadores (TEIXEIRA *et al.*, 2017). O resultado final da digestão é uma solução de sulfato de amônio (NH_4^+), que ao resfriar, formam-se cristais que, necessitam ser dissolvidos com água destilada, antes da alcalinização, pois o ácido presente no cristalizado, sem a diluição pode causar uma reação violenta com o Hidróxido de Sódio. Um exemplo básico, da equação geral da digestão é mostrado abaixo.



Equação geral da digestão (Fonte: Labconco, 2005(adaptado))

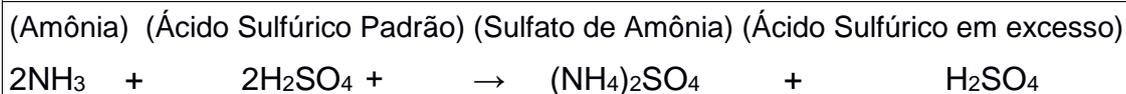
Na fase da destilação, o Nitrogênio amoniacal que se encontra em meio ácido, é destilado a vapor, após alcalinização com hidróxido de Sódio (NaOH), fazendo com que o NH_4 seja convertido em Amônia (NH_3), (AOCS, 2004). Por fim, a amônia é arrastada pelo vapor d'água, condensada e coletada em uma ¹solução de ácido sulfúrico de volume e concentração conhecidos, na presença do indicador vermelho de Metila. Pérolas de vidro são adicionadas aos frascos com o objetivo de diminuir a tensão, principalmente no final da destilação, onde a solução fica mais concentrada. Em alguns produtos, pode ocorrer a formação de espuma, nesse caso, adiciona-se um agente antiespumante como a glicerina, por exemplo.

A seguir, tem-se uma representação do que ocorre no processo de destilação.



Representação do processo de destilação (Fonte: Labconco, 2005(adaptado))

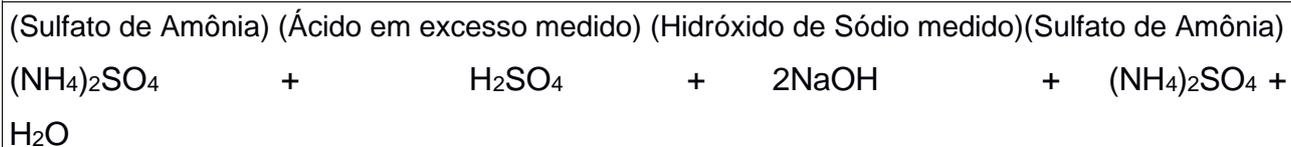
Para determinar a quantidade de Nitrogênio presente na amostra, titula-se o excesso do ácido que recebeu o destilado, com solução de Hidróxido de Sódio NaOH 0,1 mol/L padronizada. Para poder realizar os cálculos, faz-se necessário a realização de uma prova em branco (AOCS, 2004). No esquema abaixo, ainda antes da titulação de retorno, onde a amônia é capturada em uma solução ácida de concentração conhecida e em excesso, fazendo com que o pH foque baixo, não mudando de cor.



Captura da amônia em solução ácida conhecida (Fonte: Labconco, 2005(adaptado))

Na fase da destilação de retorno, o excesso de ácido sulfúrico é titulado com uma solução alcalina, de concentração conhecida, normalmente Hidróxido de Sódio, medindo o volume gasto com o uso da bureta. Ocorre a mudança de cor no final da titulação. Abaixo, um esquema representa a destilação.

¹ Alguns procedimentos utilizam ácido bórico em substituição ao ácido sulfúrico, nesse caso, a titulação é direta.



Esquema da titulação de retorno (Fonte: Labconco, 2005(adaptado))

2.4.1 Interferentes no processo de análises

Em um laboratório de análises, deve-se, também ter um controle de qualidade que possibilite verificar se um teste está funcionando corretamente, desta forma, deve-se ter uma forma de verificação do método, que, para o Nitrogênio de Kjeldahl, pode ser a análise de um produto com quantidade de Nitrogênio conhecida e ou análises interlaboratoriais, bem como elencar os possíveis erros e interferentes. Para tanto, HAGE e CARR, (2012), apresentam que: “(...) ferramenta valiosa é uma lista das principais fontes de erros que podem existir em um método, acompanhada de uma descrição de como cada erro afetará a qualidade das medições”.

