



**Universidade dos Açores**

**Departamento de Ciências Agrárias**

Mestrado em Engenharia Zootécnica

**Caracterização de Forragens da ilha Terceira  
através da Espectroscopia NIR**

**Cristiana Rodrigues Maduro Dias**

**Orientador:** Prof. Doutor Alfredo Emílio Silveira de Borba

**Angra do Heroísmo**

**2015**

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho proporcionou muitas situações para aprender e recordar, das quais estou agradecida.

Agradeço ao Professor Doutor Alfredo Borba, por ter aceite orientar o meu caminho, iniciando-me no mundo da nutrição e alimentação animal, pelos preciosos ensinamentos, pela paciência inesgotável e pela confiança transmitida.

À Dona Goretti Bettencourt, por me ter permitido viver uma nova experiência, partilhando comigo anos de saber e tantos bons e maus momentos. Foi absolutamente imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

À Sra. Glória, por todo o apoio e amizade.

A toda a minha família, pelo esforço que sempre fizeram, pela paciência, atenção, carinho e motivação que me transmitiram. Em especial aos meus pais, ao meu irmão e ao Tiago, por serem únicos na minha vida, e aos meus sogros pelas horas a brincar com a Maria enquanto eu estudava.

À Maria, por ser a minha força.

A todos os meus amigos, em especial aos que tive o prazer de conhecer nos últimos anos na Universidade dos Açores: João Borba, Hélder Patrício, Francesca Gallo, Joana Ramos e Vera Duarte, por me apoiarem quando o desânimo se instalou e por todos os bons momentos de diversão que tornaram estes anos inesquecíveis.

A todos os Professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

A todos os agricultores pela disponibilidade demonstrada.

Obrigada a todos!

## **Resumo**

Desde a sua primeira aplicação à agricultura, em 1964, a Espectroscopia de Refletância no Infravermelho Próximo (NIR), tem vindo a ser desenvolvida como método alternativo para prever a composição química de forragens e outros produtos. Este baseia-se na análise dos espectros resultantes da incidência de radiação na zona do infravermelho próximo e comparação com resultados de referência previamente determinados. É um método analítico fiável, aplicável a amostras sólidas ou líquidas e capaz de produzir resultados de forma rápida, barata e não destrutiva. No entanto, a fiabilidade dos resultados está altamente dependente da qualidade do processo prévio de calibração.

Este trabalho, teve como objetivo a avaliação do uso da Espectroscopia NIR para a quantificação de vários parâmetros da composição química de silagens de erva e milho da ilha Terceira. Foram colecionados valores de referência a partir de 200 amostras de silagens de erva e 102 de silagens de milho e extraídos os respetivos espectros NIR. Seguiu-se o desenvolvimento dos modelos PLS de calibração, combinados com diferentes pré-tratamentos espectrais (primeira derivada, SNV e MSC). Para cada parâmetro, a calibração ótima foi determinada através da análise de informações estatísticas, tais como o  $R^2$ , SECV e o RPD.

Globalmente, os melhores resultados foram conseguidos com o pré-tratamento SNV e sem pré-tratamento. Nas silagens de erva, os melhores valores de  $R^2$  foram obtidos para a Proteína Bruta (0,95), NDF (0,86), ADF (0,91) e Cinza Bruta (0,90). Já para as silagens de milho, o  $R^2$  da Proteína Bruta foi de 0,87, do NDF de 0,86, do ADF de 0,84 e da Cinza Bruta de 0,93.

Espera-se que estes modelos de calibração venham a permitir o acompanhamento destes e outros parâmetros de qualidade das silagens da ilha Terceira, dispensando a obrigatoriedade de recorrer a métodos de referência morosos e dispendiosos.

**Palavras chave:** Análise Multivariada, NIR, PLS, Quimiometria, Silagens

## **Abstract**

Since first being applied to agriculture in 1964, Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) has continuously developed as an alternative method to predict the chemical composition of forage and other products. This method analyzes the specter results of the incidence of radiation in the NIR region and compares them with previously collected references. It's an analytical and reliable method that is applicable to both solid and liquid samples, as well as capable of producing results quickly and non-destructively. However, the reliability of this method is highly dependent on the quality of the required calibration process.

The goal of this work was to evaluate the use of NIRS to quantify several chemical parameters of Terceira Island's grass and corn silage. Reference values were collected from 200 grass silage, 102 corn silage samples and the corresponding NIR specters. PLS calibration models were then developed. These were combined with different spectral pre-treatments (first derivative, SNV and MSC). For each parameter, the optimal calibration was determined through the analysis of statistical information, such as the  $R^2$ , SECV and RPD.

The best results were obtained using the SNV pre-treatment and without any pretreatment. For the grass silage, the best  $R^2$  values were obtained from Crude Protein (0,95), NDF (0,86), ADF (0,91) and Crude Ash (0,90). For the corn silage, the Crude Protein's  $R^2$  value was 0,87, NDF's was 0,86, ADF's was 0,84 and the Crude Ash's was 0,93.

These calibration models will allow for these and other Terceira Island silage quality parameters to be monitored, eliminating the mandatory use of the more expensive and time consuming traditional methods.

**Keywords:** Multivariable Analysis, NIR, PLS, Chemometrics, Silage

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução   | 1  |
| 2. Revisão Bibliográfica  | 2  |
| 2.1. A Espectroscopia de Infravermelho Próximo                  | 2  |
| 2.1.1. História   | 2  |
| 2.1.2. Princípios Teóricos                                      | 4  |
| 2.1.3. Instrumentação   | 6  |
| 2.2. Quimiometria   | 6  |
| 2.3. Análise Multivariada (Calibração do Espectrofotômetro NIR) | 8  |
| 2.3.1. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)           | 9  |
| 2.3.2. Pré-Tratamento Espectral                                 | 10 |
| 2.4. Utilização do NIR para a Caracterização de Forragens       | 11 |
| 3. Material e Métodos   | 15 |
| 3.1. Amostragem   | 15 |
| 3.2. Metodologia Analítica                                      | 15 |
| 3.2.1. Análises de Referência                                   | 15 |
| 3.2.2. Aquisição de Espectros                                   | 15 |
| 3.2.3. Desenvolvimento dos Modelos de Calibração                | 16 |
| 3.2.4. Estatística  | 16 |
| 4. Resultados   | 18 |
| 4.1. Silagens de erva   | 18 |
| 4.2. Silagens de milho  | 26 |
| 5. Discussão  | 35 |
| 5.1. Caracterização Química                                     | 35 |
| 5.2. Análise da Espectroscopia NIR                              | 36 |
| 6. Conclusão  | 39 |
| 7. Perspetivas Futuras  | 39 |
| 8. Bibliografia   | 40 |

## Lista de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Aplicação da Espectroscopia NIR à determinação de vários parâmetros, tais como, MS (Matéria Seca), pH, PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente Ácido), de Silagens de Erva e Milho.....  | 13 |
| Tabela 2. Aplicação da Espectroscopia NIR à determinação de vários parâmetros, tais como, MS (Matéria Seca), PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente Ácido), ADL (Lenhina em Detergente Ácido), CB (Cinza Bruta), de diferentes tipos de amostras..... | 14 |
| Tabela 3. Caracterização química das silagens de erva.....   | 18 |
| Tabela 4. Pré-tratamentos matemáticos para a MS (Matéria Seca), pH e AA (Azoto Amoniacal) para as silagens de erva.....  | 20 |
| Tabela 5. Pré-tratamentos matemáticos para PB(Proteína Bruta), NDF(Fibra em Detergente Neutro), ADF(Fibra em Detergente ácido) e ADL(Lenhina em Detergente ácido) para as silagens de erva. ....   | 21 |
| Tabela 6. Pré-tratamentos matemáticos para EE (Extracto Etereo) e CB (Cinza Bruta) para as silagens de erva. ....  | 21 |
| Tabela 7. Caracterização química das silagens de milho. ....   | 26 |
| Tabela 8. Pré-tratamentos matemáticos para os conjuntos de calibração para a MS (Matéria Seca), pH e AA (Azoto Amoniacal) para as Silagens de Milho.....   | 28 |
| Tabela 9. Pré-tratamentos matemáticos para os conjuntos de calibração para PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente ácido) e ADL (Lenhina em Detergente Ácido) para as Silagens de Milho.....   | 29 |
| Tabela 10. Pré-tratamentos matemáticos para os conjuntos de calibração para EE (Extracto Etereo) e CB (Cinza Bruta) para as Silagens de Milho. ....  | 29 |
| Tabela 11. Tabela usada para a avaliação de silagens (adaptado de Kung e Shaver, 2001).....  | 35 |

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Espectro eletromagnético com destaque para a região do infravermelho próximo.....  | 4  |
| Figura 2. Configuração geral de NIR (Reich, 2005) .....  | 6  |
| Figura 3. Conjunto de espectros originais (sem transformações matemáticas) de refletância na região NIR para as Silagens de Erva.....  | 19 |
| Figura 4. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Matéria Seca (MS) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos. ....                 | 22 |
| Figura 5. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o pH com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....                                 | 22 |
| Figura 6. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o Azoto Amoniacal (AA) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos. ....              | 23 |
| Figura 7. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Proteína Bruta (PB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos. ....               | 23 |
| Figura 8. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Neutro (NDF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos. ....  | 24 |
| Figura 9. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Ácido (ADF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos. ....   | 24 |
| Figura 10. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Lenhina em Detergente Ácido (ADL) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos..... | 25 |
| Figura 11. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para Extrato Etéreo (EE) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....                 | 25 |
| Figura 12. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Cinza Bruta (CB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....                  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 13. Conjunto de espectros originais (sem transformações matemáticas) de refletância na região NIR para as Silagens de Milho. ....   | 27 |
| Figura 14. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Matéria Seca (MS) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....                 | 30 |
| Figura 15. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a pH com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....                                | 30 |
| Figura 16. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o Azoto Amoniacal (AA) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos. ....             | 31 |
| Figura 17. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Proteína Bruta (PB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....               | 31 |
| Figura 18. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Neutro (NDF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....  | 32 |
| Figura 19. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Ácido (ADF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....   | 32 |
| Figura 20. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Lenhina em Detergente Ácido (ADL) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos..... | 33 |
| Figura 21. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o Extrato Etéreo (EE) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....               | 33 |
| Figura 22. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Cinza Bruta (CB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.....                  | 34 |
| Figura 23. Relação entre o comprimento de onda e a absorção de um espectro NIR típico de silagens (Corson <i>et al.</i> , 1999) .....  | 36 |

## **Principais Abreviaturas Utilizadas**

AA – Azoto Amoniacal

ADF – Fibra em Detergente Ácido

ADL – Lenhina em Detergente Ácido

CB – Cinza Bruta

EE – Extrato Etéreo

FIR – Infravermelho Longínquo

MIR – Infravermelho Médio

MPLS – Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados Modificada

MS – Matéria Seca

MSC – Correção Multiplicativa do Sinal

NDF – Fibra em Detergente Neutro

NIR – Infravermelho Próximo

PB – Proteína Bruta

PLS – Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados

RPD – Valor Residual de Previsão

SD – Desvio Padrão

SECV – Erro Padrão da Validação Cruzada

SEP – Erro Padrão de Previsão

SNV – Variação de Padrão Normal

## 1. Introdução

Os Açores têm, enquanto região, uma grande dependência económica da produção animal. Com uma superfície agrícola naturalmente limitada, colocam-se sérios desafios à obtenção de um incremento produtivo sustentável. Este tem, forçosamente, de chegar por via da optimização dos recursos disponíveis, conseguindo-se, com o mínimo de custos, o máximo de produção (Borba, 1992).

A alimentação animal, um dos aspetos mais determinantes à produção, surge, então, como área de particular interesse, sendo que, em geral, o estudo e caracterização de alimentos para a produção animal tem vindo a ganhar cada vez mais preponderância. Os motivos desta incluem a necessidade de conceber dietas que, para além de oferecer o diferencial máximo entre custos de alimentação e venda de produtos, também permitam a redução do impacto ambiental negativo (Givens e Deaville, 1999).

Por via das ilhas dos Açores serem, de uma maneira geral, montanhosas, a falta de erva é sentida, no mínimo, numa das épocas do ano. Esta situação é ultrapassada com recurso a processos de conservação de forragens, tipicamente sob a forma de silagem, como meio de contornar os elevados índices de humidade das ilhas, que dificultam a fenação. A implementação de qualquer programa de produção animal eficaz torna-se, assim, altamente dependente do conhecimento da forragem que vai servir de base a essa produção e da forma como o animal a utiliza (Borba, 1992). Quanto maior for a informação disponível sobre o valor nutritivo das forragens, mais eficaz poderá ser a adequação dos métodos de preparação e manuseamento da mesma, tendo em vista a maximização do seu proveito nutritivo.

O conhecimento em causa, assenta na composição química das forragens. Infelizmente, o custo dos métodos de análise convencionais utilizados com este propósito, tem-se revelado excessivo, dificultando a sua realização para fins de investigação ou consultoria (Bruno-Soares *et al.*, 1998). É neste contexto que surge a chamada Espectroscopia de Refletância no Infravermelho Próximo (NIR). Desde a sua primeira aplicação à agricultura, por Norris, em 1964, tem vindo a ser utilizada cada vez mais frequentemente como alternativa às análises convencionais, para prever a composição química de forragens e outros produtos (Stuth e Tolleson, 2000). Hoje em dia, é, por exemplo, comum a sua aplicação na indústria farmacêutica, têxtil, petrolífera, cosmética

entre outras (Naes *et al.*, 2002), tanto no controlo de qualidade como dos próprios processos envolvidos (Siesler *et al.*, 2002).

Esta técnica oferece várias vantagens importantes em relação às abordagens tradicionais (Reich, 2005). Para além de ser um método analítico fiável, tanto qualitativa (para identificação) como quantitativamente (para doseamento), aplicável a amostras sólidas ou líquidas, é uma técnica universal, rápida, não destrutiva, e de fácil utilização, uma vez que não precisa de pré-tratamento da amostra, não consome reagentes químicos e não gera resíduos.

Por contraponto, Uden (1984) ressalva que esta técnica é puramente empírica e requer que amostras semelhantes sejam analisadas por métodos semelhantes. De facto, o principal desafio à sua aplicação é o estabelecimento de equações de calibração que se baseiam em análises químicas feitas a um grande número de amostras. Barton e Coleman (1981), inclusivamente, consideram que o ponto mais crítico da análise NIR é a qualidade das análises laboratoriais utilizadas na calibração. A composição química das amostras tem de ser previamente conhecida para a determinação das equações de calibração (Coleman *et al.*, 1982). Reeves (1988) refere que se conseguem determinações mais exatas quando são utilizadas nas equações de calibração amostras de todos os tratamentos a analisar.

Este trabalho pretende continuar estudos referentes à utilização da espectroscopia de infravermelho próximo associado a técnicas de calibração, para apoiar o controlo de qualidade de forragens utilizadas na alimentação animal na ilha Terceira. Neste contexto, pretende-se avaliar o potencial da espectroscopia do infravermelho próximo como método rápido e não destrutivo para prever a composição química de forragens.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. A Espectroscopia de Infravermelho Próximo**

#### **2.1.1. História**

Em 1666, Sir Isaac Newton demonstrou que ao atravessar um prisma, a luz solar se pode decompor nas cores do arco-íris (vermelho, laranja, amarelo, verde, anil, azul e violeta) (Simões, 2008). A descoberta da espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) ocorreu mais tarde, em 1800, e é atribuída a Sir Frederick William Herschel

(Reich, 2005), quando o cientista inglês utiliza o mesmo princípio para, com a ajuda de um termómetro, registar a quantidade de calor associada a cada cor que constitui a luz solar (Naes *et al.*, 2002). Durante a experiência, é observado um aumento significativo de temperatura, na região acima da luz vermelha. Este dado particular foi inesperado, na medida em que se verificou numa zona invisível da radiação, que denominou infravermelho (Pasquini, 2003; Almeida, 2009).

Em 1905, Coblentz apresenta os resultados da experiência que realizou, na qual constrói um espectrómetro rudimentar a partir de sal de rocha, com uma termopilha acoplada a um galvanómetro de espelho. Coblentz consegue produzir os primeiros espectros orgânicos, embora o rudimentar aparelho apenas obtivesse um espectro por dia. Durante o seu trabalho, compreende que cada composto possui o seu espectro próprio, sendo este específico e único à sua constituição (Pasquini, 2003; Ciurczak, 2006).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a técnica NIR foi substancialmente desenvolvida como técnica de análise (Simões, 2008). Estes avanços impulsionaram a tecnologia para o desenvolvimento de espectrómetros comercialmente disponíveis (Ciurczak, 2006), embora esta técnica só tenha despertado maior interesse após os estudos de Karl Norris em 1960, quando Norris e os seus colegas desenvolvem a primeira aplicação de espectroscopia NIR para medir a humidade em grãos e sementes (Norris e Hart, 1965, citados por Givens *et al.*, 1997).

