

# Comunicado Técnico 205

ISSN 1679-0162  
Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2012

Foto: Maria Lúcia F. Simeone



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

Miguel Marques Gontijo Neto<sup>1</sup>  
Maria Lúcia Ferreira Simeone<sup>2</sup>  
Cristiane de Carvalho Guimarães<sup>3</sup>

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-

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

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

<sup>3</sup>Química, 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<sup>-1</sup> (1.000-2.500 nm), com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> 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 R<sup>2</sup>.

### **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.

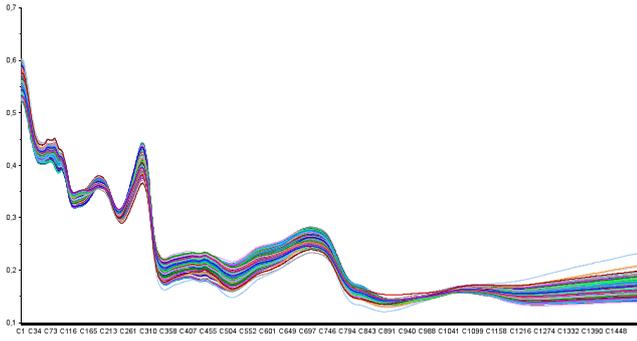


Figura 1. Espectros das 232 amostras de braquiária.

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).

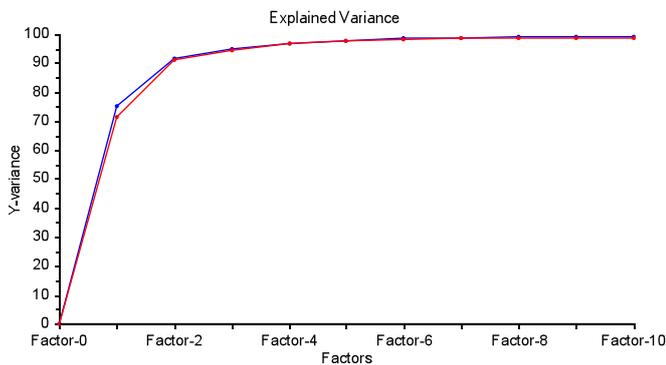


Figura 2. Variância explicada em função do número de fatores

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.

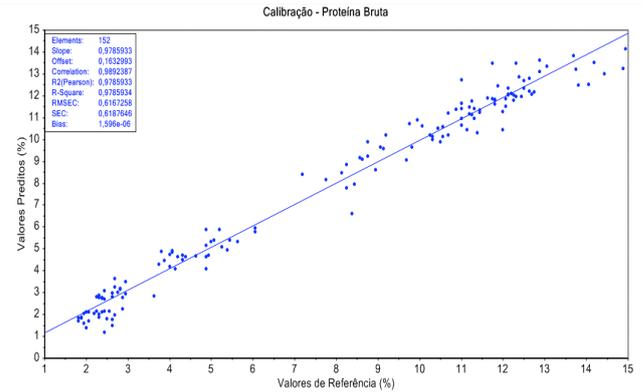
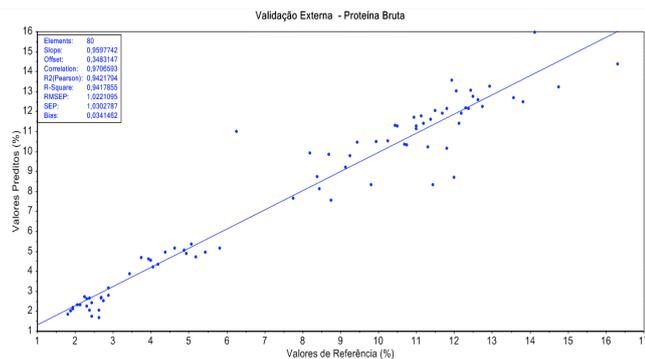


Figura 3. Gráfico de calibração para os teores de proteína bruta de amostras de braquiária.

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.

**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

## 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

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*)

**R<sup>2</sup>** – 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