Assim como em qualquer procedimento analítico, no método Nitrogênio de Kjeldahl, é de suma importância que seja realizado por analistas devidamente treinados e capacitados; a falta de preparo do analista pode ser considerado um interferente. Assim também, o processo de preparação da amostra, onde deve-se observar detalhes de quarteamento, homogenização e moagem em granulometria recomendada. É importante que os equipamentos utilizados estejam em perfeitas condições e as vidrarias utilizadas devem ser calibradas.

Tanto no preparo das soluções quanto no desenvolvimento da marcha analítica, utiliza-se água destilada. Esta, por sua vez deve ser de boa qualidade; livre de dureza. Portanto, esta necessita ser avaliada frequentemente através do teste de dureza, pois uma água de má qualidade, pode ser considerada um dos grandes interferentes nos resultados. Os reagentes utilizados necessitam ter alto grau de pureza e o preparo e padronização de soluções precisam ser feitos como acurácia.

2.5 Espectroscopia

A espectroscopia refere-se ao campo da ciência que trata da mensuração e da interpretação da luz que é absorvida ou emitida por uma amostra(...), envolve o uso de um espectro que é o padrão que se observa quando a luz é separada em suas diversas cores ou bandas espectrais(...).

A espectroscopia é uma das ferramentas analíticas mais utilizadas em análises químicas(...). A forma mais comum de classificar técnicas espectrométricas é fazê-lo de acordo com o tipo de radiação empregada e a maneira como a radiação reage com a matéria (HAGE e CARR, 2012, p. 405).

Os métodos espectroscópicos mais comuns são: Espectroscopia RMN (ressonância magnética nuclear), ESR(ressonância de *spin* eletrônico), de micro-ondas, de infravermelho, de UV-visível, de raios X e de raios gama. A figura a seguir (Imagem 01) é uma representação do espectro eletromagnético da luz, em relação ao comprimento de onda.

