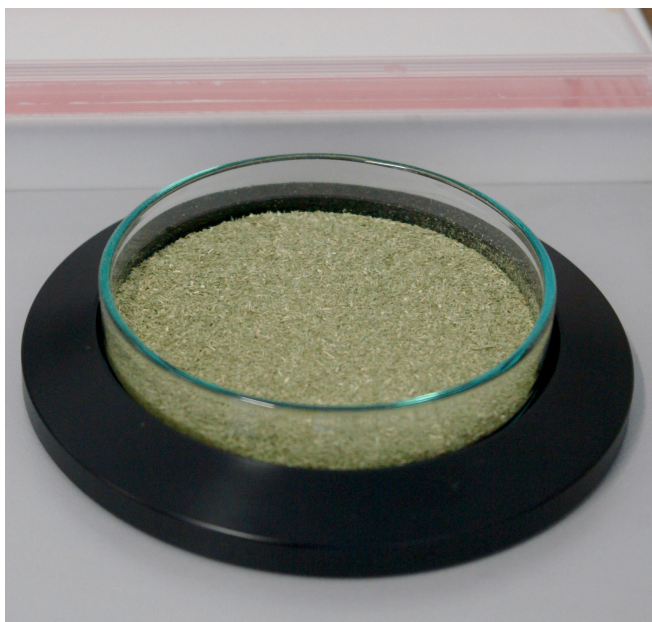


Foto: Maria Lúcia F. Simeone



Predição do teor de proteína bruta em biomassa de capins braquiária por meio de espectroscopia NIR

Miguel Marques Gontijo Neto¹
Maria Lúcia Ferreira Simeone²
Cristiane de Carvalho Guimarães³

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) tem sido reconhecida com uma valiosa técnica para determinar com acurácia a composição química de um grande número de forragens (SHENK; WESTERHAUS, 1994). Essa técnica analítica, quando associada a métodos quimiométricos, é conhecida por ser rápida, precisa, não destrutiva, de baixo custo e amplamente utilizada para análise rotineira de vários produtos agrícolas, incluindo gramíneas forrageiras (NORRIS et al., 1976; SINNAEVE et al., 1994).

Nesse sentido, a técnica NIR tem sido adotada como método oficial, método 930.03, pela Association of Official Analytical Chemists, para a predição do teor de proteína bruta em forragens (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984).

A determinação da composição química das frações que compõem as plantas forrageiras é de fundamental importância para a previsão do desempenho

animal, para a melhoria da qualidade das cultivares em programas de melhoramento genético e para o desenvolvimento de diferentes sistemas de produção.

Segundo Euclides et al. (2009), o aumento da produção de forragem depende da adequada disponibilidade de nutrientes, dentre os quais se destaca o nitrogênio. A adubação nitrogenada estimula o crescimento mais rápido das plantas forrageiras e altera suas características nutricionais, principalmente o teor de proteína das plantas.

O objetivo desse trabalho foi ajustar um modelo de calibração multivariada para a predição do teor de proteína bruta em biomassa de capins braquiária por meio da espectroscopia NIR.

Materiais e métodos

Preparo das amostras de biomassa de braquiária e análise do teor de proteína total

As amostras de forragens de capim foram coletadas em três ensaios conduzidos na área experi-

¹Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Forragicultura e Pastagem, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, miguel.gontijo@embrapa.br

²Química, D.Sc. em Química Orgânica, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, marialucia.simeone@embrapa.br

³Química, M.Sc. em Departamento de Química, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, cristiane.guimaraes@embrapa.br

mental da Embrapa Milho e Sorgo, localizada no município de Sete Lagoas-MG, com as coordenadas geográficas latitude de 19°29.106´ S e longitude de 44°10.773´ W e altitude de 708 m. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico típico (LVd). O clima da região é o Aw (Koppen).

