



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

ISSN 1217-1981

Dezembro, 2009

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 9

Predição de Proteína, Matéria Seca
e Fósforo em Grãos de Milho pela
Espectroscopia de Reflectância
no Infravermelho Próximo

Miguel Marques Gontijo Neto
Maria Lúcia Ferreira Simeone
Cristiane de Carvalho Guimarães
Fátima Vilaça Vasconcelos
Mariana Arão Uba

Sete Lagoas, MG
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caixa Postal 151

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino

Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos

Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Communique Comunicação

1ª edição

1ª impressão (2009): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo

Predição de proteína, matéria seca e fósforo em grãos de milho pela espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo / Miguel Marques Gontijo Neto ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2009.
19 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1217-1981; 9).

1. Milho. 2. Zea mays. 3. Valor nutritivo. 4. Composto orgânico. 5. NIRS. I. Gontijo Neto, Miguel Marques. II. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

Sumário

Resumo.....	5
Introdução	6
Material e métodos	7
Resultados e discussão	10
Conclusão	16
Agradecimentos	17
Referências	18

Predição de Proteína, Matéria Seca e Fósforo em Grãos de Milho pela Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Próximo

Miguel Marques Gontijo Neto¹
Maria Lúcia Ferreira Simeone²
Cristiane de Carvalho Guimarães³
Fátima Vilaça Vasconcelos⁴
Mariana Arão Uba⁵

Resumo

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de curvas de calibração por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) para os teores de matéria seca, proteína e fósforo em amostras de milho processado. Neste trabalho, foi utilizada a espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier aplicando a técnica de reflectância difusa, cujos dados espectrais foram correlacionados aos valores nutricionais do milho através do método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) e diferentes pré-tratamentos matemáticos nos espectros. Para a construção de modelo de calibração, foram utilizados os dados de referência de análises químicas dos valores do teor de matéria seca, proteína bruta e fósforo (P) de 191 amostras de milho em grão de diferentes procedências e variedades. Destas amostras, 114 foram usadas

¹Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo – mgontijo@cnpms.embrapa.br

²Analista Embrapa Milho e Sorgo – malu@cnpms.embrapa.br

³Assistente Embrapa Milho e Sorgo – cris@cnpms.embrapa.br

⁴Estudante de Agronomia - FEAD, Bolsista Embrapa

⁵Estudante de Zootecnia - FEAD, Bolsista PIBIC FAPEMIG/CNPq/Embrapa

para o modelo de calibração, 48 para validação. A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo, associada ao método de calibração multivariada (PLS), é uma técnica alternativa viável para a determinação do teor de proteína total e matéria seca em amostras de milho moído. As curvas ajustadas para proteína bruta, matéria seca e fósforo apresentaram performance adequada para utilização em amostras provenientes de ensaios de screening ou onde se tem grande número de repetições de amostras por tratamentos. Para utilização em determinações analíticas, como método de rotina laboratorial, os modelos de calibração devem ser aprimorados.

Introdução

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tem sido desenvolvida desde 1980, com o intuito de relacionar a composição de um alimento com sua absorção no infravermelho próximo, podendo assim prever sua composição, a digestibilidade e o teor de energia metabolizável, dentre outras variáveis inerentes ao alimento (NICK, 1989; PASQUINI, 2003; PEDROL; ROBUTTI, 1993; VALDES; LEESON, 1991).

O espectrofotômetro de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) trabalha na região espectral, que é o segmento do espectro eletromagnético com comprimento de ondas entre 700 e 2500 nm. Aliado a um software quimiométrico, o equipamento permite a identificação, qualificação e quantificação de compostos orgânicos nos alimentos.

Para se obter sucesso na utilização desta tecnologia, é necessário seguir algumas etapas, como: seleção e variabilidade das amostras, aquisição dos resultados analíticos por métodos convencionais, leitura espectral, tratamento matemático dos espectros obtidos, determinação das equações, validação da curva de calibração e, finalmente, a implantação de uma rotina analítica (SHENK; WESTERHAUS, 1994).

Para muitas aplicações há uma relação direta entre os níveis dos constituintes químicos existentes no milho e seu valor relativo para usos na alimentação e industrial. Assim, a possibilidade de utilizar uma técnica não destrutiva, rápida e sem a utilização de produtos químicos na determinação desses constituintes torna-se de grande importância para o programa de melhoramento genético, pois possibilita que grande número de amostras sejam analisadas com menor tempo e custo por análise.