Imagem 01 – Espectro eletromagnético

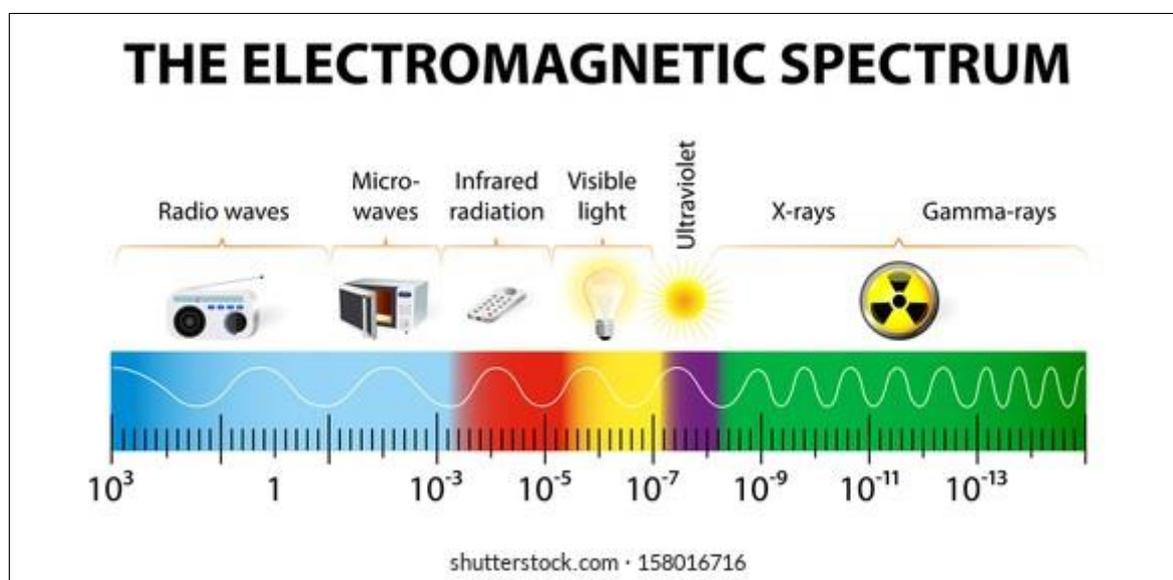


Imagem 01 – Representação do espectro eletromagnético da luz. (Fonte: SHUTTERSTOCK)

Para este trabalho, utilizou-se de um equipamento NIRS(*Near Infrared Spectroscopy*), que, traduzido para o português, (espectroscopia no infravermelho próximo)(HAGE e CARR, 2012). Este método ganhou muito espaço nos laboratórios nas últimas décadas em análises de processa industriais e de controle de qualidade. Faz-se importante destacar que dentro da Espectroscopia no infravermelho, tem-se ainda as técnicas MIRS (*Middle Infrared Spectroscopy*) e FIRS (*Far Infrared Spectroscopy*) que, em português significam, respectivamente (Espectroscopia no Infravermelho Médio e Espectroscopia no Infravermelho Distante).

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) é um tipo de espectroscopia que emprega energia de fótons ($h\nu$) na faixa de energia de $2,65 \times 10^{-19}$ a $7,96 \times 10^{-20}$ J, que corresponde à faixa de comprimento de onda de 750 a 2.500 nm

(números de onda: 13.300 a 4.000 cm^{-1}). Essa faixa de energia é maior do que o necessário para promover moléculas apenas para seus estados vibracionais excitados mais baixos (através de um transição vibracional fundamental) e menor do que o típico valores necessários para a excitação de elétrons em moléculas (PASQUINI,2003).

Esse tipo de espectrometria utiliza luz infravermelha para estudar ou medir substâncias químicas, pois quando uma molécula absorve a luz infravermelha, essa absorção baseia-se em uma mudança de energia devido a vibrações ou rotações que ocorrem na molécula, sendo dois tipos básicos de vibração o estiramento (envolve a distância interatômica ao longo do eixo da ligação) e o dobramento (envolve a mudança no ângulo entre as ligações) entre os átomos (D'OCA, 2021). A espectroscopia no infravermelho próximo, é uma técnica particularmente útil para o estudo quantitativo de substâncias orgânicas, embora o espectro contenha essencialmente informações dos grupos **C – H**, **N – H**, **O – H**, e **S – H** (TIBOLA, et al., 2018). Possui como características, a preparação mínima da amostra, com alta penetração do feixe de sondagem, rápido, não destrutivo e não invasivo, possui grande aplicação, num vasto número de materiais (PASQUINI, 2003).

Devido à grande abrangência e o alto número de publicações sobre o tema, em 1993, foi lançado o primeiro periódico inteiramente dedicado à técnica NIR o *Journal of Near Infrared Spectroscopy* (PASQUINI, 2003).

Sobre a interação eletromagnética que ocorre entre a luz infravermelha e as ligações químicas, D'OCA (2021) apresenta que, “uma molécula orgânica pode conter várias ligações diferentes. Todas essas ligações vibrarão naturalmente em determinada energia e conseqüentemente, diferentes ligações vibrarão em diferentes frequências”.

À temperatura ambiente, a maioria das moléculas está em seus níveis fundamentais de energia vibracional. Átomos ou grupos de átomos que participam de ligações químicas estão se deslocando um em relação ao outro em uma frequência que é definida pela força da ligação e pela massa dos átomos ligados individuais ou seus grupos. As amplitudes dessas vibrações são de alguns nanômetros e aumentarão se alguma energia for transferida para a molécula. Essa energia pode ser transferida de um fóton de um determinado comprimento de onda (PASQUINI, 2003).