É a partir dos anos 70 que a tecnologia NIR começa a ser estudada e aprofundada, graças, principalmente, ao trabalho desenvolvido por Norris no Departamento Americano de Agricultura (USDA), cujo sucesso motivou o interesse de várias indústrias, nomeadamente combustíveis e polímeros, sendo, finalmente, alargada às farmacêuticas e bioquímicas, devido à necessidade de rigorosa regulação destas indústrias (Ciurczak, 2006).

Nos últimos anos, a técnica NIR evoluiu ao ponto de se tornar indispensável para a investigação científica, bem como para um extensa lista de aplicações no controlo de qualidade em meio industrial (Jamrógiewicz, 2012), tendo sido usada para identificar trigo (Delwiche e Graybosch, 2002), autenticar a origem da carne (Fumiere *et al.*, 2000), avaliar o açúcar contido nos frutos (Walsh *et al.*, 2000) e identificar os nutrientes contidos em folhas de *Eucalyptus* (McIlwee *et al.*, 2001). O método NIR tem sido,

também, amplamente usado em ciência animal para prever a composição química de forragens (Stuth e Tolleson, 2000).

### 2.1.2. Princípios Teóricos

O termo espectroscopia é usado para designar métodos analíticos em que é estudada a interação de radiações electromagnéticas com moléculas. A espectroscopia NIR (*Near Infrared Region*) baseia-se no facto dos principais componentes químicos de uma amostra terem propriedades particulares de absorção nessa região do espectro de luz (comprimento de onda situado entre os 750-2500nm, ver Figura 1) (Siesler *et al.*, 2002; Reich, 2005). A conjugação destas propriedades com as da dispersão de radiação da amostra determinam o espectro de refletância difusa que permite, por sua vez, caracterizar e quantificar várias propriedades químicas, físicas e sensoriais da amostra (Shenk e Westerhaus, 1995).

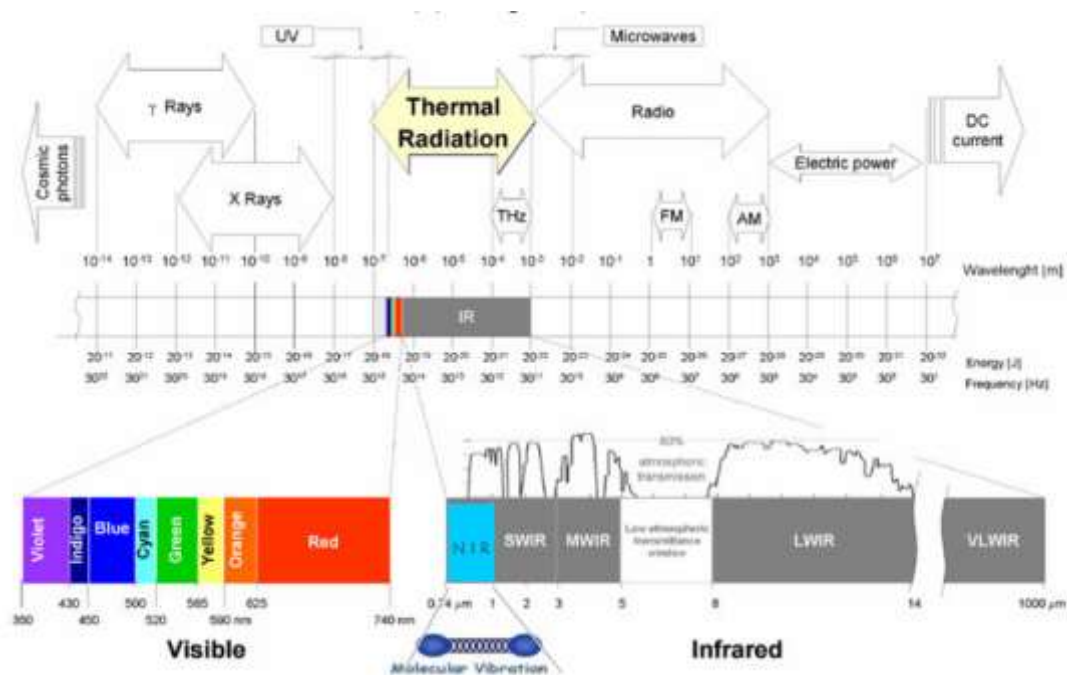


Figura 1. Espectro eletromagnético com destaque para a região do infravermelho próximo.

De forma análoga à vibração de uma corda num instrumento musical, a vibração de uma molécula estimulada tem uma frequência ou comprimento de onda fundamental e uma série de sobretons. A absorção da radiação NIR pelas moléculas orgânicas acontece primariamente devido às bandas de combinação e sobretons dos grupos O-H, C-H, N-H (Reich, 2005; Almeida, 2009), sendo a frequência fundamental absorvida na região dos

infravermelhos médios. Como este tipo de ligações são comuns na matéria orgânica, a Espectroscopia NIR torna-se particularmente adequada à análise da composição de química de forragens (Coleman e Murray, 1993; Osborn *et al.*, 1993), tendo a técnica sido inicialmente desenvolvida precisamente para analisar fatores de qualidade, incluindo proteína, NDF e ADL. (Deville e Flin, 2000)

Adicionalmente, moléculas como  $H_2O$  ou  $Cl_2$ , cujas vibrações causadas pela radiação não alteram o seu momento dipolar, não são ativadas no infravermelho (Silva *et al.*, 2008), o que faz com que a região NIR seja eminentemente adequada para análise de amostras com grande conteúdo de água, como comidas e bebidas. Mais ainda, comprimentos de caminho mais longos, comparados com outras técnicas de espectroscopia, permitem que os espectros NIR sejam também medidos por transmissão através de materiais intactos, por reflexão difusa de amostras biológicas opacas (Sileoni *et al.*, 2013).

Os sobretons detetados na região NIR são, no entanto, anarmónicos, ou seja, não se comportam de forma simples. Isto, combinado com o facto de as absorções serem menos intensas e ocorrerem sobreposições e combinações das ligações dos vários grupos funcionais (Naes *et al.*, 2002), torna o espectro NIR particularmente complexo, ao contrário do que acontece com as espectroscopias de infravermelho médio (MIR) e longínquo (FIR). Os espectros NIR são, na realidade, o resultado de muitos picos e vales que se sobrepõem. Isto leva à necessidade de aplicar métodos estatísticos complexos para que seja possível interpretar os resultados obtidos, permitindo identificar e distinguir características específicas dos espectros.

Esta impossibilidade de uma interpretação direta dos espectros, tendo em vista a determinação de propriedades das amostras, levou a que a espectroscopia NIR fosse largamente ignorada por espectroscopistas conservadores durante anos. (Costa *et al.*, 2001). Foi a integração de princípios da Quimiometria (ver secção Quimiometria) que tornou a espectroscopia NIR mais atrativa, ao permitir a discriminação qualitativa e determinação quantitativa de várias dimensões das amostras, graças ao tratamento avançado dos dados disponíveis, por via do uso de ferramentas de análise de dados multivariados (para múltiplos comprimentos de onda) e técnicas de calibração (PLS) (Sileoni *et al.*, 2013). No entanto, há que ressaltar que o sucesso da construção dos modelos de regressão necessários está dependente da existência de um número

relativamente grande de amostras de calibração, cobrindo uma grande variabilidade para cada parâmetro analítico, com uma distribuição uniforme entre valores extremos. É por esta razão que modelos multivariados demoram anos a ser construídos e/ou melhorados, sendo difícil declarar antecipadamente com que sucesso um modelo de calibração NIR irá prever o parâmetro de interesse de amostras futuras.

### 2.1.3. Instrumentação

Os espectrofotômetros, como o LabSpec Pro, disponível no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal da Universidade dos Açores, são, tipicamente, compostos por uma fonte de luz (lâmpada de tungsténio e halogénio), por um monocromador, um dispositivo que contenha a amostra, por componentes ópticos, tais como fibras ópticas, e por um detector (índio, gálio e arsénio- InGaAs) (Nicolai *et al.*, 2007), que permite as medições de transmitância e refletância (Figura 2).

Como detectores, existem, para baixo comprimentos de onda, os de dióxido de silício e, para comprimentos de onda maiores, os de sulfureto de chumbo (PbS), índio, gálio e arsénico (InGaAs). O detector de sulfureto de chumbo (PbS) tem a vantagem de ter um elevado tempo de vida útil, ser barato e altamente sensível. Contudo, apresenta limitações em termos de linearidade, saturação e velocidade de resposta, podendo estas limitações ser atenuadas com o uso de detectores InGaAs (Bakeev, 2005).

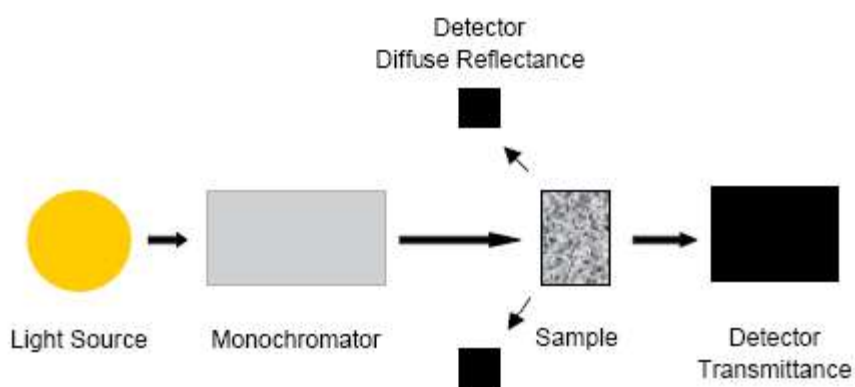


Figura 2. Configuração geral de NIR (Reich, 2005)

## 2.2. Quimiometria

O propósito básico da instrumentação analítica é providenciar informação útil sobre sistemas químicos e físicos. Medições de dados não são, no entanto, o mesmo que

informação, sendo extração da informação relevante a partir dos dados um desafio importante em todas as ciências empíricas (Rajalahti e Kvalheim, 2011). Com o potencial crescente da instrumentação disponível a permitir a obtenção de cada vez mais dados e, assim, uma caracterização mais completa de sistemas reais e complexos (Miller, 1995), também tem crescido a necessidade de criação de métodos avançados para projetar experiências, calibração de instrumentos e analisar os dados resultantes (Hopke, 2003).

Wold (1974) escreve, que “à arte de extrair informação relevante de dados produzidos em experiências químicas, é dado o nome de quimiometria, em analogia à biometria ou econometria” (Wold, 1995). Atualmente, a quimiometria é definida pela IUPAC (Sociedade Internacional de Química) como “a ciência de relacionar, medições feitas num sistema químico ou processo, com o estado do sistema, através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos”, podendo ser encontradas muitas outras variantes na literatura, a realçar aspetos de química analítica, estatística, informação e análise de dados (Hibbert *et al.*, 2009). Todas as definições parecem, no entanto, convergir no sentido de a quimiometria corresponder à aplicação de métodos matemáticos e estatísticos a problemas químicos para permitir a máxima recolha e extração de aspetos de informação química (Massart *et al.*, 1997; Wold e Sjostrom, 1998).

Wold (1995) reforça que, pese o papel determinante que várias áreas da matemática têm na quimiometria, como a estatística, análise numérica, análise operacional ou a matemática aplicada, a questão principal é estruturar o problema químico de forma a que possa ser expresso como uma relação matemática. Assim, a quimiometria não deve ser separada da química ou sequer ser permitida tornar-se um ramo separado da química. Deve permanecer uma parte integral de todas as áreas da química.

A quimiometria tem evoluído como um subcampo da química nos últimos 30 anos (Hopke, 2003), englobando métodos de análise estatística, matemática e computacional (Simões, 2008), para desenvolver um grande número de ferramentas valiosas que permitem resolver e mostrar informação química complexa de sistemas muitas vezes instáveis. Em geral, a principal área de foco destas técnicas tem sido (i) calibração multivariada, (ii) reconhecimento de padrões, classificação e análise discriminatória e (iii) modelação e monitorização de processos de reagentes e reações. Os principais

métodos estatísticos multivariados, têm sido desenvolvidos e aplicados com diferentes graus de sucesso em várias áreas (Haswell e Walmsley, 1999).

No campo da espectroscopia, em particular na espectrometria NIR, foi a quimiometria que possibilitou o desenvolvimento de rotinas de análise rápidas, fiáveis e não destrutivas (Purcell *et al.*, 2007), a ponto de ser hoje em dia padrão a integração de software de quimiometria no laboratório de espectroscopia e instrumentação (Geladi, 2003).

### **2.3. Análise Multivariada (Calibração do Espectrofotómetro NIR)**

A aplicação da técnica NIR, pesem todas as vantagens, depende decisivamente de uma calibração prévia bem conseguida, para que seja possível interpretar os espectros NIR obtidos. Ora, num estudo com centenas de variáveis, uma análise univariada pode dar algumas noções, mas dificilmente responderá com o interesse pretendido. É necessário que o estudo se baseie numa análise multivariada, com o recurso a algoritmos e a noções de quimiometria. Várias estratégias já foram sugeridas para o processo de calibração, que é particularmente complicado na análise de forragens, já que estas apresentam grande heterogeneidade (por exemplo, forragens de zonas agroclimáticas diferentes têm propriedades diferentes) (Andueza *et al.*, 2011). Como resultado destas dificuldades, as estratégias propostas dependem, tipicamente, de uma grande proximidade entre o conjunto de calibração e as amostras a serem testadas.

O primeiro passo do processo de calibração consiste na análise de todas as amostras para os componentes de interesse por métodos de referência convencionais.

Seguidamente, deriva-se um modelo matemático que relacione os dados espectrais com os dados de referência obtidos, num processo conhecido por quimiometria.

A construção do modelo de calibração baseia-se em métodos de regressão multivariada. Os métodos mais utilizados são:

- Regressão parcial dos mínimos quadrados modificada, MPLS (Shenk e Westerhaus, 1979);
- Regressão parcial dos mínimos quadrados, PLS (Manne, 1987), que efetua a regressão dos dados de concentração nos dados espectrais completos, isto é, encontra as direções das maiores variabilidades comparando dados espectrais

com a propriedade alvo a ser calibrada. O método é usado principalmente em determinações quantitativas, obrigando à análise de um elevado número de amostras para se conseguir estabelecer uma relação útil entre a informação retirada do espectro e as concentrações obtidas experimentalmente (Almeida, 2009).

### **2.3.1. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)**

De todos os métodos de regressão multivariada, o PLS é, talvez, o mais usado. O grande responsável pelo seu desenvolvimento é Herman Wold enquanto, em 1975, trabalhava com dados complicados na área da econometria .

De acordo com Wold, o método é chamado “*partial*” pois, embora consista de muitas optimizações locais, nenhum dos critérios é completamente maximizado ou minimizado.

O PLS é uma técnica de análise de dados multivariados, utilizada para relacionar uma ou mais variáveis resposta, correlacionando-as de modo a obter uma relação linear, baseada no uso de factores (componentes principais) estatisticamente significantes, obtidos com o auxílio de validação cruzada. Sendo um modelo que determina correlações quantitativas, serve para a construção da reta de calibração multivariada, podendo o seu desempenho ser aferido a partir do cálculo do Erro padrão de validação cruzada (SECV) e, depois, da estimativa do Erro padrão de validação externa (SEP), obtido a partir de uma matriz de validação distinta (Purcell *et al.*, 2007).

Dependendo do objecto de estudo e de quais as quantificações que se pretende realizar, o número de amostras necessárias ao desenvolvimento do modelo através desta técnica pode variar entre as 20 e as 200 amostras (Conzen, 2006).

Um factor a ter em conta, é a seleção apropriada da região espectral, uma vez que parte da informação contida num espectro NIR pode ser redundante e os sinais medidos em certos comprimentos de onda podem ser não lineares, construir ruído ou conter informação inútil para a previsão do valor analítico (Otto,1999).

Atualmente as aplicações do método PLS são vastas, encontrando-se exemplos na indústria alimentar, farmacêutica, petroquímica, entre outras.

### 2.3.2. Pré-Tratamento Espectral

Os espectros usados na técnica NIR podem ser afetados por vários factores, relacionados com o equipamento usado ou com as condições ambientais. Por exemplo, o espectrofotómetro pode causar distorções espectrais, pela saturação do detector ou por falhas no varrimento dos comprimentos de onda. Outras fontes de perturbação são as variações no percurso óptico e, em sólidos, os efeitos relativos à dispersão da luz no caso de as amostras não estarem bem homogeneizadas (Siesler *et al.*, 2002). Já as variações nas condições ambientais e na corrente que atravessa o detector podem provocar alterações na linha de base dos espectros.

Se alguns destes efeitos podem ser atenuados com o aumento do número de varrimentos de comprimento de onda, a custo da velocidade de análise, outros requerem métodos de pré-tratamento mais avançados, sendo que o cuidado com a qualidade dos dados espectrais adquire particular relevância no contexto de da técnica NIR, dada a complexidade dos espectros em que se baseia e dos modelos de calibração multivariada de que depende. (Almeida, 2009).