A precisão dos modelos de calibração pode ser expressa por meio do erro padrão de validação cruzada (EPVC), do coeficiente de determinação (R^2), do coeficiente de regressão (b) e da relação de desempenho do desvio (RDD), sendo desejável obter um modelo de calibração com baixo EPVC, elevado R^2 e RDD superior a 3 (WILLIAMS, 2001), além do coeficiente de regressão próximo a 1.

Nesse trabalho, objetivou-se o desenvolvimento de curvas de calibração por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo para os teores de matéria seca, proteína e fósforo em amostras de milho processado.

Material e Métodos

Amostras

Na construção dos modelos de regressão, foram usadas 191 amostras de milho moído, oriundos de parcelas colhidas na safra 2007/2008 nos Ensaio Nacional Sul, Ensaio Elite Centro e Ensaio Elite Híbrido Centro Alto, conduzidos pela equipe responsável pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. As amostras foram pré-secas em estufa ventilada a 65 °C por 48 horas. Para a obtenção das amostras de milho moído, estas foram homogeneizadas em moinho de facas com peneira de 1 mm de tamanho de abertura de poro.

Análises químicas

O método de referência utilizado para a determinação do teor de proteína total foi o de Kjeldhal (CUNNIFF, 1995). Foi determinado o teor de nitrogênio total e o teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator 6,25. Para a determinação de matéria seca, as amostras de grãos de milho moído foram secas em estufa a 105 °C por 24 horas. Em seguida, foram pesadas em balança analítica para a determinação do teor de matéria seca.

Para a determinação do teor de fósforo total, utilizou-se o método espectrofotométrico azul de molibdênio após a digestão nitro-perclórica das amostras de milho. As leituras do teor de fósforo das amostras de milho foram efetuadas em espectrofotômetro de UV-Vis a 420 nm (CUNNIFF, 1995).

Espectroscopia no infravermelho próximo

Os espectros de reflectância na região do infravermelho próximo foram coletados em um espectrômetro NIR FLEX 500 Buchi, sendo realizadas 3 repetições para cada amostra, com resolução de 4 cm⁻¹, 32 varreduras para cada espectro e a região espectral foi de 4.000 a 10.000 cm⁻¹, (2.500 - 1.000 nm). O equipamento apresenta precisão de 2 cm⁻¹ para comprimentos de onda absoluto e reprodutibilidade relativa de 0,5 cm⁻¹ entre 4000 a 10000 cm⁻¹. Para a obtenção dos espectros, foram utilizadas aproximadamente 20 g de grãos de milho inteiro ou 4 g de milho moído. Os espectros foram obtidos em sala com temperatura de 23°C.

Pré-tratamento dos espectros e ajuste do modelo de calibração

A escolha da região espectral foi realizada após a avaliação do melhor conjunto de comprimentos de onda que permitiram ao modelo de calibração minimizar os erros de previsão. Na tentativa de minimizar os efeitos aleatórios ou sistemáticos indesejáveis de diferentes origens, foram

empregadas técnicas de tratamento matemático nos espectros antes da construção do modelo propriamente dito. Foram utilizados os seguintes tratamentos em cada espectro, de acordo com o modelo desenvolvido: correção multiplicativa de sinal (MSC) (MARTENS; NAES, 1989) para minimizar os efeitos de espalhamentos de luz e a derivada primeira para a correção de deslocamento de linha de base. Foram também avaliados ajustes de calibração considerando diferentes faixas de espectro previamente selecionadas.

O software NirCal 4.21 Buchi® foi utilizado para desenvolver e selecionar os pré-tratamentos dos dados, os modelos para calibração e, posteriormente, para testar e validar o modelo de calibração ajustado.

Os métodos de ajustes de regressão multivariados PLS (Quadrados Mínimos Parciais - Partial Least Squares) e PCA (Análise dos Componentes Principais - Principal Components Analysis) foram avaliados considerando a leitura da reflectância para cada comprimento de onda (a cada 4 cm⁻¹ dentro da faixa de 4.000 a 10.000 cm⁻¹) para cada uma das amostras utilizadas para calibração. O objetivo foi encontrar uma relação entre a matriz (X), contendo os valores de reflectância dos espectros das amostras, e o vetor que armazena as respectivas concentrações (y). O resultado é uma equação semelhante ao modelo $Y = Xb + e$; onde b é o vetor de regressão e e é o vetor que representa os erros do modelo.