As amostras foram coletadas entre os anos de 2010 e 2012 em ensaios avaliando sistemas de integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF). As amostras utilizadas neste trabalho foram selecionadas de um universo que contemplava: pastagens implantadas solteiras e em sistemas de consórcio com milho ou sorgo forrageiro; sistema integrado envolvendo as culturas do milho, capins e eucalipto; diversas cultivares de braquiárias (*Brachiaria brizantha* cvs. Marandú, Xaraés e Piatã; *B. ruziziensis* e *B. decumbens*); pastagens de primeiro e segundo ano após a implantação e amostradas em diferentes épocas do ano; pastagens submetidas a condições de pleno sol e sob sombreamento moderado; pastagens submetidas a diferentes estratégias de manejo; e amostras compostas por diferentes componentes morfoanatômicos da planta (planta completa, lâminas foliares, pseudocaule e material morto). Assim, foram selecionadas 232 amostras de capins do gênero braquiária buscando-se maior representatividade das amostras para a realização das análises do teor de proteína bruta.

O método de referência utilizado para a determinação do teor de nitrogênio total foi o método de Dumas e o teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator 6,25 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). O equipamento utilizado para a realização das análises foi o Analisador de Nitrogênio, modelo FP-528, marca LECO (Leco Corporation St. Joseph, MI). O método de Dumas consiste na oxidação total da amostra na presença de oxigênio 99,99995% a 800 °C, seguida de redução dos óxidos de nitrogênio e detecção do nitrogênio molecular produzido por um detector de condutividade térmica.

Análise das amostras de biomassa braquiária por espectroscopia no infravermelho próximo

As amostras de braquiária constituídas por planta completa, lâminas foliares, pseudocaule (colmo mais bainhas foliares) e material morto foram

secas a 65 °C até peso constante e trituradas em moinho de facas tipo Willey, utilizando peneira de 2 mm. Os espectros das amostras foram obtidos em equipamento BUCHI, modelo NIRFlex 500 (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland) equipado com detector de InGaAs, utilizando como porta-amostra uma placa de Petri de vidro borossilicato. O equipamento foi calibrado utilizando o padrão Spectralon®. Os espectros das amostras de braquiária foram obtidos em triplicata, na região 4.000 a 10.000 cm⁻¹ (1.000-2.500 nm), com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras por espectro.

Os valores de proteína obtidos pelo método de referência foram utilizados para desenvolver o modelo de calibração multivariada. Nesse processo, utilizou-se o software Unscrambler® versão 10.2, (CAMO PROCESS AS, Oslo, Norway). As amostras foram divididas em dois conjuntos: 152 para calibração e 80 para validação externa após análise exploratória (PCA).

Como pré-tratamento dos espectros, estes foram convertidos em logaritmo ($\log_{10} = 1/R$, sendo R o valor obtido para cada comprimento de onda), centrados na média e correção da linha de base pelo método MSC. Em seguida aplicou-se o modelo de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). Os indicadores estatísticos utilizados para estimar a qualidade dos modelos foram: RMSEC, RMSECV, RMSEP, SEP, BIAS e R².

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para o teor de proteína utilizando o método de Dumas variaram entre 1,81 a 14,94%, com valores médios de 7,75%, cujos valores representaram a faixa de amostragem para o desenvolvimento do modelo de calibração multivariada.

A sensibilidade do método de referência foi avaliada pela análise de uma amostra controle (padrão certificado de alfafa) repetida 5 vezes, obtendo-se desvio padrão 0,08 e CV 0,02%.

A Figura 1 apresenta os espectros NIR das amostras de braquiária após a aplicação dos pré-processamento sobre os espectros originais.

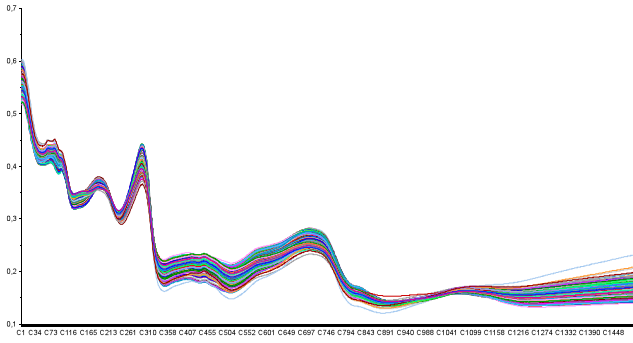


Figura 1. Espectros das 232 amostras de braquiária.