A incidência do feixe de luz sobre a superfície da amostra pode provocar os fenômenos de reflexão, transmissão, refração, difração e absorção da luz incidente. Em amostras sólidas, os grânulos atuam como ponto de espalhamento, afetando a interação

luz/ partícula, com os grânulos vizinhos. Para captar os sinais de resposta, os equipamentos NIR são normalmente equipados com detectores baseados em materiais fotocondutores de silício que, possuem alta detectividade e alta velocidade de resposta. Já a fonte de radiação é uma bobina de Tungstênio ou uma lâmpada halógena (PASQUINI, 2003).

A dificuldade encontrada durante a pesquisa bibliográfica, referente a metodologia NIRS, foi de não encontrar conteúdo explicando como os sinais absorvidos são convertidos em valores matemáticos, para a geração dos resultados.

Para D'OCA (2021), "o tamanho do átomo, o comprimento e a força da ligação variam de molécula para molécula, portanto a frequência com que uma ligação específica absorve a radiação infravermelha será diferente em uma variedade de ligações e modos de vibração".

Um fator determinante nesse tipo de análise é a calibração do equipamento. Sobre isso, TIBOLA, et al. (2018), dispõe que "a metodologia NIRS demanda o desenvolvimento de equações de calibração, utilizando-se os resultados obtidos nos métodos de referência, a partir da mesma amostra". No caso do equipamento utilizado no experimento, para a análise de proteína, o método de referência é o Nitrogênio de Kjeldahl.

2.5.1 interferentes no processo de análise via NIRS

Deve-se considerar que o espectro no infravermelho próximo é dependente de parâmetros físicos da amostra como granulometria, polimorfismo, solventes residuais, umidade, temperatura, pressão, densidade, textura superficial,,,,,, compactação que, além da preparação da amostra, podem ser considerados como interferentes no processo de análise, tornando inviável uma comparação direta entre os espectros, no entanto, é possível estimar propriedades físicas e químicas de um vasto número de materiais.

2.6 Vantagens e desvantagens em cada método

Pode-se perceber que cada método possui características e interferentes distintos, conforme apresentado na tabela 02.

Método	Vantagens	Desvantagens	Interferentes
--------	-----------	--------------	---------------

Nitrogênio de Kjeldahl	<ul style="list-style-type: none"> • Método oficial da AOCS; • Confiabilidade; • Menor número de interferentes; 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo demorado (6 Horas, aproximadamente). • Destruição da amostra; • utilização de reagentes químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparação da amostra; • Grau de treinamento dos analistas; • Equipamentos; • Reagentes e soluções;
Espectroscopia NIRS	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido (em torno de um minuto); • Não destrói a amostra; • Não utiliza reagentes; • Análises de vários parâmetros ao mesmo tempo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior número de interferentes; • Pode apresentar resultados incoerentes quando apresentar-se diferente das amostras usadas na calibração. • Equipamento de custo elevado 	<ul style="list-style-type: none"> • Parâmetros físicos da amostra como a granulometria, por exemplo; • Grau de treinamento dos analistas;

Tabela 02 – Principais vantagens e interferentes em cada método. (Fonte: o autor).

2.7 Teste *t* de Student

Sempre que terminamos uma análise, necessitamos avaliar se os resultados estão coerentes, ou pode ter ocorrido algum erro durante a marcha analítica ou na metodologia adotada. Portanto, devemos recorrer a algumas ferramentas da estatística.

Alguns requisitos gerais necessitam ser levados em conta quando compara-se dados. Os itens básicos que se necessita quando utiliza-se estatística para comparar dados experimentais, são quatro: um modelo, a hipótese, o nível de confiança, e a estatística de teste. O **modelo** pode ser uma equação, uma distribuição prevista, valores obtidos em outro método ou o valor conhecido de um padrão de referência. A **hipótese** é o palpite ou questionamento sobre os resultados do teste estatístico. O **nível de confiança** representa o grau de certeza que deseja-se usar na comparação. A última parte é a **estatística de teste** que é um valor numérico calculado a partir dos dados para uso na comparação. Um exemplo bastante usado em estatística é o teste *t* de Student (HAGE e CARR, 2012).