O número ótimo de fatores componentes da regressão foi obtido avaliando-se a soma dos quadrados do erro residual predito (SQERP, do inglês PRESS - Predictive residual error sum of squares). A SQERP mostra a soma do quadrado dos desvios entre os valores preditos e referência.

I – Desvio: a média do desvio entre o valor predito (y_n) e o valor atual (x_n) no conjunto de dados da calibração.

$$Desvio = \frac{1}{N} \sum (x_n - y_n)$$

II – Erro padrão de calibração (EPC): desvio padrão da diferença entre o valor de referência e o resultado obtido pelo NIRS no conjunto de dados da calibração.

$$EPC = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x_n - y_n - \text{Desvio})^2}$$

III – Erro padrão da validação cruzada (EPVC): desvio padrão da diferença entre o valor de referência e o resultado obtido via NIRS no conjunto de dados da validação.

$$EPVC = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x_n - y_n - \text{Desvio})^2}$$

IV – A qualidade do conjunto de dados obtidos para a calibração quantitativa é descrita pelo coeficiente de regressão (b) e é definido como:

$$b = \frac{\sum x \cdot y - \frac{(\sum x)(\sum y)}{N}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}} \sqrt{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{N}}}$$

onde x_n representa o valor verdadeiro, y_n o valor predito,

Resultados e Discussão

Os valores obtidos pelos métodos de referência para os teores de proteína, nas amostras de milho utilizadas neste trabalho, estão compreendidos entre 6,47 e 13,11 %. Para matéria seca, os valores variaram entre 73,53 e

97,96 % e para os teores de fósforo, entre 0,12 e 0,34%.

O conjunto de espectros originais (sem transformações matemáticas) de reflectância na região do NIR para as amostras de milho moído estão apresentados na Figura 1.

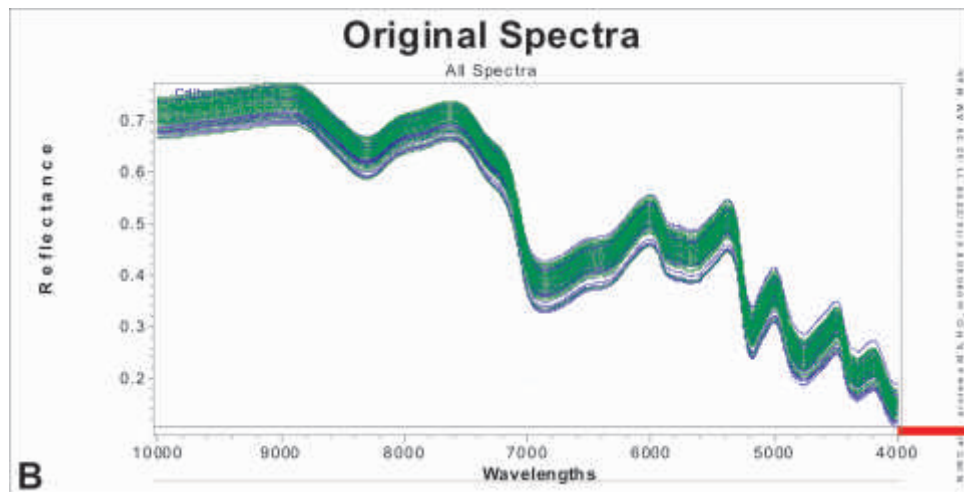


Figura 1 - Espectros de infravermelho próximo obtidos com as amostras de grão de milho moído

O método do PLS foi o que melhor se adequou para a seleção do modelo de regressão multivariada de calibração para os parâmetros avaliados. Na Tabela 1, podemos observar os resultados para os critérios considerados para o ajuste das curvas de calibração utilizando grãos de milho moído. A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na análise do menor erro padrão, associado à calibração e validação e respectivo coeficiente de determinação (r^2).

Tabela 1 – Resultados obtidos para a equação de calibração obtida no NIRCal para amostras de grãos de milho moído

Análise	Calibração		
	Proteína	Mat. seca	Fósforo
Número de espectros (3 por amostra)	342	342	342
Média	10,17	91,07	0,23
Faixa (min-max)	7,36-13,11	81,14-94,93	0,12-0,34
Desvio padrão (Referência)	1,23	2,94	0,05
Desvio padrão (Predito)	0,52	2,77	0,04
Erro Padrão de Calibração - EPC	0,62	0,99	0,03
Faixa de comprimento de onda (cm ⁻¹)	5000-10000	4000-10000	2273-2083, 1851-1111
Tratamentos matemáticos ^a	1	1	2,3
Coefficiente de Regressão (b)	0,8086	0,8882	0,7437
Coefficiente de Determinação (r ²)	0,90	0,94	0,85

a Tratamentos matemáticos: 1- Derivada primeira- Alisamento Savitzky-Golay; 2- Correção do efeito espalhamento multiplicativo - MSC; 3- Derivada primeira BCAP