Alguns pré-tratamentos têm como objectivo eliminar ou remover variações sistemáticas, corrigir a linha de base, minimizar o ruído, melhorar a definição dos picos que se encontram sobrepostos na mesma região, evidenciando os parâmetros de interesse e consequentemente aumentando a seletividade, remover informação irrelevante e diminuir os efeitos causados por diferenças no tamanho da partícula. Apesar destas correções, a escolha do pré-tratamento tem de garantir que não é eliminada informação relevante para o sistema em estudo. Este pré-tratamento permite que o restante desenvolvimento do método de calibração não seja afectado por informações irrelevantes, permitindo uma maior linearidade.

De entre os Pré-tratamentos utilizados podem ser citados:

a) Derivadas

Este método realiza a derivada de primeira ou segunda ordem no espectro NIR original e tem como objectivo eliminar interferências causadas pelo tamanho das partículas e dar maior ênfase a picos, permitindo o aumento da sua resolução (Osborne, 2000).

b) Correção Multiplicativa do sinal (MSC)

Em inglês *Multiplicative Scatter Correction*, é aplicado ao conjunto de calibração numa tentativa de corrigir o efeito de dispersão da luz utilizada em leituras de refletância difusa, causado pela falta de homogeneidade das amostras (Sabin *et al.*, 2004) Cada espectro da calibração é normalizado de acordo com um “espectro ideal” que, neste caso, se assume como a média de todos os espectros presentes no conjunto de calibração (Conzen, 2006).

Tem-se observado que este método reduz o número de factores necessários, simplificando o modelo de calibração e aumentando a linearidade. (Naes *et al.*, 2002)

c) Variação de Padrão Normal (SNV)

Do inglês *Normal Variate Method*, este algoritmo normaliza cada espectro calculando e removendo o valor médio e ajustando à variância (Naes *et al.*, 2002). É utilizado para minimizar interferências causadas pelo tamanho das partículas e diferenças de densidade da amostra (Conzen, 2006).

O modelo SNV, embora melhore a precisão dos resultados, não simplifica o modelo matemático, e não reduz interferências sistemáticas (Naes *et al.*, 2002).

#### **2.4. Utilização do NIR para a Caracterização de Forragens**

Forragens, tanto verdes como conservadas, providenciam a base do sistema de produção ruminante no mundo (Wilkins *et al.*, 2000; Dale *et al.*, 2013). O seu valor alimentar é o resultado de dois factores: o valor nutritivo e a propensão à ingestão voluntária por parte dos animais (Park *et al.*, 1997). Estando o desempenho e saúde dos animais altamente dependente da sua nutrição, que se torna muitas vezes limitadora do potencial de ruminantes escolhidos com base no seu mérito genético (Ulyatt e Waghorn, 1993), a caracterização e controlo da qualidade da silagem de erva torna-se particularmente relevante (Soldado *et al.*, 2013).

Para além de as forragens poderem ser caracterizadas quanto ao índice de nutrientes, através de análises químicas, surgiu mais recentemente a possibilidade de o fazer usando a técnica da espectroscopia NIR. Desde a sua primeira aplicação, para medir a humidade em grãos em 1960, o número de aplicações da espectroscopia NIR tem-se

vindo a expandir (Landau *et al.*, 2006). A maioria dos relatos atribuem o primeiro uso bem sucedido do NIR para a previsão de digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de forragens a Norris *et al.* (1976). Nos anos que se seguiram, houve um grande número de artigos sobre o uso do NIR para prever muitos aspectos da composição de forragens, tais como a proteína e o NDF.

Nas últimas décadas, a espectroscopia NIR tem sido usada com sucesso para estimar a composição química e o valor nutritivo de silagens de erva (Park *et al.*, 1997; Shenk *et al.*, 2001; Tillmann *et al.*, 2002; Villamarín *et al.*, 2002), grãos e forragens (Cozzolino e Moron, 2004 citando Norris *et al.*, 1976; Murray, 1993; Batten, 1998; Garnsworthy *et al.*, 2000). Atualmente, esta técnica é reconhecida como uma ferramenta valiosa na determinação da composição química de uma vasta gama destas últimas (Barber *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1997), estando disponível uma literatura volumosa (ver Tabela 1 e Tabela 2), que inclui relatos de estudos que procuram evitar a necessidade de secar e moer previamente as amostras de silagens, passo que pode influenciar os resultados obtidos (Givens e Deaville, 1999).

**Tabela 1. Aplicação da Espectroscopia NIR à determinação de vários parâmetros, tais como, MS (Matéria Seca), pH, PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente Ácido), de Silagens de Erva e Milho.**

| Tipo de Amostra  | Parâmetro | Média de Referência | SEP <sup>a</sup> /SECV <sup>b</sup> | R <sup>2c</sup> | Autor                              |
|------------------|-----------|---------------------|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Silagem de Milho | pH        | 3,8                 | 0,08                                | 0,38            | Corson <i>et al.</i><br>(1999)     |
|                  | PB        | 7,50                | 0,61                                | 0,67            |                                    |
|                  | NDF       | 44,3                | 2,10                                | 0,95            |                                    |
| Silagem de Erva  | PB        | 12,80               | 0,64                                | 0,96            | Villamarín <i>et al.</i><br>(2002) |
|                  | NDF       | 54,40               | 1,99                                | 0,95            |                                    |
|                  | ADF       | 36,66               | 1,50                                | 0,92            |                                    |
| Silagem de Erva  | MS        | 40,0                | 0,89                                | 0,99            | Sorensen<br>(2004)                 |
|                  | PB        | 16,0                | 0,78                                | 0,93            |                                    |
| Silagem de Milho | MS        | 34,54               | 27,4                                | 0,85            | Cozzolino <i>et al.</i><br>(2006)  |
|                  | pH        | 3,6                 | 0,18                                | 0,51            |                                    |
|                  | PB        | 7,66                | 6,5                                 | 0,91            |                                    |
|                  | NDF       | 52,26               | 67,1                                | 0,60            |                                    |
|                  | ADF       | 29,59               | 22,1                                | 0,86            |                                    |

<sup>a</sup> SEP = Erro de validação; <sup>b</sup> SECV = Erro padrão da validação cruzada; <sup>c</sup> R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação múltipla;

**Tabela 2. Aplicação da Espectroscopia NIR à determinação de vários parâmetros, tais como, MS (Matéria Seca), PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente Ácido), ADL (Lenhina em Detergente Ácido), CB (Cinza Bruta), de diferentes tipos de amostras.**

| Tipo de Amostra           | Parâmetro | Média de Referência | SEP <sup>a</sup> /SECV <sup>b</sup> | R <sup>2c</sup> | Autor                                 |
|---------------------------|-----------|---------------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Legumes                   | PB        | 7,3-28,7            | 0,85                                | 0,97            | Smith e Flin<br>(1991)                |
| Gramineas                 | NDF       | 22,5-63,5           | 2,17                                | 0,95            |                                       |
| Mistura de Pastagens      | PB        | 5,8-16,4            | 0,57                                | 0,90            | Garcia-Cuidad<br><i>et al.</i> (1990) |
|                           | NDF       | 38,3-70,4           | 2,06                                | 0,86            |                                       |
|                           | ADF       | 25,4-40,8           | 1,42                                | 0,76            |                                       |
|                           | ADL       | 1,9-8,3             | 0,45                                | 0,88            |                                       |
| Pastagens                 | PB        | 18,5                | 0,95                                | 0,99            | Corson <i>et al.</i><br>(1999)        |
|                           | NDF       | 49,4                | 2,79                                | 0,95            |                                       |
| Planta Inteira Milho      | MS        | 87,4-97,0           | 4,25                                | 0,61            | Cozzolino<br><i>et al.</i> (2000)     |
|                           | PB        | 1,2-13,8            | 1,04                                | 0,86            |                                       |
|                           | NDF       | 33,1-89,7           | 2,43                                | 0,83            |                                       |
|                           | ADF       | 6,8-59,0            | 1,85                                | 0,98            |                                       |
|                           | CB        | 1,5-16,0            | 0,38                                | 0,64            |                                       |
| Grãos de Milho            | MS        | 73,4                | 3,9                                 | 0,75            | Fassio <i>et al.</i><br>(2009)        |
|                           | PB        | 7,2                 | 0,5                                 | 0,72            |                                       |
|                           | ADF       | 9,2                 | 1,97                                | 0,88            |                                       |
|                           | CB        | 2,2                 | 0,42                                | 0,81            |                                       |
| <i>Lolium perenne</i>     | PB        | 18,0                | 0,98                                | 5,3             | Burns <i>et al.</i><br>(2014)         |
| <i>Lolium multiflorum</i> | PB        | 20,7                | 0,98                                | 5,0             |                                       |
| <i>Lolium boucheanum</i>  | PB        | 21,2                | 0,99                                | 4,6             |                                       |

<sup>a-c</sup> Ver Tabela 1

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Amostragem**

Foram recolhidas, de forma aleatória, em diversas zonas da ilha Terceira, 200 amostras de silagens de erva e 102 amostras de silagens de milho.

Foram recolhidas diretamente do silo, em vários locais do silo, por forma a ser representativas da forragem ensilada.

#### **3.2. Metodologia Analítica**

##### **3.2.1. Análises de Referência**

As amostras, depois de recolhidas e identificadas, foram secas a 65°C em estufa com circulação forçada de ar, até terem peso constante.

Uma parte das amostras de silagens foi congelada a -5°C para determinação posterior do teor de azoto amoniacal e pH.

As amostras foram moídas em moinho equipado com um crivo de malha redonda de 1mm. Foram, depois, submetidas à análise química no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal da Universidade dos Açores.

Para a caracterização analítica, foi utilizado o esquema de Weende (A.O.A.C., 1975), que determina a MS (Matéria Seca) a 105°C em estufa com circulação de ar, a CB (cinza bruta) em mufla a 550°C, o EE (Extrato Etéreo) por extração a quente com éter de petróleo, a proteína bruta pelo método Kjeldahl (6,25), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente Ácido) e ADL (Lenhina em Detergente Ácido), pelos métodos propostos por Goering e Van Soest (1970), pH e Azoto amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) com o método potenciométrico.

##### **3.2.2. Aquisição de Espectros**

Depois de homogeneizadas, as amostras são colocadas em caixas de Petri e processadas pelo espectrómetro no modo refletância. Antes e depois de cada amostra ser processada, é utilizada uma placa de cerâmica branca como referência.

Os valores de refletância (R) são convertidos em valores de absorvância (A), usando a fórmula  $A = \log(1/R)$ .

Os espectros NIR de refletância difusa colecionados foram obtidos num espectrofotómetro LabSpec Pro Portable da ASDinc., com detector InGaAs, intervalo espectral entre os 450-2500 nm e 40 varrimentos por espectro.

Após a obtenção dos espectros NIR, os dados foram tratados com técnicas de quimiometria. A criação de modelos PLS, para a determinação de todos os parâmetros em estudo, foi realizada pelo *software* PLSplus IQ.

### **3.2.3. Desenvolvimento dos Modelos de Calibração**

Foram desenvolvidos modelos de calibração para correlacionar os dados espectrais NIR com os valores de referência dos parâmetros em estudo.

O método PLS foi o usado para a determinação das equações de calibração. Na construção de todos os modelos PLS, o procedimento seguiu sempre os mesmos contornos. A validação cruzada foi usada para estimar o número ótimo de termos (Shenk e Westerhaus, 1993). Devido ao número limitado de amostras e de modo a garantir um modelo mais robusto, capaz de responder a alterações, o sistema foi desenvolvido com recurso a validação cruzada (Dardenne *et al.*, 2000).

A calibração foi realizada com espectros sem tratamento ( $\log(1/R)$ ) e também aplicando 3 pré-tratamentos matemáticos diferentes: primeira derivada, SNV e MSC, de modo a decidir qual o mais vantajoso. Note-se que nem sempre o que apresenta menor erro é o mais vantajoso, uma vez que pode utilizar um número de factores em excesso ou considerar um número de *outliers* demasiado elevado.

Para cada tentativa, foram retiradas do grupo de calibração amostras *outliers*, determinadas segundo a distância *Mahalanobis*, de modo a diminuir o erro ou o número de factores utilizados. A distância *Mahalanobis* refere-se à distância entre cada espectro e um espectro médio determinado pelo *software*. Quando a distância é superior à unidade a amostra referente a esse espectro é considerada *outlier* (Shenk e Westerhaus, 1991).

### **3.2.4. Estatística**

A melhor equação de calibração é determinada com recurso à informação dada por vários parâmetros estatísticos. Nomeadamente, para uma boa calibração:

- O coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ) deverá estar próximo de 1 (Eq. 1);
- O enviesamento (Bias), a diferença média entre os valores de referência e previstos, deverá ser o mais baixo possível (Eq. 2);
- O RPD, a razão entre o desvio padrão (SD) e o SECV (Williams, 2001), deverá estar, dado tratar-se de uma aplicação agrícola, próximo ou acima de 3 (Eq. 3) (Williams e Sobering, 1996);
- O erro padrão de validação cruzada (SECV) deverá ser o mais baixo possível (Eq. 4).

### **$R^2$ - Coeficiente de determinação múltipla**

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Yp_i - \bar{Yk})^2}{\sum_{i=1}^n (Yk_i - \bar{Yk})^2} = \frac{\sum_{i=1}^n [(Yp_i - \bar{Yp})(Yk_i - \bar{Yk})]^2}{(\sum_{i=1}^n (Yp_i - \bar{Yp})^2)(\sum_{i=1}^n (Yk_i - \bar{Yk})^2)} \quad (1)$$

### **Bias – Enviesamento**

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^n (Yk_i - Yp_i)}{n} \quad (2)$$

### **RPD – Valor residual de previsão**

$$RPD = \frac{SD}{SECV} \quad (3)$$

### **SECV – Erro padrão da validação cruzada**

$$SECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (YK_i - Yp_i)^2}{n}} \quad (4)$$

Em que:

$Yk$ : Concentração conhecida;

$Yp$ : Concentração prevista;

$n$ : número de amostras.

## 4. Resultados

### 4.1. Silagens de erva

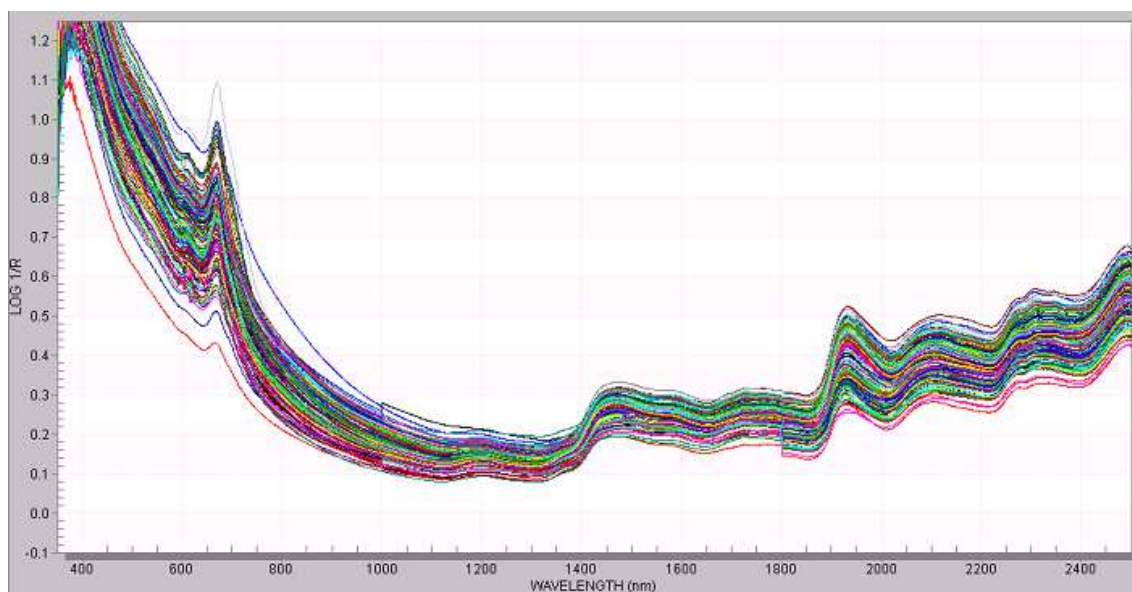
Na Tabela 3 é apresentada a caracterização química das silagens de erva, obtidas pelos métodos tradicionais.