De acordo com MERCÊ (2012, p. 44), “Este método avalia se medidas originadas de diferentes amostras ou de amostras iguais, porém analisadas por métodos diferentes, pertencem ao mesmo conjunto ou universo, validando as análises efetuadas”.

O teste t de Student foi desenvolvido por um químico alemão chamado Willian S. Gosset, porém o resultado de seus estudos foram autorizados a serem divulgados como pseudônimo *Student*, em 1908 (HAGE e CARR, 2012). Ele criou um novo tipo de distribuição de dados associados a uma distribuição normal por meio de um valor de t , calculado para amostras de vários tamanhos e graus de liberdade como pode ser observado na tabela 03. O nível de confiança, por sua vez é o grau de certeza que se gostaria de ter de que a resposta estará dentro do cálculo do intervalo de confiança. A escolha do nível de confiança pode desempenhar grande impacto sobre o conjunto de resultados que pode-se obter para o intervalo de confiança. Por exemplo, um nível de confiança de 90% produzirá um intervalo de confiança menor que 99%.

Graus de liberdade (f)	Nível de Confiança		
	90%	95%	99%
1	6,31	12,7	63,7
2	2,92	4,30	9,92
3	2,35	3,18	5,84
4	3,13	2,78	4,60
5	2,02	2,57	4,03
6	1,94	2,45	3,71
7	1,90	2,36	3,50
8	1,86	2,31	3,36
9	1,83	2,26	3,25
10	1,81	2,23	3,17
11	1,80	2,20	3,11
12	1,78	2,18	3,06
13	1,77	2,16	3,01
14	1,76	2,14	2,98
15	1,75	2,13	2,95
16	1,75	2,12	2,95
17	1,74	2,11	2,92
18	1,73	2,10	2,88
19	1,73	2,09	2,86
20	1,72	2,09	2,85

∞	1,64	1,96	2,58
---	------	------	------

Tabela 03 – valores t de Student em diferentes graus de liberdade – fonte: (HAGE e CARR, 2012, pg. 74)

De acordo com o tipo de dados que deseja-se comparar, há uma forma diferente de aplicar o teste t de Student, podendo ser a comparação de um resultado experimental a um valor de referência e a comparação de dois ou mais resultados experimentais, este por sua vez subdivide-se em resultados individuais e grupos de valores.

Comparação por grupo de valores se faz quando dois conjuntos de amostras idênticas são analisados por métodos diferentes. Nesse caso, a comparação é feita pelo **teste t de Student pareado** (este é o método utilizado neste experimento). Para isso, faz-se uma lista dos resultados obtidos pelos dois métodos e apresentados lado a lado para cada amostra. Com isso é possível calcular a diferença para cada par de resultados e consequentemente a diferença média (\bar{d}) entre os dois métodos (HAGE e CARR, 2012).

Para determinar se a diferença média entre os dois conjuntos são significativas, determina-se o desvio padrão para essas diferenças (s_d), através da fórmula: $s_d = \sqrt{\frac{\sum(d_i - \bar{d})^2}{(n-1)}}$, onde d_i é a diferença entre os dois métodos, \bar{d} é a média das diferenças e n é o número de amostras.

Na sequência, calcula-se o desvio padrão da diferença média ($s_{\bar{d}}$).

$$s_{\bar{d}} = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

A partir daí, é possível calcular o valor t de Student com a seguinte fórmula:

$$t = \frac{|\bar{d}|}{s_{\bar{d}}}$$

De posse do valor de t , é necessário comparar como o valor de crítico da tabela 01 conforme o nível de confiança desejado e ($f=n-1$), graus de liberdade, onde n é o número de pares de dados comparados. Se o valor de $t \leq t_c$, pode-se afirmar que os dois métodos produzem valores estatisticamente idênticos (HAGE e CARR, 2012).