Tabela 2 – Resultados da validação para a equação de calibração obtida no NIRCal para amostras de grãos de milho moído

Análise	Validação		
	Proteína	Mat. Seca	Fósforo
Número de amostras	144	170	167
Média	10,17	91,07	0,23
Faixa (min-max)	7,50-12,29	81,14-94,83	0,12-0,34
Desvio padrão (Referência)	1,24	2,95	0,05
Desvio padrão (Predito)	0,52	2,77	0,05
Erro Padrão de Validação Cruzada - EPVC	0,61	0,99	0,03
Relação de Desempenho dos Desvios	0,85	2,79	1,66
Coefficiente de Regressão (b)	0,8100	0,8822	0,7575
Coefficiente de Determinação (r ²)	0,88	0,94	0,84

As Figuras 2 a 4 mostram os gráficos dos valores experimentais versus valores preditos para as amostras de milho dos conjuntos de calibração e validação.

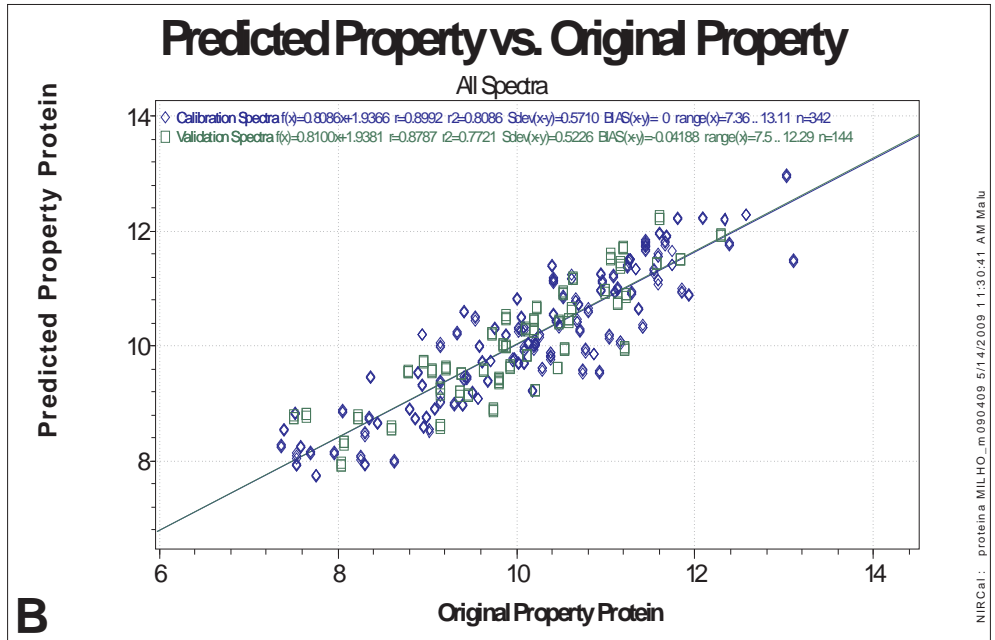


Figura 2 – Modelos de regressão ajustados com base nos teores de proteína, obtidos pelos métodos analíticos de referência e predito via NIRS, das amostras utilizadas para calibração e validação