**Tabela 3. Caracterização química das silagens de erva.**

| Parâmetro        | N.º de amostras | Mínimo<br>%MS | Máximo<br>%MS | Média<br>%MS | Desvio<br>Padrão (SD)<br>%MS |
|------------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|------------------------------|
| MS <sup>a</sup>  | 200             | 14,38         | 84,68         | 33,27        | 10,61                        |
| pH               | 200             | 3,70          | 6,80          | 4,40         | 0,41                         |
| AA <sup>b</sup>  | 200             | 3,55          | 23,49         | 12,97        | 3,90                         |
| PB <sup>c</sup>  | 200             | 6,53          | 22,34         | 12,80        | 3,22                         |
| NDF <sup>d</sup> | 200             | 46,76         | 78,99         | 59,21        | 5,40                         |
| ADF <sup>e</sup> | 200             | 31,41         | 52,57         | 38,69        | 4,50                         |
| ADL <sup>f</sup> | 200             | 1,94          | 38,88         | 6,44         | 7,27                         |
| EE <sup>g</sup>  | 200             | 1,03          | 4,81          | 2,49         | 0,61                         |
| CB <sup>h</sup>  | 200             | 6,99          | 18,25         | 11,55        | 2,15                         |

<sup>a</sup> MS = Matéria Seca; <sup>b</sup> AA = Azoto Amoniacal; <sup>c</sup> PB = Proteína Bruta; <sup>d</sup> NDF= Fibra em Detergente Neutro; <sup>e</sup> ADF = Fibra em Detergente Àcido; <sup>f</sup> ADL= Lenhina em Detergente Àcido; <sup>g</sup> EE = Extrato Etéreo; <sup>h</sup> CB = Cinza Bruta.

Todos os espectros de refletância difusa foram convertidos em  $\log(1/R)$ . A Figura 3 apresenta os espectros das amostras de silagem de erva sem pré-tratamento matemático.



**Figura 3. Conjunto de espectros originais (sem transformações matemáticas) de refletância na região NIR para as Silagens de Erva.**

Nas seguintes tabelas pode-se observar os parâmetros de qualidade obtidos na calibração e validação cruzada para cada um dos diferentes pré-tratamentos matemáticos.

**Tabela 4. Pré-tratamentos matemáticos para a MS (Matéria Seca), pH e AA (Azoto Amoniacal) para as silagens de erva.**

| Parâmetro | TM <sup>a</sup> | R <sup>2</sup> <sup>b</sup> | SECV <sup>c</sup> | Bias <sup>d</sup> | RPD <sup>e</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| MS        | A               | 0,71                        | 4,46              | -0,1800           | 2,38             |
|           | B               | 0,54                        | 5,86              | 0,0174            | 1,81             |
|           | C               | 0,68                        | 3,89              | -0,0440           | 2,73             |
|           | D               | 0,73                        | 4,20              | 0,0057            | 2,53             |
| pH        | A               | 0,46                        | 0,29              | 0,0008            | 1,44             |
|           | B               | 0,52                        | 0,30              | -0,0001           | 1,38             |
|           | C               | 0,49                        | 1,28              | 0,0021            | 0,32             |
|           | D               | 0,46                        | 0,29              | 0,0052            | 1,41             |
| AA        | A               | 0,11                        | 3,60              | -0,0028           | 1,08             |
|           | B               | 0,19                        | 3,73              | -0,0020           | 1,05             |
|           | C               | 0,11                        | 3,72              | 0,0071            | 1,05             |
|           | D               | 0,09                        | 3,76              | 0,0055            | 1,04             |

<sup>a</sup> TM = Pré-tratamentos Matemáticos: A = Sem tratamento matemático (log 1/R); B = Primeira derivada; C = SNV; D = MSC; <sup>b</sup> R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação múltipla; <sup>c</sup>SECV = Erro padrão da validação cruzada ; <sup>d</sup> Bias = Diferença média entre os valores de previsão e os valores de referência; <sup>e</sup> RPD = Valor residual de previsão (SD/SECV).

**Tabela 5. Pré-tratamentos matemáticos para PB(Proteína Bruta), NDF(Fibra em Detergente Neutro), ADF(Fibra em Detergente ácido) e ADL(Lenhina em Detergente ácido) para as silagens de erva.**

| Parâmetro | TM <sup>a</sup> | R <sup>2</sup> <sup>b</sup> | SECV <sup>c</sup> | Bias <sup>d</sup> | RPD <sup>e</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| PB        | A               | 0,95                        | 0,80              | -0,0140           | 4,04             |
|           | B               | 0,92                        | 0,94              | -0,0137           | 3,44             |
|           | C               | 0,95                        | 0,88              | -0,0109           | 3,64             |
|           | D               | 0,93                        | 0,99              | -0,0003           | 3,26             |
| NDF       | A               | 0,86                        | 1,79              | -0,0417           | 3,02             |
|           | B               | 0,83                        | 1,80              | -0,0212           | 3,00             |
|           | C               | 0,83                        | 2,14              | -0,0291           | 2,52             |
|           | D               | 0,84                        | 2,62              | -0,0344           | 2,06             |
| ADF       | A               | 0,91                        | 1,45              | -0,0090           | 3,11             |
|           | B               | 0,90                        | 1,44              | -0,0076           | 3,12             |
|           | C               | 0,91                        | 1,39              | 0,0084            | 3,24             |
|           | D               | 0,90                        | 1,51              | 0,0128            | 2,97             |
| ADL       | A               | 0,51                        | 5,85              | 0,0114            | 1,24             |
|           | B               | 0,17                        | 6,20              | 0,0255            | 1,17             |
|           | C               | 0,18                        | 6,26              | 0,0394            | 1,16             |
|           | D               | 0,34                        | 6,09              | 0,0819            | 1,19             |

<sup>a-e</sup> Ver Tabela 4

**Tabela 6. Pré-tratamentos matemáticos para EE (Extracto Etereo) e CB (Cinza Bruta) para as silagens de erva.**

| Parâmetro | TM <sup>a</sup> | R <sup>2</sup> <sup>b</sup> | SECV <sup>c</sup> | Bias <sup>d</sup> | RPD <sup>e</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| EE        | A               | 0,43                        | 0,44              | 0,0042            | 1,39             |
|           | B               | 0,37                        | 0,47              | 0,0011            | 1,29             |
|           | C               | 0,46                        | 0,45              | 0,0035            | 1,36             |
|           | D               | 0,43                        | 0,45              | 0,0040            | 1,34             |
| CB        | A               | 0,90                        | 0,70              | -0,0124           | 3,07             |
|           | B               | 0,87                        | 0,71              | 0,0063            | 3,02             |
|           | C               | 0,87                        | 0,73              | 0,0086            | 2,93             |
|           | D               | 0,87                        | 0,80              | 0,0176            | 2,69             |

<sup>a-e</sup> Ver Tabela 4

As próximas figuras apresentam a distribuição das amostras do modelo de calibração e validação cruzada na reta de regressão.

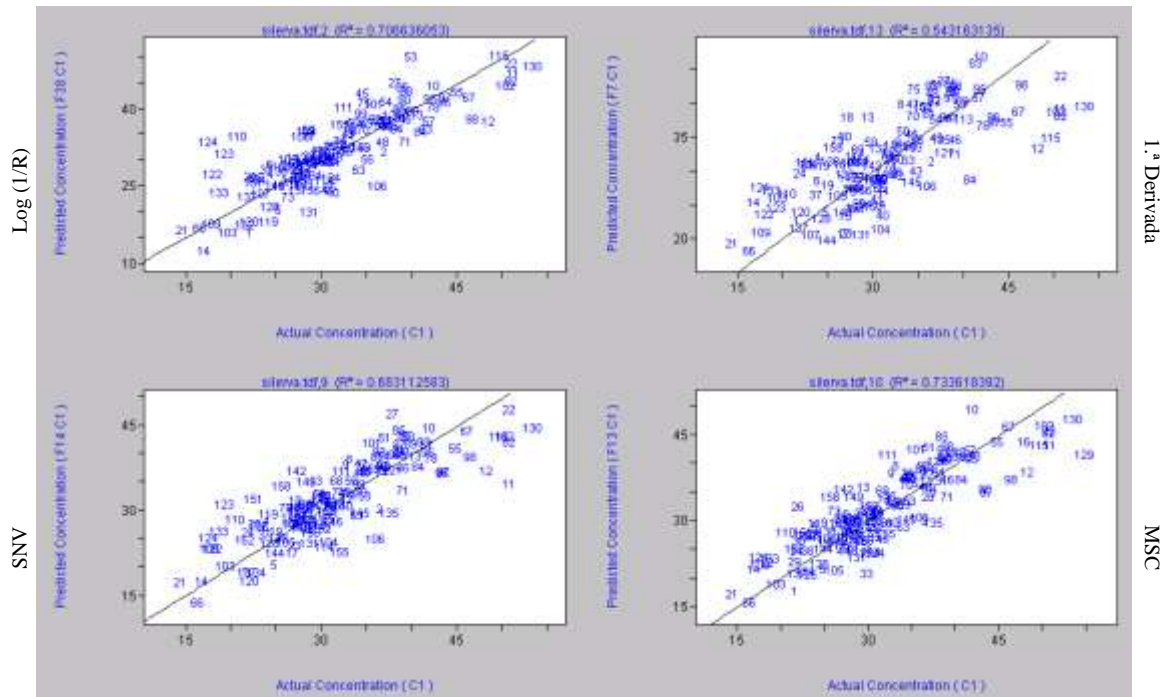


Figura 4. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Matéria Seca (MS) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

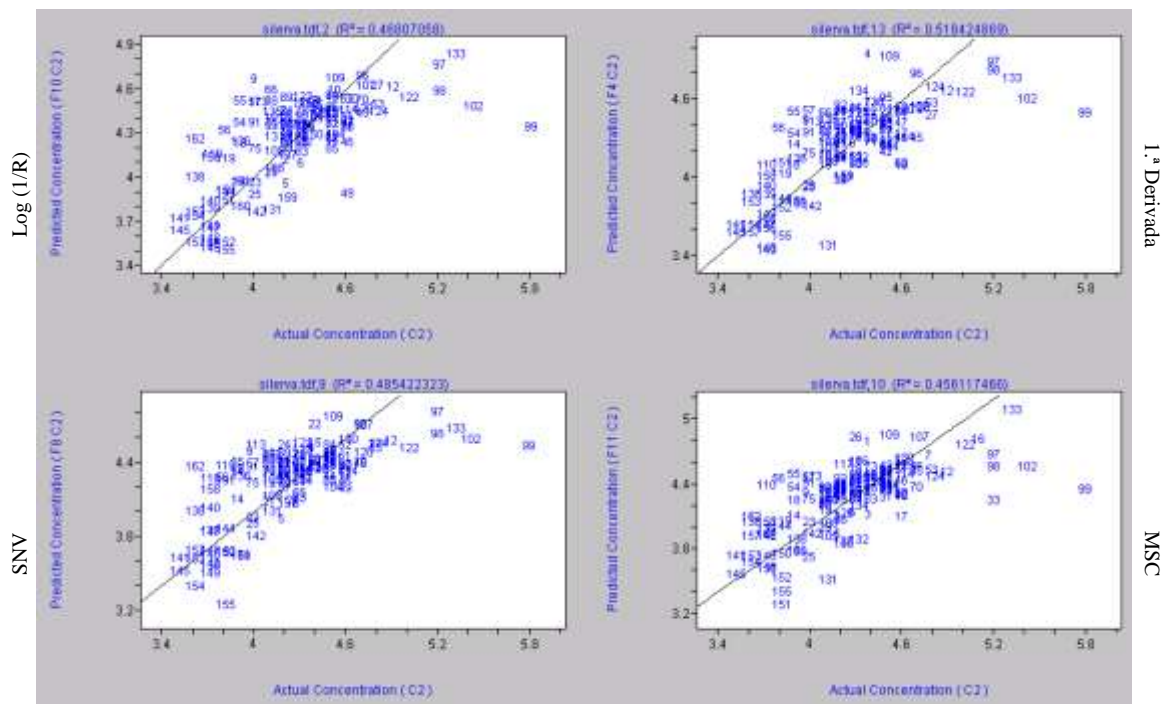


Figura 5. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o pH com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

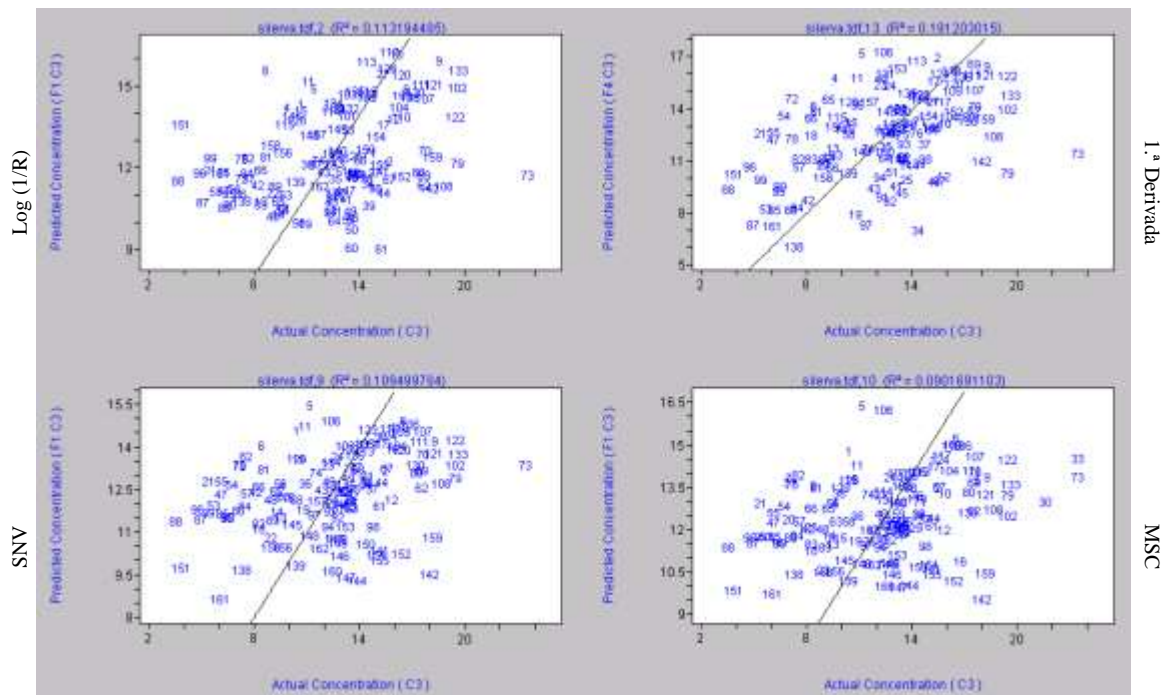


Figura 6. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o Azoto Amoniacal (AA) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

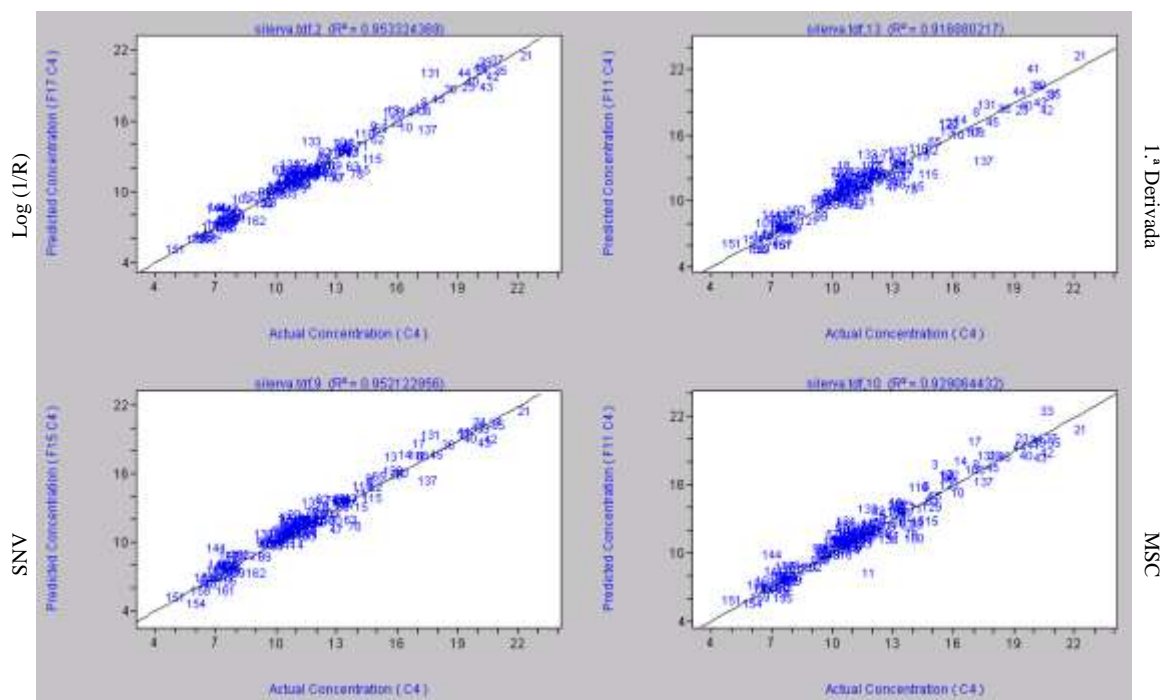


Figura 7. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Proteína Bruta (PB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