A calibração multivariada foi desenvolvida utilizando o método PLS e validação cruzada. A escolha do número de fatores foi por meio da resposta de maior variância e o menor valor de RMSECV. Os escores e o peso de cada modelo também foram avaliados, sendo que o melhor resultado foi encontrado com 5 fatores (Figura 2).

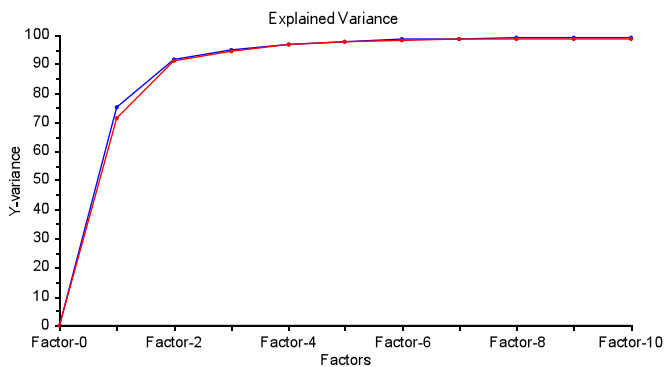


Figura 2. Variância explicada em função do número de fatores

Podemos observar que o modelo PLS ajustado (Figura 3) apresentou as amostras distribuídas de forma aleatória em torno da reta linear, indicando ser adequado aos dados.

Na Tabela 1, pode-se observar os parâmetros de qualidade obtidos na calibração, validação cruzada e previsão utilizando o modelo PLS. O coeficiente de determinação (R^2) obtido na calibração foi 0,9786 indicando que o modelo possui alta correlação entre os dados preditos e de referência.

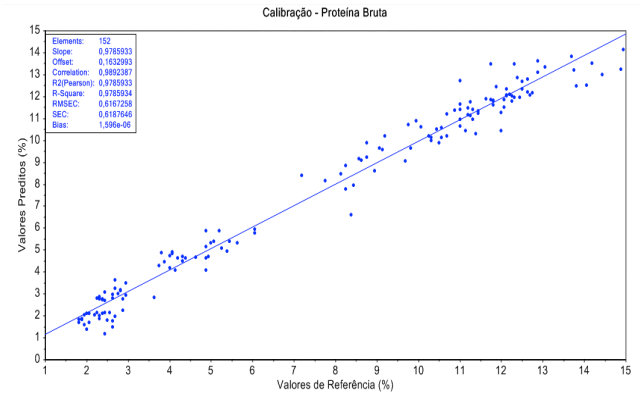


Figura 3. Gráfico de calibração para os teores de proteína bruta de amostras de braquiária.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade do modelo de calibração e validação externa (previsão) para proteína em amostras de braquiária.

Parâmetro estatístico	Resultados
RMSEC	0,6167
R^2 Calibração	0,9786
RMSECV	0,6496
R^2 Validação cruzada	0,9771
RMSEP	1,022
R^2 Predição	0,9418
SEP	1,0302
BIAS	0,0341

A acurácia do modelo desenvolvido pode ser avaliada pelos parâmetros obtidos para RMSEC (Calibração), RMSECV (Validação Cruzada) e RMSEP (Validação Externa), que apresentaram valores muito próximos (Tabela 1; Figuras 3 e 4). Obteve-se uma boa correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores do método de referência para os teores de proteína, com um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9786$ para as amostras do conjunto de calibração, $R^2 = 0,9771$ para as do conjunto de validação cruzada e $R^2 = 0,9418$ para as predições dos teores de PB de amostras externas à calibração. Realizou-se também a análise de correlação de Pearson entre os métodos NIR e o de referência. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

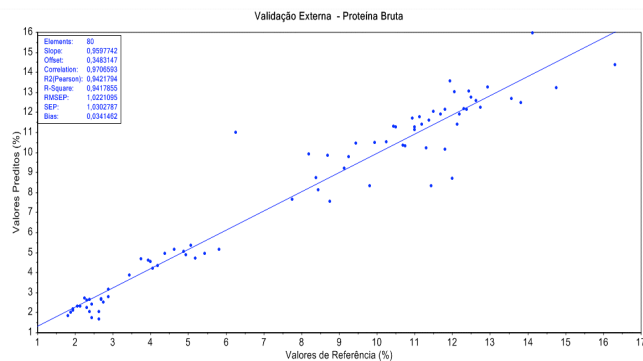


Figura 4. Gráfico de validação externa para os teores de proteína bruta de amostras de braquiárias.