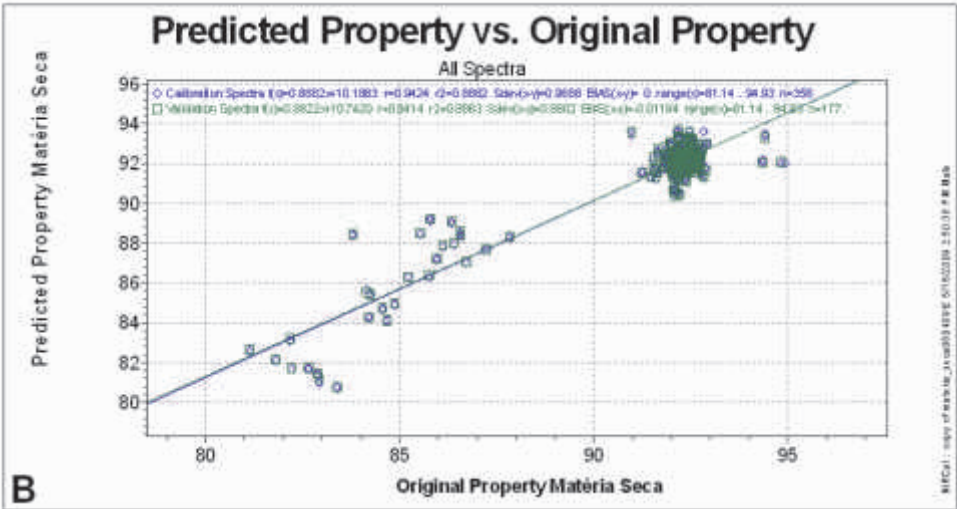


Figura 3 – Modelos de regressão ajustados com base nos teores de matéria seca, obtidos pelos métodos analíticos de referência e predito via NIRS, das amostras utilizadas para calibração e validação

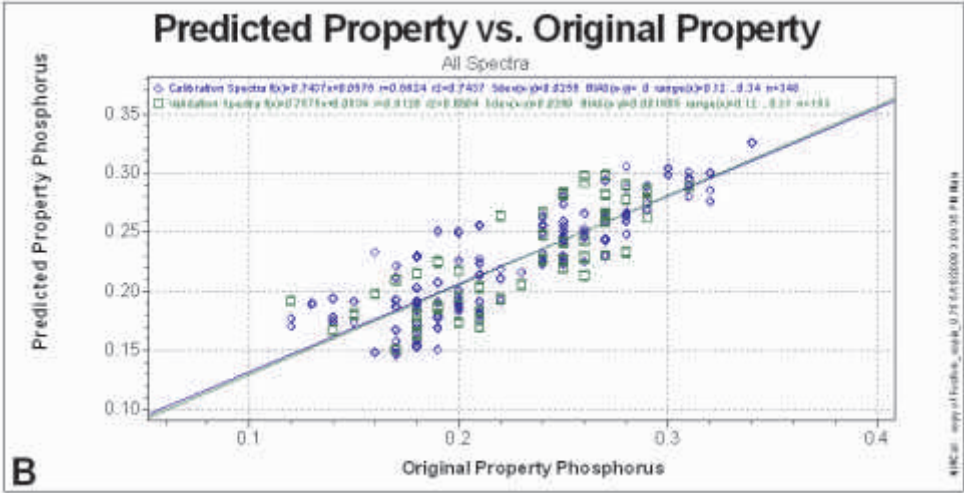


Figura 4 – Modelos de regressão ajustados com base nos teores de fósforo, obtidos pelos métodos analíticos de referência e predito via NIRS, das amostras utilizadas para calibração e validação

Os coeficientes de determinação para proteína no milho moído (0,90) obtidos neste experimento estão abaixo dos valores encontrados por Orman e Schumann (1991) e Baye et al. (2006), os quais encontraram valores de R para milho moído de 0,97. Essas diferenças ocorrem em função da quantidade e variabilidade das amostras utilizadas no conjunto de calibração. A RDD para milho moído também ficou abaixo do valor 3, sugerido por Williams (2001) como performance ideal para curvas de calibração de determinações analíticas em alimentos. Entretanto, apresenta boa acurácia para realização de screening para grandes números de amostras. Para melhorar a performance desse modelo, o conjunto de amostras deverá ser ampliado, bem como a distribuição entre as médias mínima e máxima. Um maior número de amostras, com melhor distribuição, poderá melhorar a RDD da curva de calibração para valores próximos aos sugeridos por Williams (2001) para utilização como método analítico de rotina.

Para análise da matéria seca, o coeficiente de determinação igual a 0,89, encontrado para o milho moído, apresenta-se próximo aos obtidos por Fontaneli et al. (2004), Welle et al. (2003) e Cozzolino et al. (2006), que registram r^2 por volta de 0,90. O EPVC também foi de 0,99% para o milho moído. A RDD ficou muito próxima ao valor 3, sugerido por Williams (2001) como desempenho ideal de uma curva de calibração para determinações analíticas.

Com relação à análise de fósforo, o coeficiente de determinação para o milho moído (0,85) pode ser considerado bom em comparação com os obtidos por Shenk et al. (1981), Clark et al. (1987), Ruano-Ramos et al. (1999) e Chen et al. (2002), que obtiveram valores entre 0,66 e 0,99. Apesar do método NIRS não se mostrar apropriado para análises de minerais, uma vez que formas iônicas e salinas não absorvem energia na região do infravermelho próximo, em alguns casos estes minerais podem se apresentar complexados organicamente ou na forma de quelatos, tornando possível a obtenção de calibrações robustas.