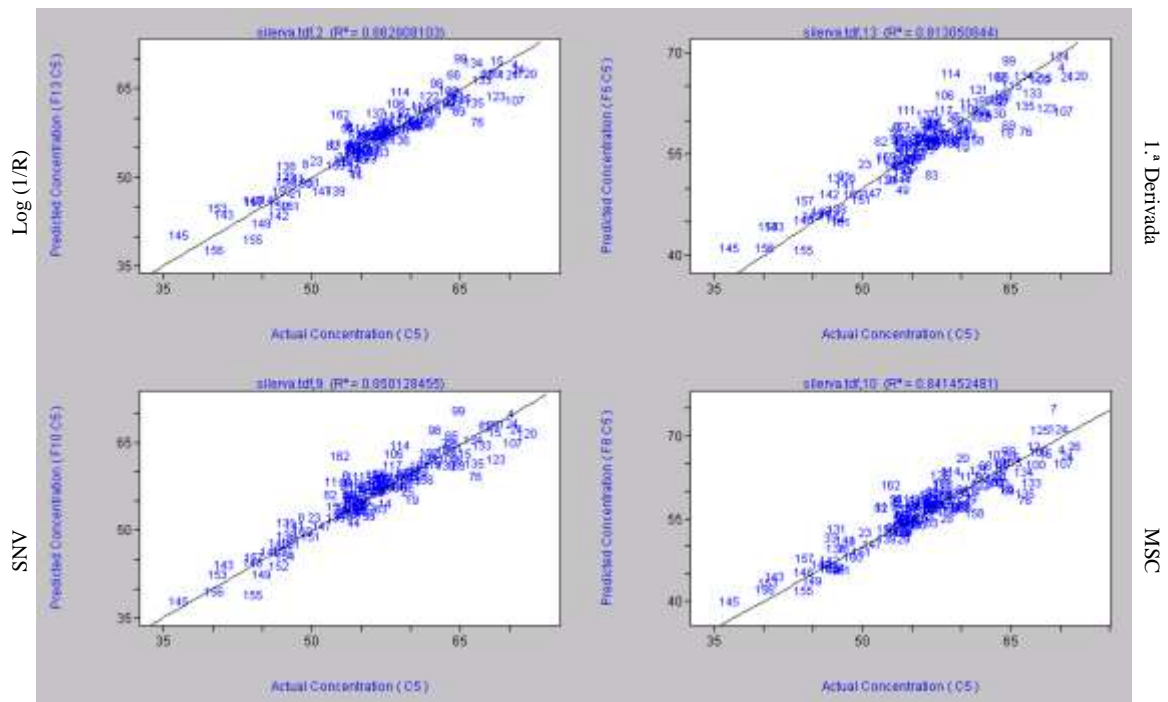


Figura 8. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Neutro (NDF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

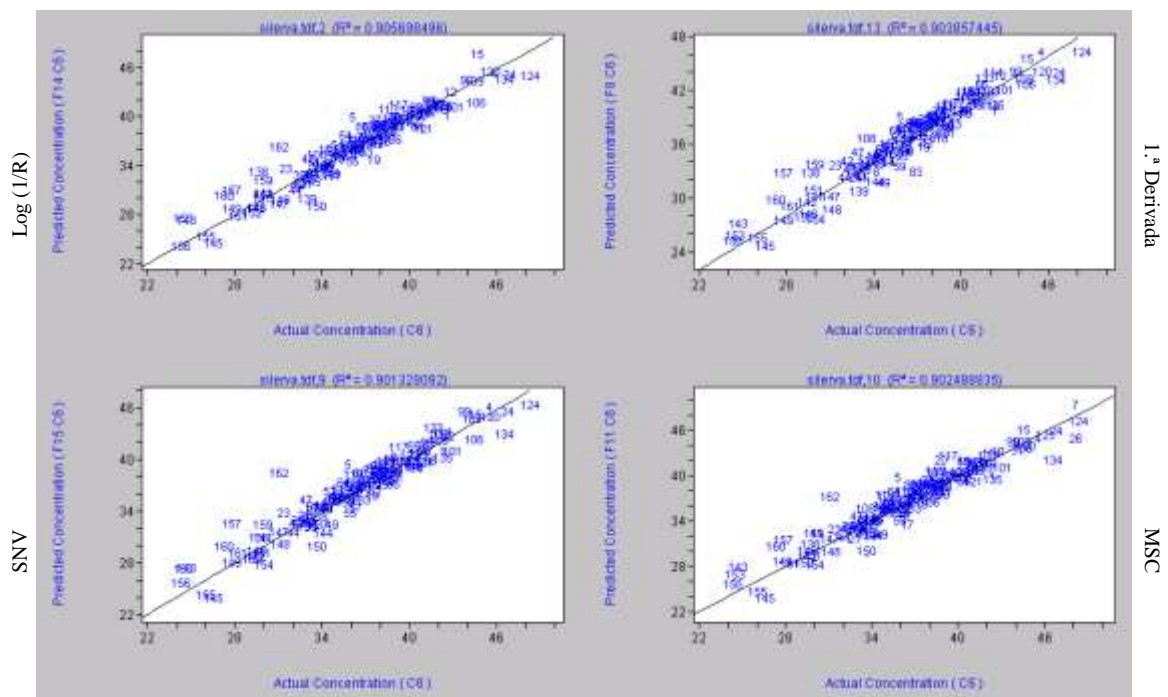


Figura 9. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Ácido (ADF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

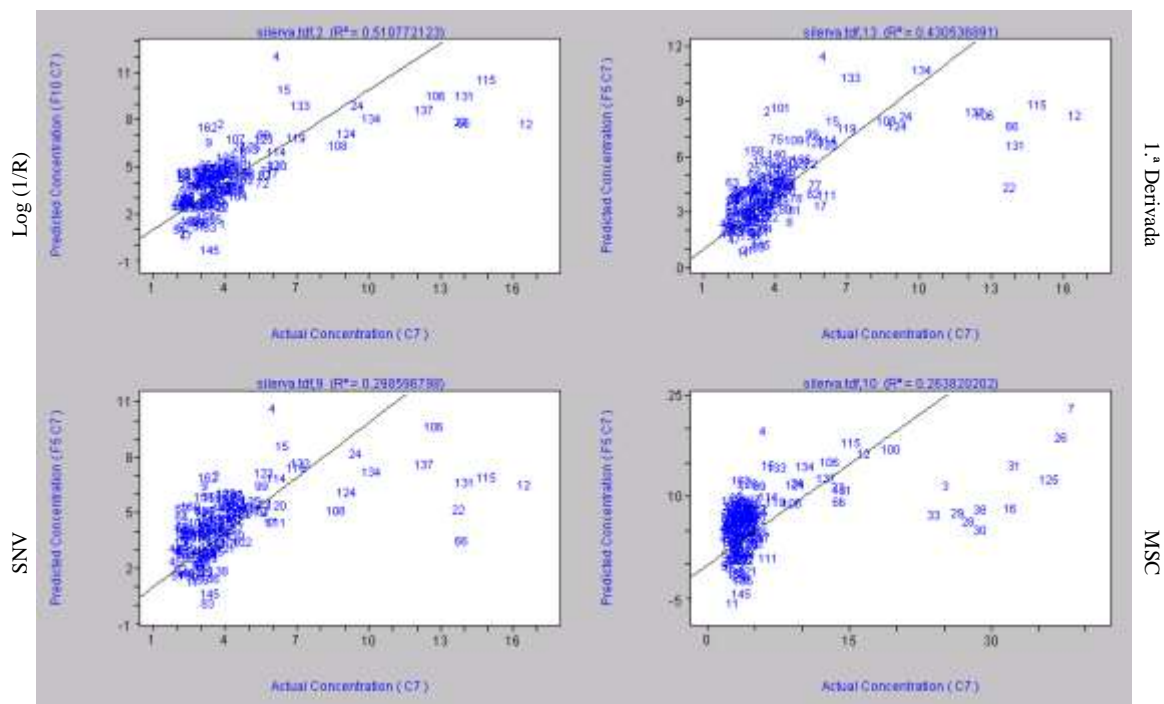


Figura 10. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Lenhina em Detergente Ácido (ADL) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

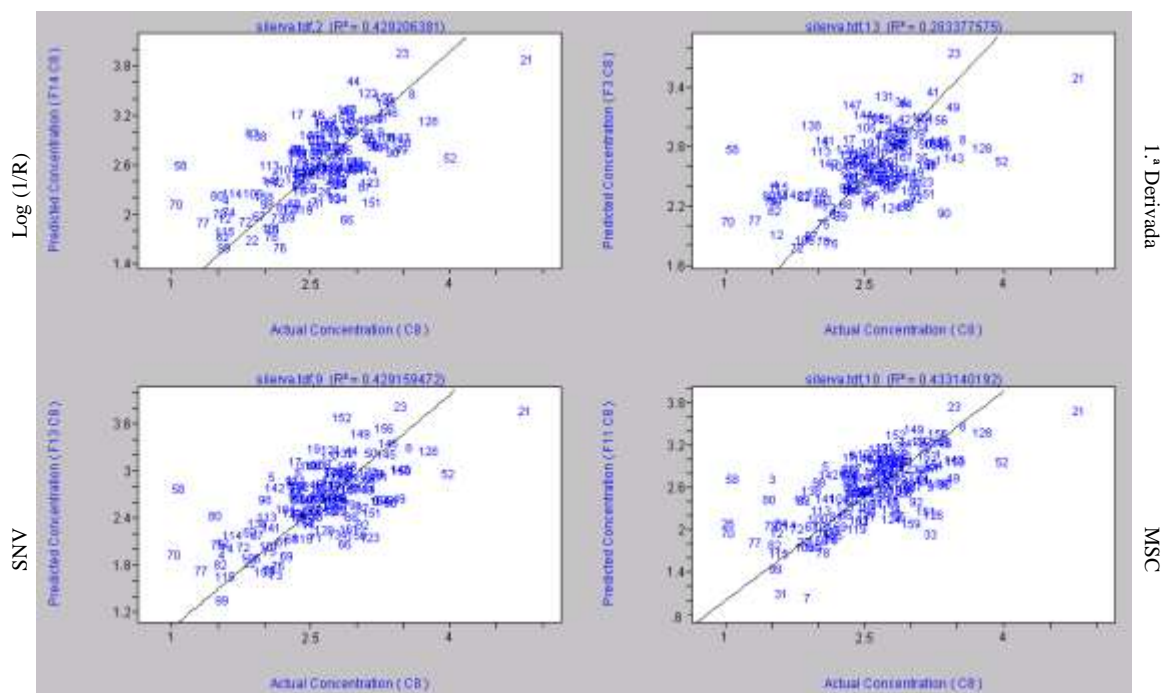


Figura 11. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para Extrato Etéreo (EE) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

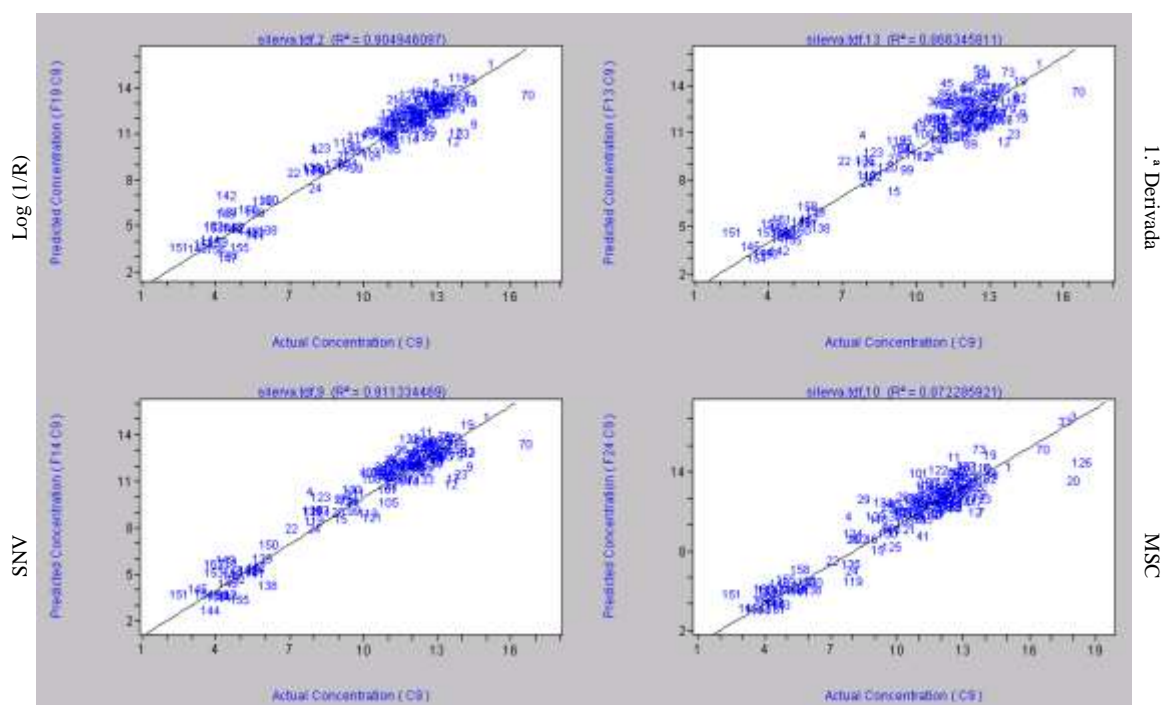


Figura 12. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Cinza Bruta (CB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

#### 4.2. Silagens de milho

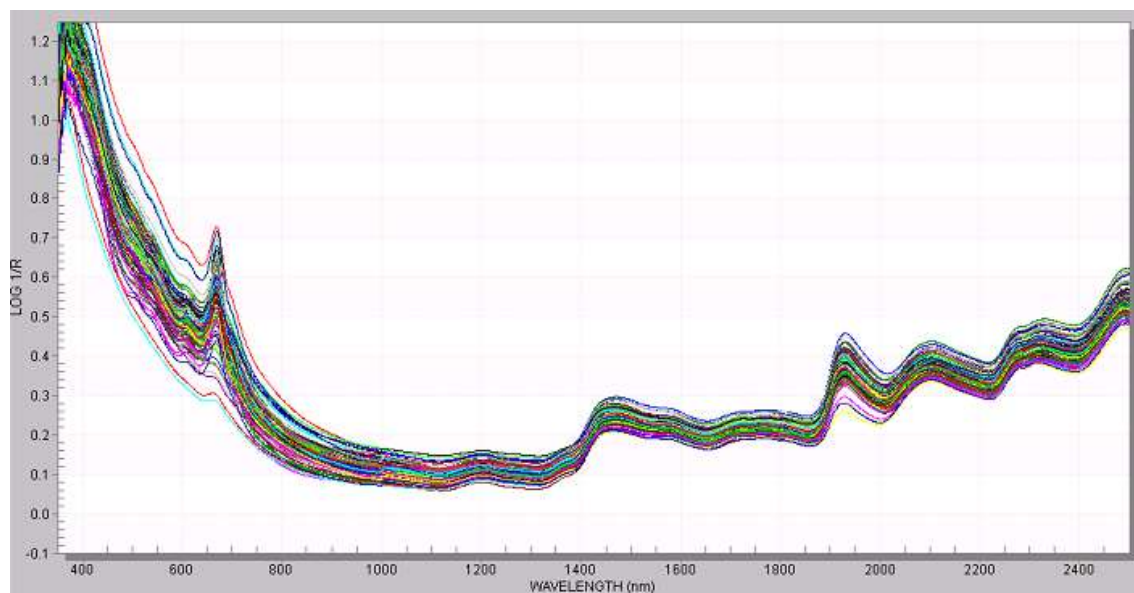
A Tabela 7 apresenta a caracterização química das silagens de milho, obtidas pelos métodos tradicionais.

Tabela 7. Caracterização química das silagens de milho.

| Parâmetro        | Nº de amostras | Mínimo %MS | Máximo %MS | Média %MS | Desvio Padrão (SD) %MS |
|------------------|----------------|------------|------------|-----------|------------------------|
| MS <sup>a</sup>  | 102            | 21,23      | 39,77      | 28,37     | 3,70                   |
| pH               | 102            | 3,30       | 4,60       | 3,74      | 0,22                   |
| AA <sup>b</sup>  | 102            | 3,70       | 18,00      | 11,58     | 3,34                   |
| PB <sup>c</sup>  | 102            | 4,86       | 9,25       | 7,20      | 0,83                   |
| NDF <sup>d</sup> | 102            | 36,28      | 61,01      | 47,15     | 5,42                   |
| ADF <sup>e</sup> | 102            | 21,62      | 35,97      | 29,24     | 3,52                   |
| ADL <sup>f</sup> | 102            | 2,14       | 5,39       | 3,31      | 0,68                   |
| EE <sup>g</sup>  | 102            | 1,75       | 3,43       | 2,72      | 0,45                   |
| CB <sup>h</sup>  | 102            | 2,38       | 6,04       | 4,46      | 0,93                   |

<sup>a-h</sup> Ver Tabela 3

Todos os espectros de refletância difusa foram convertidos em  $\log(1/R)$ . A Figura 13 apresenta os espectros das amostras de silagem de milho sem pré-tratamento matemático.