3 EXPERIMENTO

Para a realização do experimento, foram utilizadas dez amostras de farelo de soja produzido em diferentes turnos de trabalho entre os dias 02/09/2021 e 05/09/2021. As

análises foram realizadas por quatro analistas diferentes, nos dois métodos: Nitrogênio de Kjeldahl e NIRS.

Na metodologia NIRS, o equipamento utilizado foi o NIR DA700 da Petern Instrumentos. Nesse método, foram utilizadas as amostras em sua forma integral; sem terem sido moídas. A marcha para cada amostra foi rápida, em torno de um minuto para cada parcial, nas quais a amostra foi homogenizada, acondicionada em recipiente próprio do equipamento e com o auxílio de uma régua, removeu-se o excesso do produto, deixando uma superfície plana e homogenea, livre de grânulos desproporcionais ou partes faltantes (“buracos”). Na sequência, aplicou-se um código para a amostra e deu-se o comando para a realização da leitura pelo equipamento. Os resultados foram apresentados na tela, em torno de seis segundos após dado o comando. Os resultados de cada parcial, foram anotados em planilha própria e calculou-se a média das três parciais para cada amostra, sendo este o resultado obtido para cada uma.

Como na metodologia NIRS as amostras não são destruídas, fez-se primeiro as análises nesta metodologia, na sequência, seguiu-se para a moagem de parte da amostra para a realização das análises físico-químicas, dentre elas a de proteína bruta.

No Kjeldahl, foi realizado apenas um ensaio para cada amostra. O equipamento utilizado foi um conjunto macro-Kjeldahl, com balões de Kjeldahl de 800 ml, no qual pesou-se 1,1700 gramas de farelo de soja moído com granulometria 0,5mm, transferido para o balão de 800ml, na presença de uma mistura catalítica de 1,05g de Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 12,05g de Sulfato de Sódio Anidro (Na_2SO_4), adicionados 30ml de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) e colocado para digerir por duas horas. Após o resfriamento (em torno de uma hora), ocorreu a formação de cristais, que, foram dissolvidos adicionando ao balão, 400ml de água destilada. Quando já dissolvidos os cristais, adicionou-se 80ml de Hidróxido de Sódio 50% (NaOH) e colocado para a destilação. Previamente, foi preparado em copo de becker de 600ml, 40ml de solução de ácido sulfúrico 0,1 mol/L coletados com pipeta volumétrica e adicionados 100ml de água destilada e de 4 a 5 gotas de indicador vermelho de metila. A solução do becker fica posicionada de forma a receber o precipitado da destilação. Atingidos 400ml de destilado no becker, retirou-se e foi realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1mol/L até a viragem da cor rosa para amarela. Realizou-se de igual forma as provas em branco. Por fim, fez-se os cálculos:

Proteína total = $\underline{Pb - Pr \times 0,8755} \times Fc$, Onde:

Pa

Pb = Valor gasto na prova em branco;

Pr = Valor gasto na prova real (com amostra);

0,8755 = Valor usado para conversão do Nitrogênio em proteína para farelo de soja;

Pa = Peso da amostra;

Fc = Fator de correção das soluções quando houver, obtido na padronização.

Esta marcha analítica foi repetida para as dez amostras de farelo, em turnos e por analistas diferentes. Os resultados obtidos nos dois métodos, para cada amostra, estão dispostos na tabela 04.

Amostra	Método		Diferença(%)
	NIRS(% de proteína total)	Kjeldahl(% de proteína total)	
02/09 – T2	46,02	45,75	0,27
02/09 – T3	45,85	45,80	0,05
03/09 – T1	46,25	46,24	0,01
03/09 – T2	45,85	45,83	0,02
03/09 – T3	45,55	44,89	0,66
04/09 – T1	46,27	46,26	0,01
04/09 – T2	45,93	45,03	0,9
04/09 – T3	45,83	45,10	0,73
05/09 – T1	46,02	45,68	0,34
05/09 – T2	45,50	45,34	0,16
		Diferença média (\bar{d})	0,315
		Desvio Padrão (s_d)	0,330
		Desvio Padrão da diferença média ($s_{\bar{d}}$)	0,106
		Valor de t	2,980