Foi obtido um alto coeficiente de correlação Pearson, $r=0,9786$, indicando que os métodos de referência e NIR são comparáveis, com desvio padrão e valores médios muito próximos.

Esses dados são comparáveis aos de outros trabalhos de pesquisa utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo para a realização da análise do teor de proteína em braquiária (MARTEN et al., 1985; SHENK; WESTERHAUS, 1994; OLIVEIRA, 2008; Del SANTO et al., 2010).

Conclusões

O modelo de calibração multivariada NIR obtido para a análise do teor de proteína em biomassa de braquiária foi considerado adequado. Poderá ser adotado como método de rotina de análise, em substituição ao método de Dumas.

A análise de proteína utilizando a técnica de espectroscopia NIR permite que um maior número de amostras possa ser analisado a um custo menor, quando comparada ao método de Dumas, possibilitando que a área experimental possa ser monitorada com maior frequência.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14th ed. Arlington: AOAC International, 1984.

Del SANTO, V.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; PICCHI, C. M. C.; GARCIA, C. H. Determinação das propriedades das forrageiras por meio de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS), In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE MÉTODOS DOS LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, 2010, Pelotas, RS. **Novas perspectivas para os laboratórios da Embrapa**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; VALLE, C. B. do; DIFANTE, G. S.; BARBOSA, R. A.; CACERE, E. R. Valor nutritivo da forragem e produção animal em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 98-106, 2009 .

MARTEN, G. C.; SHENK, J. S.; BARTON II, F. E. **Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality**. Washington: USDA, 1985. 110 p.

NORRIS, K. H.; BARNES, R. F.; MOORE, J. E.; SHENK, J. S. Predicting forage quality by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43 p. 889-897, 1976.

OLIVEIRA, D. A. **Características produtivas e valor nutritivo num ano de recuperação do capim-braquiária com aplicações de nitrogênio e enxofre**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SINNAEVE, G.; DARDENNE, P.; AGNEESESENS, R.; BISTON, R. The use of near infrared spectroscopy

Tabela 2. Análise de correlação entre a composição de proteína em braquiária determinada por NIR e pelo método de referência.

Parâmetro (%)	Nº de amostras	Coeficiente de Correlação de Pearson (r)	Amplitude (%)		Média (%)		Desvio Padrão (%)	
			Referência	NIR	Referência	NIR	Referência	NIR
Proteína	152	0,9786	1,81- 14,94	1,85-14,39	7,75	7,90	4,19	4,14

for the analysis of fresh grass silage. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Sussex, v. 2, p. 79-84, 1994.

SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O. The application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: FAHEY JR., G. C. **Forage quality evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 406-449.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes pela bolsa do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) e financiamento parcial do projeto e à Fapemig pela bolsa de Iniciação Científica BIC-Jr.

Lista de abreviaturas e siglas

BIAS – Erro sistemático

CV – Coeficiente de variação

MSC – Efeito Espalhamento Multiplicativo (do inglês *Multiplicative Scatter Correction*)

NIR - Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês *Near Infrared Spectroscopy*)

PCA – Análise de Componentes Principais (do inglês *Principal Component*)

PLS – Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares*)

R² – Coeficiente de determinação

RMSEC – Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (do inglês *Root mean Square Error of Calibration*)

RMSECV - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (do inglês *Root mean Square Error of Cross Validation*)

RMSEP - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Predição (do inglês *Root mean Square Error of Prediction*)

SEP – Erro Padrão de Predição (do inglês, *Standard Error of Prediction*)

SD – Desvio Padrão (do inglês, *Standard Deviation*)

Comunicado Técnico, 205

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
 Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
 Fone: (31) 3027 1100
 Fax: (31) 3027 1188
 E-mail: sac@cnpms.embrapa.br
 1ª edição
 1ª impressão (2012): on line

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Hebert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização Bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento das ilustrações: Alexandre Esteves
Editoração eletrônica: Alexandre Esteves