**Figura 13. Conjunto de espectros originais (sem transformações matemáticas) de refletância na região NIR para as Silagens de Milho.**

Nas seguintes tabelas pode-se observar os parâmetros de qualidade obtidos na calibração e validação cruzada para cada um dos diferentes pré-tratamentos matemáticos.

**Tabela 8. Pré-tratamentos matemáticos para os conjuntos de calibração para a MS (Matéria Seca), pH e AA (Azoto Amoniacal) para as Silagens de Milho.**

| Parâmetro | TM <sup>a</sup> | R <sup>2</sup> <sup>b</sup> | SECV <sup>c</sup> | Bias <sup>d</sup> | RPD <sup>e</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| MS        | A               | 0,63                        | 1,30              | -0,0237           | 2,85             |
|           | B               | 0,37                        | 2,44              | -0,0302           | 1,52             |
|           | C               | 0,70                        | 1,29              | 0,0370            | 2,87             |
|           | D               | 0,62                        | 1,31              | -0,0127           | 2,82             |
| pH        | A               | 0,40                        | 0,16              | 0,0017            | 1,35             |
|           | B               | 0,17                        | 0,24              | 0,0015            | 0,93             |
|           | C               | 0,56                        | 0,15              | 0,0003            | 1,48             |
|           | D               | 0,47                        | 0,16              | 0,0023            | 1,37             |
| AA        | A               | 0,29                        | 2,88              | -0,0766           | 1,16             |
|           | B               | 0,18                        | 3,00              | -0,0460           | 1,11             |
|           | C               | 0,25                        | 2,71              | -0,0080           | 1,23             |
|           | D               | 0,27                        | 2,89              | -0,0724           | 1,16             |

<sup>a-e</sup> Ver Tabela 4

**Tabela 9. Pré-tratamentos matemáticos para os conjuntos de calibração para PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF (Fibra em Detergente ácido) e ADL (Lenhina em Detergente Ácido) para as Silagens de Milho.**

| Parâmetro | TM <sup>a</sup> | R <sup>2b</sup> | SECV <sup>c</sup> | Bias <sup>d</sup> | RPD <sup>e</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|
| PB        | A               | 0,87            | 0,27              | -0,0125           | 3,07             |
|           | B               | 0,53            | 0,62              | 0,0076            | 1,34             |
|           | C               | 0,85            | 0,26              | -0,0055           | 3,16             |
|           | D               | 0,86            | 0,27              | -0,0115           | 3,07             |
| NDF       | A               | 0,87            | 1,79              | 0,0431            | 3,03             |
|           | B               | 0,58            | 3,48              | -0,0566           | 1,56             |
|           | C               | 0,85            | 1,80              | 0,0199            | 3,01             |
|           | D               | 0,87            | 1,78              | 0,03256           | 3,04             |
| ADF       | A               | 0,81            | 1,17              | -0,0189           | 3,01             |
|           | B               | 0,67            | 1,97              | -0,0102           | 1,79             |
|           | C               | 0,84            | 1,16              | 0,0189            | 3,03             |
|           | D               | 0,78            | 1,73              | 0,0042            | 2,03             |
| ADL       | A               | 0,75            | 0,36              | 0,0078            | 1,90             |
|           | B               | 0,14            | 0,60              | 0,0058            | 1,13             |
|           | C               | 0,75            | 0,35              | 0,0051            | 1,96             |
|           | D               | 0,73            | 0,36              | 0,0147            | 1,87             |

<sup>a-e</sup> Ver Tabela 4**Tabela 10. Pré-tratamentos matemáticos para os conjuntos de calibração para EE (Extracto Etereo) e CB (Cinza Bruta) para as Silagens de Milho.**

| Parâmetro | TM <sup>a</sup> | R <sup>2b</sup> | SECV <sup>c</sup> | Bias <sup>d</sup> | RPD <sup>e</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|
| EE        | A               | 0,73            | 0,25              | 0,0099            | 1,83             |
|           | B               | 0,49            | 0,32              | -0,0009           | 1,40             |
|           | C               | 0,69            | 0,25              | 0,0012            | 1,83             |
|           | D               | 0,72            | 0,23              | 0,0041            | 1,96             |
| CB        | A               | 0,93            | 0,24              | -0,0076           | 3,88             |
|           | B               | 0,58            | 0,59              | 0,0086            | 1,58             |
|           | C               | 0,88            | 0,26              | -0,0079           | 3,58             |
|           | D               | 0,92            | 0,30              | -0,0551           | 3,10             |

As próximas figuras apresentam a distribuição das amostras do modelo de calibração e validação cruzada na reta de regressão.

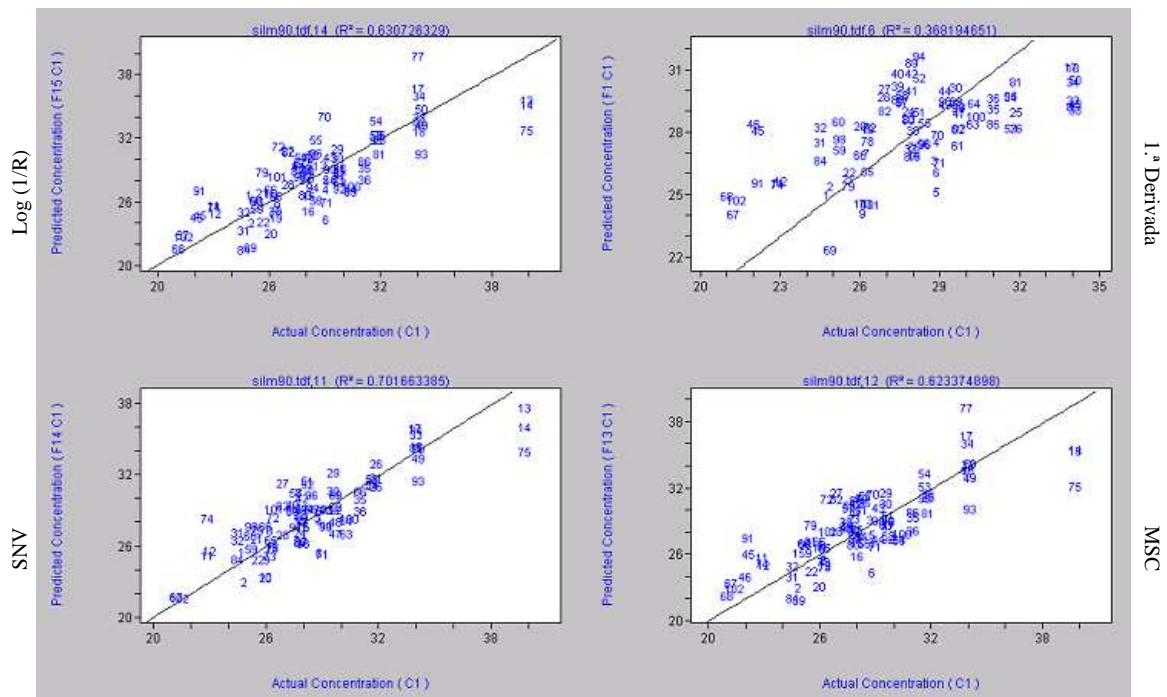


Figura 14. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Matéria Seca (MS) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

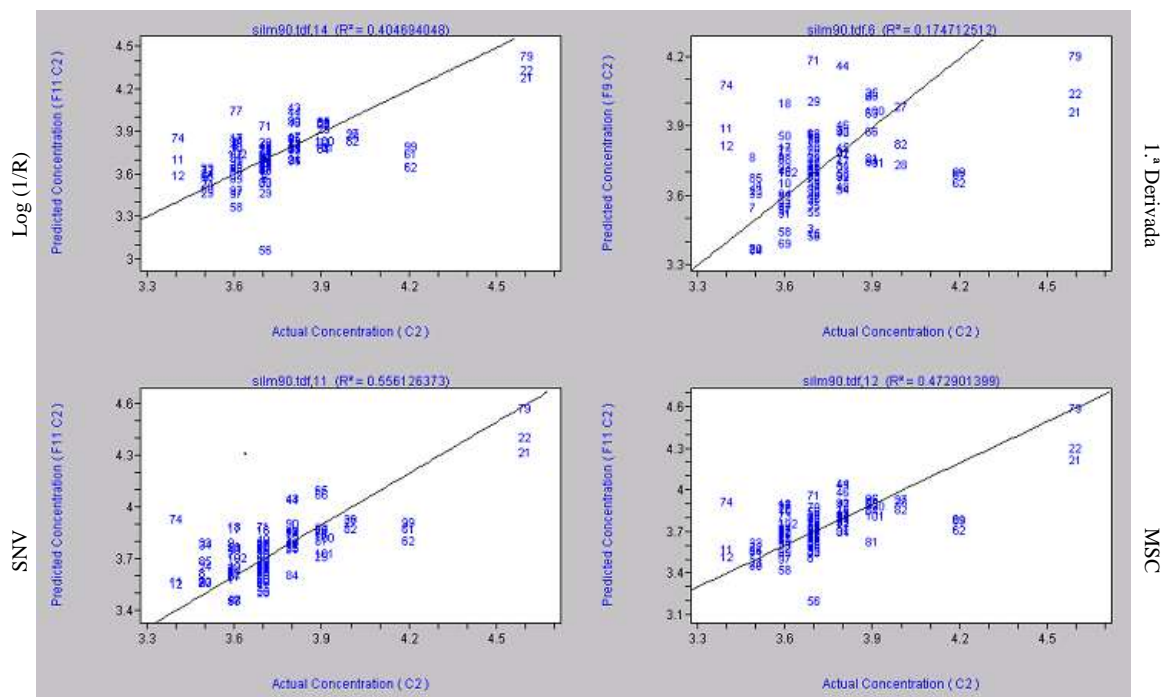


Figura 15. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a pH com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

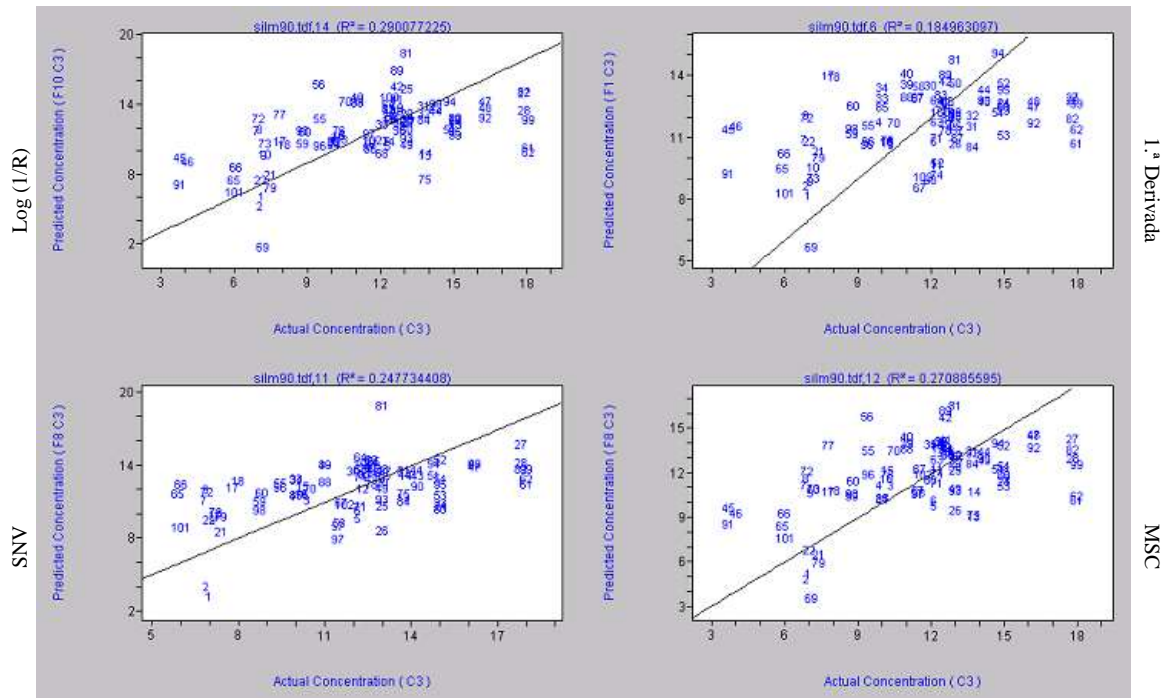


Figura 16. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o Azoto Amoniacal (AA) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

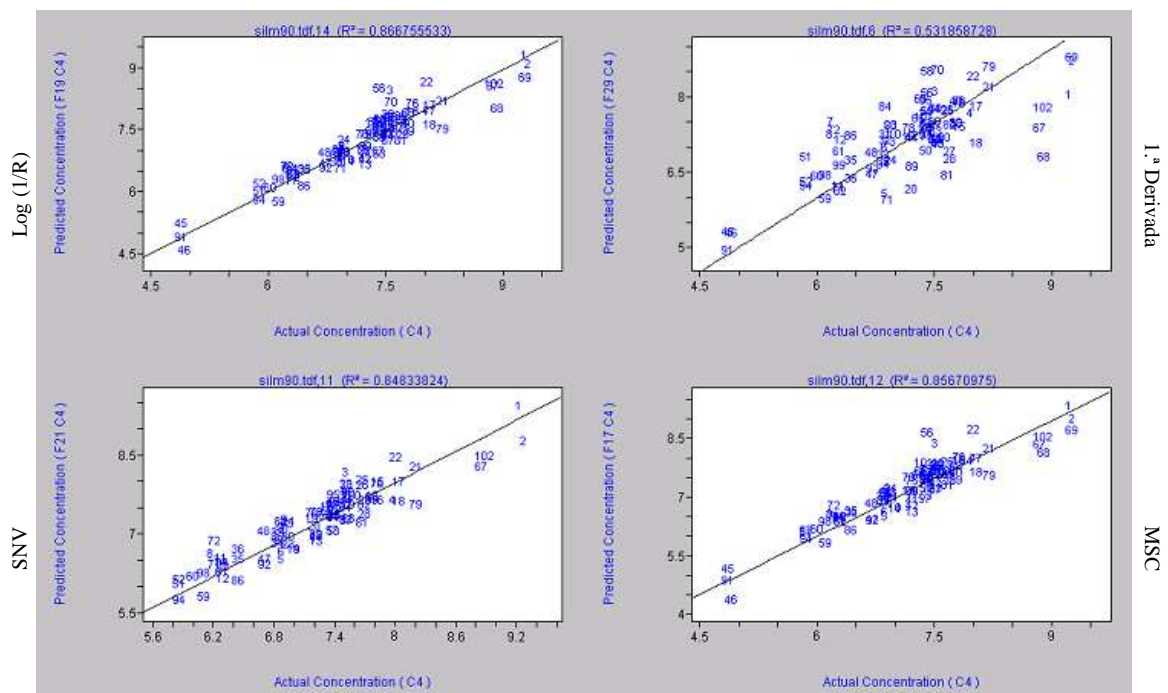


Figura 17. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Proteína Bruta (PB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

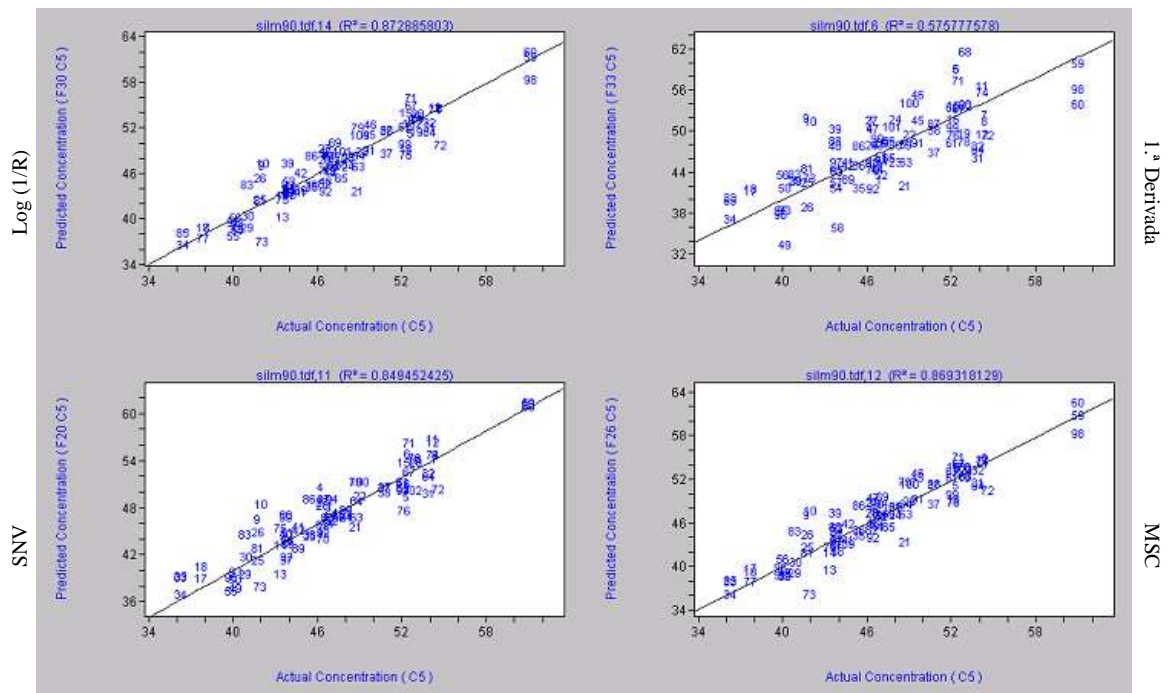


Figura 18. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Neutro (NDF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