Tabela 04 – resultados das análises (fonte: o autor)

Os resultados foram colocados lado a lado, na tabela 04, com isso calculou-se a diferença para cada par de resultados e conseqüentemente a diferença média do conjunto de amostras entrada foi de (0,315).

de posse deste valor, calculou-se o desvio-padrão para estas diferenças:

$$sd = \sqrt{\frac{\sum(d_i - \bar{d})^2}{(n-1)}} \rightarrow sd = \sqrt{\frac{(0,27-0,315)^2 + (0,05-0,315)^2 + (0,01-0,315)^2 + \dots}{(9)}}$$

$$sd = \sqrt{\frac{(1,0118)}{9}} \rightarrow sd = 0,33$$

De posse do valor do desvio-padrão, calculou-se o desvio-padrão da diferença média:

$$s_{\bar{d}} = \frac{sd}{\sqrt{n}} \rightarrow s_{\bar{d}} = \frac{0,33}{\sqrt{10}} \rightarrow s_{\bar{d}} = \frac{0,33}{3,16} \rightarrow s_{\bar{d}} = 0,106$$

Na sequência, calculou-se o **valor de t**:

$$t = \frac{|\bar{d}|}{s_{\bar{d}}} \rightarrow t = \frac{|0,315|}{0,106} \rightarrow t = 2,98$$

Calculando os graus de liberdade (f) para o experimento: $f=(n-1) \rightarrow f=10-1 \rightarrow f=9$. Portanto, este experimento possui 9 graus de liberdade.

De posse do valor de **t**, comparou-se com o valor crítico da **tabela 03**(t_c), para o nível de confiança de 99%. O valor encontrado na tabela foi 3,23. Comparou-se se $t \leq t_c \rightarrow 2,98 \leq 3,23$. O resultado da comparação deu afirmativo; o valor encontrado para t , para do conjunto de amostras analisados é menor que o valor crítico da tabela referência (Tabela 03). Portanto, pode-se dizer que os dois métodos produzem valores estatisticamente idênticos para o nível de confiança de 99%.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho, foi possível descrever os métodos Nitrogênio de Kjeldahl e Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS), utilizados em análises de proteína bruta em farelo de soja.

Levantou-se as principais características de cada método, as vantagens e desvantagens de cada um. Através da comparação estatística dos resultados obtidos pelos dois métodos, utilizando a técnica do **teste de t pareado**, foi possível observar que para o conjunto de amostras analisados, os dois métodos produzem resultados estatisticamente idênticos, levando-se em consideração que foram utilizados nove graus de liberdade e o nível de confiança de 99%.

Nota-se que cada método tem suas particularidades e seus possíveis interferentes. Diante disso, percebe-se a possibilidade de adotar o **teste de t pareado** na rotina do laboratório, para comparar os métodos frequentemente. Desta forma, quando houver

divergências de resultados, pode-se iniciar uma investigação para compreender as possíveis causas do desvio, que podem ser para a técnica NIRS: alteração na granulometria do produto, excesso de umidade, residual de solvente, alto teor de fibras ou calibração do equipamento desacertada. Já no Kjeldahl pode ser: Solução contaminada ou fora do padrão, problemas no equipamento ou qualidade da água destilada.

Neste trabalho, limitou-se em verificar os métodos na análise de proteína bruta em farelo de soja. No entanto, sugere-se que mais pesquisas sobre o tema sejam realizadas, como a repetição do experimento com outros conjuntos de amostras de farelo de soja, utilizando outros lotes de soluções e também, envolver outras análises como teor de umidade, residual de óleo, fibras e cinzas, que, também podem são realizadas na metodologia NIRS e físico-química, para o mesmo produto.

REFERÊNCIAS

ACOMP. **Safra brasileira de grãos**, v.8 – Safra 2020, n. 3 – Terceiro levantamento, Brasília, Dezembro 2020.