Conclusão

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo, associada ao método de calibração multivariada (PLS), é uma técnica alternativa viável para a determinação do teor de proteína total e matéria seca em amostras de milho moído. As principais vantagens do método proposto, quando comparado com os métodos tradicionais, são: pouca manipulação e a não destruição da amostra, resíduos químicos não são formados durante a análise, redução de tempo e custo de análise por amostra.

As curvas ajustadas para proteína bruta, matéria seca e fósforo apresentaram performance adequada para utilização em amostras provenientes de ensaios de screening ou onde se tem grande número de repetições de amostras por tratamentos.

Para utilização em determinações analíticas como método de rotina laboratorial, os modelos de calibração devem ser aprimorados por meio do aumento do número de amostras e aplicação de critérios na seleção das amostras a serem utilizadas no modelo, visando a exclusão de outliers e seleção de um conjunto de amostras que apresentem uma maior amplitude e uma distribuição homogênea das amostras dentro desta amplitude, para cada parâmetro a ser analisado.

Agradecimentos

À FAPEMIG e ao FNDCT/FINEP/MCT que aportaram recursos para o desenvolvimento das atividades e aquisição do equipamento NIRS. Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo Lauro José Moreira Guimarães e Paulo Evaristo Guimarães pela disponibilização das amostras de milho utilizadas.

Referências

BAYE, T. M.; PEARSON, T. C.; SETTLES, A. M. Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, London, v. 43, p. 236-243, 2006.

CHEN, M.; GLAZ, B.; GILBERT, R. A.; DAROUB, S. H.; BARTON, F. E.; WAN, Y. Near-infrared reflectance spectroscopy analysis of phosphorus in sugarcane leaves. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 1324-1331, 2002.

CLARK, D. H.; MARYLAND, H. F.; LAMB, R. C. Mineral analysis of forages with near infrared reflectance spectroscopy. **Agronomy Journal**, Madison, v. 79, p. 485-490, 1987.

COZZOLINO, D.; FASSIO, A.; FERNÁNDEZ, E.; RESTAINO, E.; LA MANNA, A. Measurement of chemical composition in wet whole maize silage by visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 129, p. 329-336, 2006.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v.1.

FONTANELI, R. S.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; DÜRR, J. W.; APPELT, J. V.; BORTOLINI, F.; HAUBERT, F. A. Predição da composição química de bermudas (*Cynodon* spp.) pela espectroscopia de reflectância no infravermelho proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 838-842, 2004.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989. 418 p.

NICK, D. Los programas de control de calidad en las empresas avícolas. **Avicultura Profesional**, Athens, v. 7, p. 20-24, 1989.

ORMAN, B. A.; SCHUMANN JR., R. A. Comparison of near-infrared spectroscopy calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.

39, p. 883-886, 1991.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, p. 198-219, 2003.

PEDROL, H. M.; RO BUTTI, J. L. Determinacion de lisina en maiz por reflexion en el infrarrojo cercano y su utilizacion en el mejoramiento. **Informe Tecnico**, Pergamino, n. 280, p. 1-16, 1993.

RUANO-RAMOS, A.; GARCIA-CIUDAD, A.; GARCIA-CRIADO, B. Near infrared spectroscopy prediction of mineral content in botanical fractions from semi-arid grasslands. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 77, p. 331-343, 1999.

SHENK, J. S.; LANDA, I.; HOOVER, M. R.; WESTERHAUS, M. O. Description and evaluation of a near infrared reflectance spectrocomputer for forage and grain analysis. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 355-358, 1981.

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.

VALDES, E. V.; LEESON, S. Analisis rápido de energía metabolizable por espectroscopia de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR). **Avicultura Profesional**, Athens, v. 8, p. 128-130, 1991.

WELLE, R.; GRETEN W.; RIETMANN, B.; ALLEY, S.; SINNAEVE, G.; DARDENNE, P. Near-Infrared Spectroscopy on chopper to measure maize forage quality parameters. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1407-1413, 2003.

WILLIAMS, P. C. Implementation of near-infrared technology. In: WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. H. (Ed.). **Near-infrared technology in the agricultural and food industries**. 2. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 2001. p. 145-169.