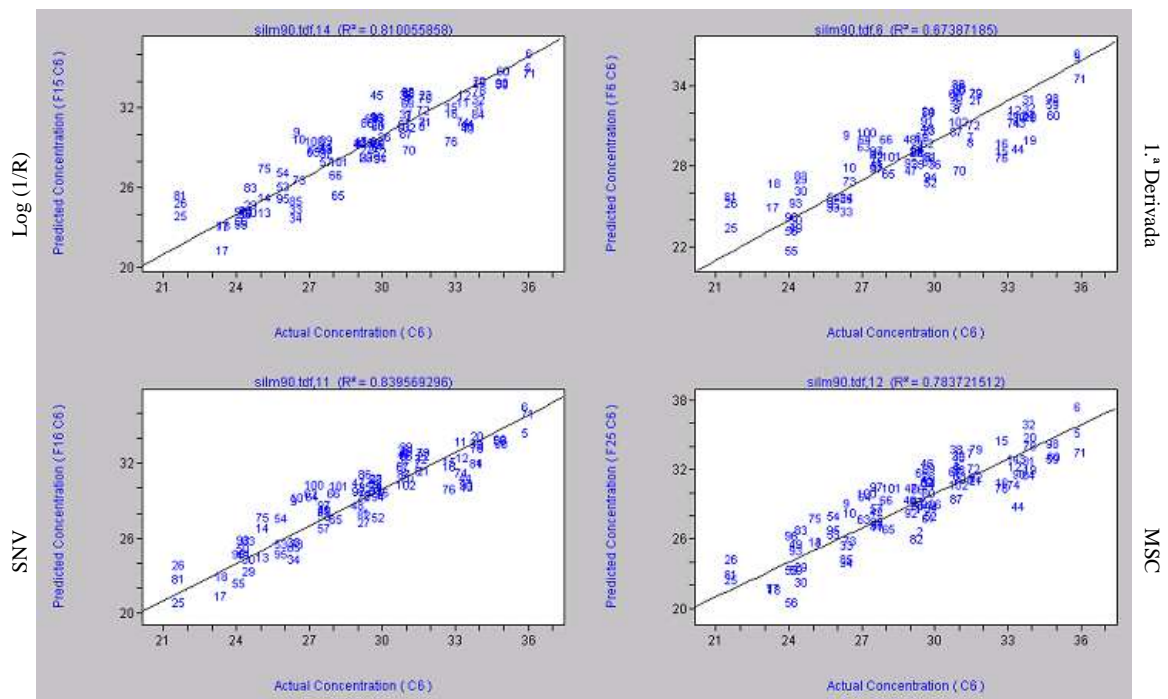


Figura 19. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Fibra em Detergente Ácido (ADF) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

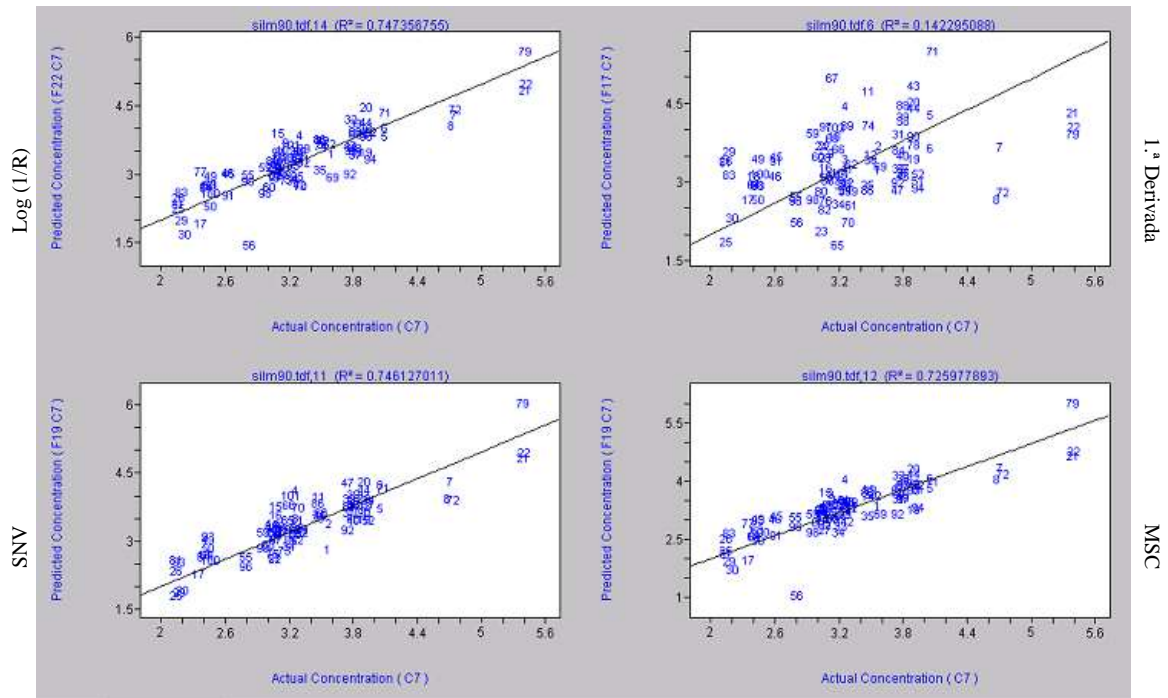


Figura 20. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Lenhina em Detergente Ácido (ADL) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

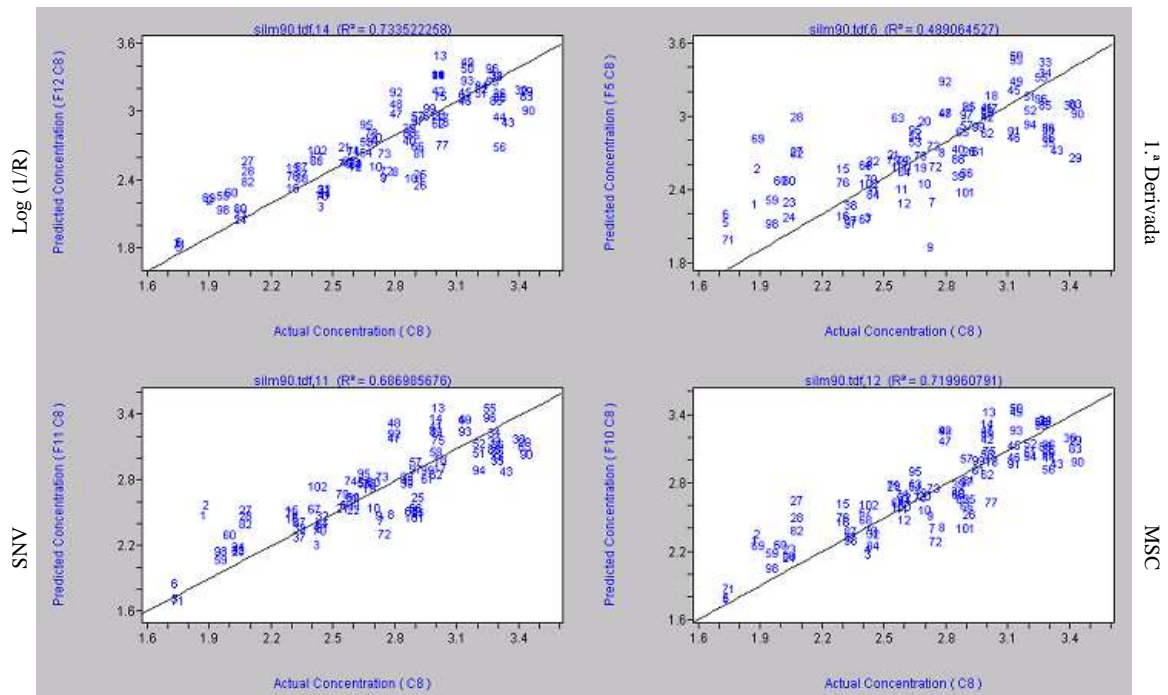


Figura 21. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para o Extrato Etéreo (EE) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

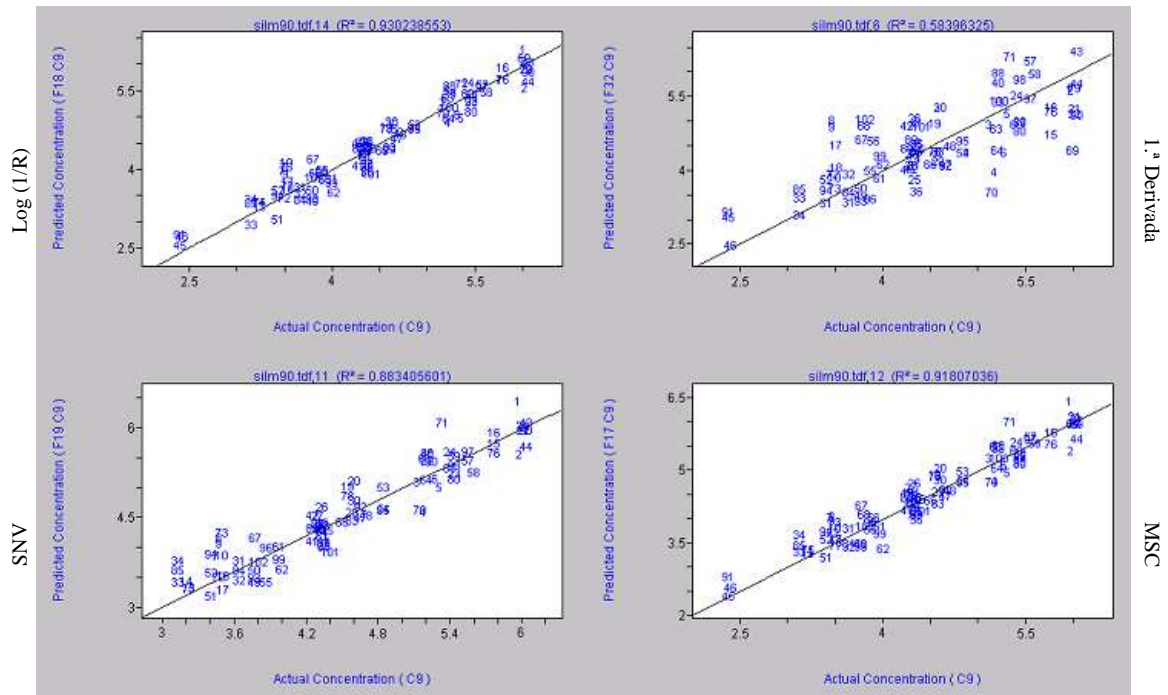


Figura 22. Verificação da linearidade entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo PLS desenvolvido para a Cinza Bruta (CB) com os diferentes pré-tratamentos matemáticos.

## 5. Discussão

### 5.1. Caracterização Química

A composição química das silagens de erva e milho, usadas na calibração, estão representadas na Tabela 3 e Tabela 7, respectivamente. Já a Tabela 11 apresenta valores de referência que nos permitem avaliar a sua qualidade.

Constata-se que, no caso das silagens de erva, os valores máximos da MS (84,86%) e do ADF (52,57 %MS) são particularmente elevados, enquanto o mínimo da PB (6,53 %MS) é baixo. Já os valores médios para ambas as silagens encontram-se próximos dos intervalos de referência. No que diz respeito à variabilidade das amostras, refletida pelo valor do desvio padrão, verifica-se que esta é ampla, o que comprova a heterogeneidade das amostras e é justificável pelo facto de as silagens analisadas poderem ter diferentes estádios de desenvolvimento e distintos processos de ensilagem (Fontaneli *et al.*,2002). Mesmo assim, a silagem de milho mostra, em geral, menos variabilidade do que a de erva, excepto para o caso do NDF. A maior variabilidade das propriedades das silagens de erva, juntamente com o facto de haver um maior número de amostras, fazem deste um conjunto de calibração mais adequado, o que foi corroborado pelos resultados práticos.

**Tabela 11. Tabela usada para a avaliação de silagens (adaptado de Kung e Shaver, 2001)**

| Parâmetro | Silagem Erva | Silagem Milho |
|-----------|--------------|---------------|
| % MS      | 30 - 35      | 30 - 40       |
| pH        | 4,3 - 4,7    | 3,7 - 4,2     |
| % AA      | 8 - 12       | 5 - 7         |
| % PB      | 17 - 20      | > 8           |
| % NDF     | 50 - 55      | 46 - 50       |
| % ADF     | < 30         | 23 - 30       |
| % ADL     | 3 - 5        | 3 - 5         |
| % EE      | 2 - 3        | 2 - 3         |
| % CB      | < 10         | 5 - 7         |

De notar que, das 200 amostras de silagens de erva e 102 de silagens de milho analisadas, foi necessário eliminar menos de 10% de *outliers*, o que está de acordo com a recomendação do manual de utilização NIR (PLSplus IQ) e é um indicador de que a população alvo foi bem representada.

## 5.2. Análise da Espectroscopia NIR

Para a construção dos modelos de regressão, foram utilizados os espectros das 200 amostras de silagens de erva e 102 silagens de milho. Estes conjuntos foram considerados separadamente, por forma a aumentar a precisão da calibração (Corson *et al.*, 1999).

Os espectros NIR sem pré-tratamento obtidos das amostras de silagem de erva e milho, estão representadas nas figuras 3 e 13, sendo possível observar uma boa homogeneidade no conjunto dos espectros. Os espectros obtidos apresentam grande semelhança com os espectros tipo deste género de amostras (Figura 23).

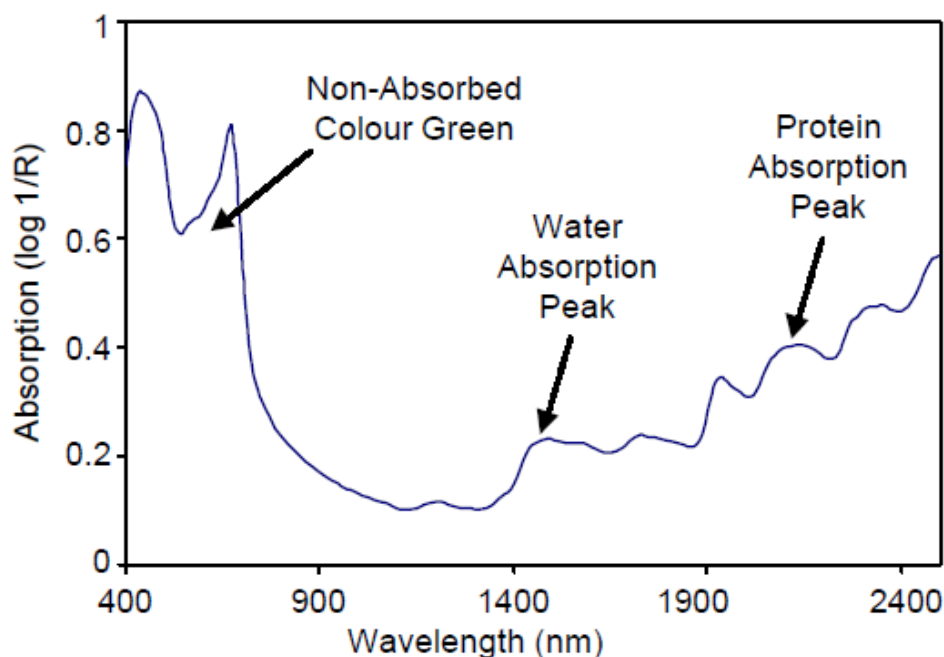


Figura 23. Relação entre o comprimento de onda e a absorção de um espectro NIR típico de silagens (Corson *et al.*, 1999)

Para facilitar a interpretação dos espectros NIR, foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada por PLS para prever as concentrações de MS (Matéria Seca),

pH, AA (Azoto Amoniacal), PB (Proteína Bruta), NDF (Fibra em Detergente Neutro), ADF, ADL, EE e CB (Cinza Bruta) nas silagens de erva e milho, sendo que, segundo a literatura, os melhores resultados são normalmente obtidos para a PB, NDF, ADF e CB (Villamarín, 2002). No conjunto de calibração, foram aplicados diferentes pré-tratamentos matemáticos: primeira derivada, SNV e MSC, com o objectivo de facilitar a interpretação dos espectros, melhorando a qualidade de previsão dos modelos de calibração.