Disponível em: (<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>) Acesso em: 22 de dez. de 2020

ALMEIDA, G. et al, **Métodos kjeldahl, elementar e o potencial da espectroscopia do infravermelho próximo para determinação de nitrogênio em solos da bacia do acre**, Biota Amazônia open journal system – Universidade Federal do Amapá,2016. Disponível em: <<https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/2147>>. Acesso em: 08 de mar. de 2021.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, 2004.

DALL'AGNOL, AMÉLIO. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília, DF: Embrapa 2016.

Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1043614/1/LivroEmbrapaSojadesenvolvimentoBROL.pdf>>
Acesso em: 22 de dez. de 2020

DE BRUM et al. **Características Nutricionais da Soja Desativada por Diferentes Processos Térmicos para Alimentação de Frangos de Corte** –Comunicado técnico, Embrapa dez 2006. disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/86301/1/DCOT-451.pdf>>
Acesso em: 12 de out. de 2021.

D'OCA, Caroline Da Ros Montes. **Ferramentas espectroscópicas na análise de compostos orgânicos: Uma aproximação descomplicada** [livro eletrônico]. Intersaberes, Curitiba, 2021.

HAGE, Davis S., CARR, James D. **Química analítica e análise quantitativa** 1.ed. São Paulo, Pearson Prentice Hall, 2012.

JÚNIOR, A. et al. **Avaliação da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) para determinação da concentração de nitrogênio total em amostras de grãos de soja**, Congresso Brasileiro de Ciência do solo, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/232875401_Statistical_procedure_to_test_identity_between_analytical_methods>. Acesso em: 12 de fev. de 2021.

KRYEZIU, A. et al, **Comparison of commercial near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibrations and standard chemical assay procedures for prediction of crude protein levels in poultry feed ingredients**, 16th European Symposium on Poultry Nutrition – Estrasburgo, França – 2007. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/268519542>>. Acesso em: 08 de mar. de 2021.

LABCONCO. **A guide to Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus**, ExpotechUSA, Houston, Texas, USA, 2005. Disponível em: <<http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>> Acesso em: 02 de Jun. de 2021.

LIMA. de, et. Al. **Atividade ureática**. Revista eletrônica Nutritime, artigo 145 v.08, nº05 p.1606 – 1611 setembro/outubro 2011.

Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/145V8N5P16061611SET2011_.pdf>

Acesso em: 30 de dez. de 2020.

MANDARINO, José Marcos Contijo, ROESSING, Antônio Carlos. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Embrapa soja, 2001. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO/18455/1/doc171.pdf>>

Acesso em: 13 de Jan. de 2022.

MERCÊ, Ana Lúcia Ramalho. **Iniciação à química analítica quantitativa não instrumental** [livro eletrônico] Intersaberes, Curitiba, 2012.

PASQUINI, Celio, **Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications**, Journal of the Brazilian Chemical Society, Campinas – Sp, Brasil, 2003. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Near-Infrared-Spectroscopy%3A-fundamentals%2C-practical-Pasquini/0b7f6cf5caabe75a63fec4778926e371e015976a>>

Acesso em: 14 de Jan. de 2022.

PENERO, J. **Determinação de proteína, óleo e umidade por espectroscopia NIR em grãos de soja no estado de Roraima**, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufrb.br:8080/jspui/handle/prefix/67>>. Acesso em: 18 de fev. de 2021.

SHUTTERSTOCK. **Imagens de Electromagnetic spectrum**. Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/pt/search/electromagnetic+spectrum>> Acesso em: 12 de Nov. 2021

TEIXEIRA, Paulo César et al. **Manual de métodos de análise de solo – Embrapa**, Brasília, DF 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085209/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>>. Acesso em: 15 de Nov. de 2021

TIBOLA, Salete Casiane..[et al.] Editores técnicos, **Espectroscopia no Infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos**. Embrapa, Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193539/1/ID44539-2018LVespectroscopia.pdf>> Acesso em: 07 de Set. de 2021.