Nas tabelas 4 a 6 para as silagens de erva e tabelas 8 a 10 para as silagens de milho, estão sumarizados os valores estatísticos que permitem a avaliação do desempenho das equações de calibração para cada pré-tratamento. As figuras 4 a 12 para as silagens de erva e figuras 14 a 22 para as silagens de milho, ilustram graficamente as retas de calibração obtidas.

Os melhores resultados foram obtidos com as silagens de erva. Para a PB e o ADF, independentemente do pré-tratamento, observaram-se valores de  $R^2$  sempre iguais ou superiores a 0,90, com o RPD a variar entre os 2,97 e os 4,04. Estes comparam com  $R^2$  de 0,96 para a PB e 0,92 para o ADF, relatados por Villamarín *et al.* (2002). Para o NDF, também foram obtidas equações de calibração com  $R^2$  e RPD elevados, de 0,86 e 3,02 respetivamente, no caso em que não foi aplicado qualquer pré-tratamento (A), tendo Villamarín *et al.* (2002), obtido um  $R^2$  de 0,95. Já para a MS, o melhor resultado foi alcançado com o pré-tratamento C, chegando-se a um  $R^2$  de 0,68 e RPD de 2,73, comparáveis ao  $R^2$  de 0,79 obtido por Znidarsic *et al.* (2006). As equações de calibração para os restantes parâmetros revelaram-se pouco fiáveis, com o  $R^2$  máximo a situar-se nos 0,52 e o RPD a não ultrapassar os 1,44. Estes últimos parâmetros, são normalmente omitidos na literatura, presumivelmente por ser difícil obter resultados de relevo para eles. Embora existam alguns relatos de resultados fiáveis para o pH e AA (Azoto Amoniacal), em amostras não secas, nomeadamente  $R^2$  de 0,98, para o pH, por Park *et al.* (1997) e  $R^2$  de 0,91, para o AA, por Reeves *et al.* (1989), o mesmo não se verifica quando a amostra se apresenta seca.

Para as silagens de milho, a calibração mais fiável foi a da CB, com  $R^2$  de 0,93 e RPD de 3,88, sem aplicação de qualquer pré-tratamento espectral. Para os parâmetros PB, NDF e ADF, também foram conseguidos valores de RPD acima de 3, embora os de  $R^2$  não ultrapassassem os 0,87. Estes comparam com os  $R^2$  de 0,91 para a PB e 0,60 para o

NDF conseguidos por (Cozzolino, 2006), enquanto que (Fontaneli *et al.*, 2002) relata  $R^2$  iguais ou acima dos 0,98 para os três parâmetros. Novamente, não foram obtidos resultados fiáveis para os restantes, em linha com o relatado por (Cozzolino, 2006), com  $R^2$  de 0,51 para o pH, e Sorensen, 2004, que obteve  $R^2$  de 0,62 e 0,72 para o pH e AA, respetivamente.

Globalmente, constata-se que as melhores abordagens são a A, sem pré-tratamento, e C, com pré-tratamento SNV.

Um fator que poderá justificar algumas das diferenças observadas nos resultados é o número de amostras usadas no processo de calibração. Tome-se o exemplo de (Villamarín *et al.*, 2002), que refere ter usado 366 amostras de silagens de erva, enquanto que Fontaneli *et al.*, 2002 relata um conjunto de calibração com 246 amostras de silagem de milho. Estes valores comparam, respetivamente, com as 200 e 120 amostras em que se baseou este estudo. Sabendo-se da importância que tem o número de amostras no processo de calibração, é espetável que os resultados possam ser melhorados mediante a recolha e uso de mais amostras.

## 6. Conclusão

A Espectroscopia NIR é um método rápido, não destrutivo e que praticamente elimina erros associados ao operador, uma vez que a preparação da amostra é mínima. Para além disto, esta técnica permite determinar, em simultâneo, vários parâmetros com elevada rapidez, precisão e a baixo custo, fornecendo análises químicas e nutricionais de silagens.

No caso da ilha Terceira, a calibração realizada no âmbito deste trabalho, oferece boas perspectivas de aplicação desta técnica à determinação da PB, NDF, ADF e CB de silagens de erva e milho. Estes resultados estão em linha com os que são descritos na literatura, onde são, tipicamente, estes os parâmetros para os quais são obtidos melhores valores. Mesmo assim, é de registar uma diferença de capacidade preditiva entre as silagens de erva e milho, explicada pela falta de mais amostras para o conjunto de calibração de silagens de milho.

Espera-se que o desenvolvimento destes modelos de calibração permita o acompanhamento de mais do que um parâmetro na qualidade de silagens da ilha Terceira, dispensando a obrigatoriedade de recorrer a métodos de referência morosos e dispendiosos.

## 7. Perspetivas Futuras

Aperfeiçoamento dos modelos criados, especialmente aqueles com um menor número de amostras (silagens de milho).

Os métodos desenvolvidos, requerem manutenção e atualização, para que alterações existentes no processamento das amostras, possam continuar a ser respondidos eficazmente pela calibração.

No caso de se substituir alguma peça no *hardware*, bem como atualizações no *software*, é necessário realizar testes de controlo e revalidar os modelos existentes.

## 8. Bibliografia

- A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists, 1975. *Official Methods of Analysis*. 12Th ed. Washington, DC.
- Almeida, F., 2009. *Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier na caracterização de farinhas para alimentação Pueril*. Tese de Doutoramento, Instituto Superior Técnico.
- Andueza, D., Picard, F., Jestin, M., Andrieu, J., Baumont, R., 2011. NIRS prediction of feed value of temperate forages: efficacy of four calibration strategies. *Animal*, 5:7, 1002-1013.
- Bakeev, K., 2005. *Process Analytical Technology*. Blackwell Publishing.
- Barton, F. E., Coleman, S. W., 1981. Potential of near infrared reflectance spectroscopy for measuring forage quality. *Animal Science, Research Report*, 108, 73-76.
- Barber, G. D., Givens, D. I., Krisdis, M. S., Offer, N. W., Murray, I., 1990. Prediction of the organic matter digestibility of grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 28, 115-128.
- Borba, A., 1992. *Estudo do Valor Nutritivo e da qualidade da Proteína de algumas forragens Açorianas*. Tese de Doutoramento, Universidade dos Açores.
- Bruno-Soares, A. M., Murray, I., Paterson, R. M., Abreu, J. M. F., 1998. Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the prediction of chemical composition and nutritional attributes of green crop cereals. *Animal Feed Science and Technology*, 75, 15-25.
- Burns, G. A., O'Kiely, P., Grogan, D., Gilliland, T. J., 2014. A note on the comparison of three near infrared reflectance spectroscopy calibration strategies for assessing herbage quality of ryegrass. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 53, 199-204.
- Ciuczak, E., 2006. *Near-infrared spectroscopy*. *Modern Instrumental Analysis*, 47, 157-170.

Coleman, S. W., Barton, F. E., Meyer, R. D., 1982. Calibration of near infrared reflectance spectrometer for prediction of forage quality. *Animal Science, Research Report*, 102-111.

Coleman, S. W., Murray, I., 1993. The use of near-infrared reflectance spectroscopy to define nutrient digestion of hay by cattle. *Animal Feed Science Technology*, 44, 237-249.

Conzen, J. P., 2006. *Multivariate calibration*. A Practical Guide for the Method.

Corson, D. C., Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J., Lee, J., 1999. NIRS: Forage analysis and livestock feeding. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 61, 127-132.

Costa, P., Alves, T., Menezes, J., 2001. Monitorização de processos biológicos: monitorização at-line de bioprocessos industriais com FT-NIR. *Boletim de Biotecnologia, Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 69, 11-16.

Cozzolino, D., Fassio, A., Fernández, E., Restaino, E., La Manna, A., 2006. Measurement of chemical composition in wet whole maize silage by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 329-336.

Cozzolino, D., Fassio, A., Gimenez, A., 2000. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 142-146.

Cozzolino, D., Moron, A., 2004. Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 111, 161-173.

Dale, L. M., Thewis, A., Boudry, C., Rotar, I., Pacurar, S. F., Abbas, Q., Dardenne, P., Baeten, V., Pfister, J., 2013. Discrimination of grassland species and their classification in botanical families by laboratory scale NIR hyperspectral imaging: preliminary results. *Talanta*, 116, 149-154.

Dardenne, P., Sinnaeve, G., Baeten, V., 2000. Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: which method? *Journal Near Infrared Spectroscopy*, 8, 229-237.

Deville, E. R., Flinn, P. C., 2000. Near Infrared (NIR) *Spectroscopy: An alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake, forage evaluation in ruminant nutrition*. CABI Publishing, UK, 301-320.

Delwiche, S. R., Graybosch, R. A., 2002. Identification of waxy wheat by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Cereal Science*, 35, 29-38.

Fassio, A., Fernández, E. G., Restaino, E. A., LA Manna, A., Cozzolino, D., 2009. Predicting the nutritive value of high moisture grain corn by near infrared reflectance spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 67, 59-63.

Fontaneli, S. R., Durr, J. W., Scheffer-Basso, S. M., Haubert, F., Bortolini, F., 2002. Validação do método da reflectância no infravermelho proximal para análise de silagem de milho. *Revista Brasileira Zootécnica*, 31, 594-598.

Fumiere, O., Sinnaeve, G., Dardenne, P., 2000. Attempted authentication of cut pieces of chicken meat from certified production using near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 8, 27-34.

García-Ciudad, A., Garcia-Criado, B., Perez-Corona, M. E., Vasquez de Aldana, B. R., Ruano-Ramos, A. M., 1990. Application of near-infrared reflectance spectroscopy to protein analysis of grassland herbage samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 479-484.

Garnsworthy, P. C., Wiseman, J., Fegeros, K., 2000. Prediction of chemical, nutritive, and agronomic characteristics of wheat by near infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural Science*, 135, 409-417.

Geladi, P., 2003. Chemometrics in Spectroscopy. Part1 Classical Chemometrics, *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 767-782.

Givens, D. I., Deville, E. R., 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: A review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 1131-45.

Givens, D. I., De Boever, J. L., Deville, E. R., 1997. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutrition Research Reviews*, 10, 83-114.

Haswell, S. J., Walmsley, A. D., 1999. Chemometrics: the issues of measurement and modeling. *Analytica Chimica Acta*, 499, 399-412.

Hibbert, D. B., Armstrong, N., 2009. An introduction to Bayesian methods for analyzing chemistry data: Part II: A review of applications of Bayesian methods in chemistry. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 97, 211-220.

Hopke, P. H., 2003. The evolution of chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 500, 365-377.

Jamrógiewicz, M., 2012. Application of the near-infrared analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: Blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. *International Journal of Pharmaceutics*, 357, 108-118.

Kung, L., Shaver, R., 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage*, 3, 1-5.

Landau, S., Glasser, T., Dvash, L., 2006. Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: a review. *Small Ruminant Research*, 61, 1-11.

Manne, R., 1987. Analysis of two partial least squares algorithms for multivariate calibration. *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 2, 97-187.

Massart, D., Vandeginst, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P., Smeyers-Verbeke, J., 1997. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*. Elsevier Science.

McIlwee, A. M., Lawler, I. R., Cork, S. J., Foley, W. J., 2001. Coping with chemical complexity in mammal-plant interactions: near-infrared spectroscopy as a predictor of Eucalyptus foliar nutrients and of the feeding rates of folivorous marsupials. *Oecologia*, 128, 539-548.

Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., 2002. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications.

Nicolai, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., Lammertyn, J., 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 99-118.

Norris, K. H., Barnes R. F., Moore, J. E., Shenk, J. S., 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*, 43, 889-97.

Osborne, B. G., Fearn, T., Hindle, P. H., 1993. *Practical Near Infrared Spectroscopy With Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical, UK.

Osborn, B. G., 2000. *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd.

Otto, M., 1999. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. Wiley-VCH.

Park, R. S., Agnew, R. E., Gordon, F. J., Steen, R. W. J., 1997. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on undried samples of grass silage to predict chemical composition and digestibility parameters. *Animal Feed Science Technology*, 72,155-167.

Pasquini, C., 2003. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal Brazilian Chemical Society*, 14, 198-219.

PLSplus IQ User's Guide, Thermo Galactic, Microsoft Corporation.

Purcell, D. E., O'Shea, M. G., Kokot, S., 2007. Role of chemometrics for at-field application of NIR spectroscopy to predict sugarcane clonal performance. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 113-124.

Rajalahti, T., Kvalheim, O. M., 2011. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. *International Journal of Pharmaceutics*, 417, 280-290.

Reeves, J. B., 1988. Near infrared spectroscopic analysis of lignin components in sodium chlorite-treated and untreated forages and forage by-products. *Journal of Dairy Science*, 72, 388-397.

Reeves, J. B., Blosser, T. H., Colenbrander, V. F., 1989. Near infrared reflectance spectroscopy for analyzing undried silage. *Journal Dairy Science*, 88, 72-79.

Reich, G., 2005. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 7, 1109-1143.

Sabin, J. G., Ferrão, M. F., Furtado, J. C., 2004 *Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos, Parte II: análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA*. Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo.

Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., Hoover, M. R., 1979. Analysis of forages by infrared reflectance. *Journal of Dairy Science*, 62, 807-812.

Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., 1991. Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*, 31, 469-474.

Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., 1993. *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. Monograph, Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA, 26, 44-51.

Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., 1995. *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. Monograph, NIRSSystems.

Shenk, J. S., Workman, J. J., Westerhaus, M. O., 2001. *Application of NIR spectroscopy to agricultural products, Handbook of Near-Infrared Analysis*. New York: Taylor & Francis, 419-474.

Siesler, H., Ozaki, W., Kawata, S., Heise, H. M., 2002. *Near-infrared spectroscopy: principles instruments applications*. Wiley-VCH.

Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G., Fantozzi, P., 2013. Evaluation of different validation strategies and long term effects in NIR calibration models. *Food Chemistry*, 141, 2639-2648.

Silva, H., Rodrigues, M., Eusébio, M., 2008. *Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier: fundamento da aplicação e caracterização de materiais de construção*. Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisboa.

Simões, R., 2008. *Potencialidades da Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier na caracterização de aguardentes vnicas*. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro.

- Smith, K. F., Flinn, S. E., 1991. Measurements of the magnesium concentration in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*) using near infrared reflectance spectroscopy. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42, 1399-1404.
- Soldado, A., Fearn, T., Martínez-Fernández, A., De La Roza-Delgado, B., 2013. The Transfer of NIR Calibrations for undried grass silage from the laboratory to on-site instruments: comparison of two approaches. *Talanta*, 105, 8-14.
- Sorensen, L. K., 2004. Prediction of fermentation parameters in grass and corn silage by near infrared spectroscopy. *Journal Dairy Science*, 87, 3826-3835.
- Stuth, J. W., Tolleson, D. R., 2000. Managing the nutritional status of grazing animals using near infrared spectroscopy. *Compendium on continuing education for the Practicing Veterinarians*, 22, 108-115.
- Tilmann, P., Horst, H., Danier, J., Dieterle, P., Philipps, P., 2002. *Analysis of mixed feeds and their components using spectroscopy, proceedings of the 10th international conference on near infrared spectroscopy*. NIR Publications, 291-294.
- Uden, P., 1984. *Laboratoy methods for evaluating the nutritive value of untreated and treated fibrous by-products*. Elsevier Science publishing company Inc., Netherlands.
- Ulyatt, M. J., Waghorn, G. C., 1993. *Proceedings of a workshop on 'improving the quality and intake of pasture-based diets for lactating cows'*. Department of Animal Science, Massey University, 11-32.
- Villamarín, B., Fernández, E., Mendéz J., 2002. Analysis of grass silage from northwestern Spain by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 85, 541-545.
- Walsh, K. B., Guthrie, J. A., Burney, J. W., 2000. Application of commercially available, low-cost, miniaturised NIR spectrometers to the assessment of the sugar content of intact fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 1175-1186.
- Wilkins, R. J., Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M., 2000. Forages and their role in animal systems. *Forage evaluation in ruminant nutrition*, 1-14.

Williams, P. C., Sobering, D. C., 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. *Near infrared spectroscopy: The future waves*, 185-188.

Williams, P. C., 2001. Implementation of near-infrared technology. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*, 2, 145-169.

Wold, S., 1995. Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30, 109-115.

Wold, S., Sjostrom, M., 1998. *Chemometrics, present and future success Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44, 3-14.

Znidarsic, T., Verbic, J., Babnik, D., 2006. Prediction of chemical composition and energy value of grass silage by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal Central European Agriculture*, 7, 127-134.