



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAMILA CANO SERAFIM

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO  
PARA CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE GRAMÍNEAS  
DOS GÊNEROS *Urochloa*, *Cynodon* E *Megathyrsus***

---

Londrina  
2023

CAMILA CANO SERAFIM

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO  
PARA CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE GRAMÍNEAS  
DOS GÊNEROS *Urochloa*, *Cynodon* E *Megathyrsus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Yurika Mizubuti  
Coorientadora: Profa. Dra. Odimari Pricila Prado-  
Calixto

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Serafim, Camila Cano.

Espectroscopia de infravermelho próximo para caracterização nutricional de gramíneas dos gêneros *Urochloa*, *Cynodon* e *Megathyrsus* / Camila Cano Serafim. - Londrina, 2023.  
176 f.

Orientador: Ivone Yurika Mizubuti.

Coorientador: Odimari Pricila Prado-Calixto.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Calibração - Tese. 2. Gramíneas tropicais - Tese. 3. Produção animal de precisão - Tese. 4. Quimiometria - Tese. I. Mizubuti, Ivone Yurika. II. Prado-Calixto, Odimari Pricila. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

CAMILA CANO SERAFIM

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA  
CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE GRAMÍNEAS DOS  
GÊNEROS *Urochloa*, *Cynodon* E *Megathyrus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

Profª. Dra. Ivone Yurika Mizubuti  
(Orientadora)

Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Fabio Luiz Melquiades

Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Pedro Rodolfo Siqueira Vendrame

Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Thierry Becquer

Institut de Recherche pour le Developpment – IRD

---

Dr. Robélio Leandro Marchão

Empresa de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA  
Cerrados

Londrina, 10 de fevereiro de 2023.

Dedico esse trabalho a todos aqueles que não perderam nem perdem a esperança na ciência e na educação. Aos meus pais, Gilberto e Silmara, e a minha irmã, Renata.

## AGRADECIMENTOS

Os finais de ciclo nunca são fáceis. Nesses quase quatro anos do período de doutorado muitas coisas aconteceram para que eu chegasse até aqui, com pandemia de Covid-19 e tudo. E, independente de momentos bons ou ruins, sou extremamente grata pela oportunidade que tive. Agradeço a Deus pelo dom da vida e por tudo aquilo que Ele me proporciona.

A minha família, minha raiz singela, que sem o apoio e confiança eu não estaria aqui. Aos meus pais, Gilberto Antonio Serafim e Silmara Cano Xavier Serafim, agradeço por todo amor do mundo, e que não importa onde eu esteja, sempre honrarei a nossa família, nossa ligação. A minha irmã Renata Cano Serafim, agradeço o amor mais puro que conheço, e é por ela que cada dia quero me tornar uma pessoa melhor. Eu amo vocês. Agradeço meus avós, tios e tias e outros familiares pelo apoio, e em especial, minha madrinha e tia Joice Xavier Cano Souza, que sempre me incentivou no caminho do ensino, da leitura e de boas músicas. Não posso me esquecer de uma parte da família, meus amores de quatro patas, em especial a minha Shak, minha companheira por mais de onze anos, que me ensinou que para sentir amor não são necessárias palavras. Afinal, parte do meu amor por eles me mostrou que deveria ser médica veterinária.

Aos meus amigos, seria injusto não citar alguns, especificamente. À Jussana Franco Delgado, pelo companheirismo, pela amizade que compartilhamos, mesmo que em hiatos de distância ou contato, algumas coisas nunca mudam. À Maria Eduarda Moreira Volpato, obrigada pelo carinho e amizade, que mesmo sem o contato frequente, está sempre ali, presente. Vocês são os presentes que a veterinária me deu. Ao Eduardo Chagas, que tem o título de amigo mais antigo, mais de dez anos, obrigada por me mostrar que não importa a distância, ou o tempo sem se ver, as nossas conversas sempre serão as melhores (por mais difíceis que sejam). Ao meu amado 101: Guillia Zaghis Lecciole, Vitória Zaghis Alonso e a agregada Ana Paula Kuller Zanoni, obrigada pelo apoio, pelas broncas, pelos cuidados. Vocês sempre estarão no meu coração. E claro, à Maria Eduarda Gobbo Andrades, vizinha de quarto, companheira de pandemia, dates na sala, muitas reflexões olhando pela janela, choros, estudos... Obrigada por se fazer tão presente. Ao João Pedro Monteiro do Carmo, meu muito obrigada pela amizade construída e por toda ajuda, acadêmica ou não, por todas as vezes que me ajudou a me enxergar como uma pessoa capaz. Uma grande parte desse trabalho não seria possível sem sua ajuda. Aos meus amigos, muito obrigada por tudo, amo vocês e sempre estarei aqui. E não posso me esquecer daquelas amizades construídas graças a UEL, dentro do

laboratório. Aos companheiros de pós-graduação, Erica Regina Rodrigues Franconere, Elias Rodrigues Cavalheiro Junior e André Martins de Souza, obrigada por todos os momentos compartilhados, sejam eles de desespero, cafés, risadas e de muito aprendizado. Vocês foram muito importantes nessa caminhada e poderão sempre contar comigo. Aos estagiários e labamigos, Tayná, Natália, Kawane, Vitor e todos os outros que de alguma forma tornaram o ambiente de trabalho mais leve, animado.

Ao professor e amigo Dr. Filipe Alexandre Boscaro de Castro por toda ajuda, amizade e ensinamentos de sempre. Obrigada por me mostrar que sou capaz e que estudar nunca é demais.

À profa. Dra. Ivone Yurika Mizubuti pela orientação nesse período, por toda ajuda, conversas, confiança. Foi um prazer trabalhar com a senhora durante esses quatro anos. Obrigada por tudo. À profa. Dra. Odimari Pricila Prado-Calixto pela ajuda quando necessário, pelas conversas e trocas de ideias esclarecedoras. À Angela Rocio Parra Poveda pela parceria, pelas conversas e risadas compartilhadas. A profa. Dra. Sandra Galbeiro pela participação da banca de qualificação e pela ajuda quando foi necessário.

Ao Dr. Pedro Rodolfo Siqueira Vendrame, Dr. Robélio Leandro Marchão e Dr. Thierry Becquer pela participação na banca de defesa do meu trabalho, com disposição para agregar na qualidade do mesmo.

Aos professores do departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Londrina pelo acolhimento, bem como toda ajuda quando necessário, e também aos professores do programa de pós-graduação em Ciência Animal de UEL como um todo, pelas aulas e ensinamentos compartilhados. A UEL me ensinou muito, e tenho muito orgulho de dizer que passei umas das etapas minhas intensas e importantes da minha vida como aluna dessa universidade.

Ao prof. Dr. Fabio Luiz Melquiades do departamento de Física da UEL, que foi muito importante na realização desse trabalho, salvando na parte estatística com suas aulas esclarecedoras e me ajudando em dúvidas, e com nossas conversas sobre análise de dados e possíveis trabalhos, parcerias. Obrigada pela confiança e ajuda, estarei sempre a disposição. Ao Dr. José Francirlei de Oliveira do IDR, por participar da banca de qualificação, e também pelas conversas entusiasmadas quando eu chegava com minhas dúvidas, pelas ideias para discussão. Serei sempre grata pela ajuda desses dois professores que me ajudaram a me enxergar como uma profissional capaz.

E para cada pessoa que passou pela minha vida nesse período, compartilhando caminhos, risos e até mesmo choros, e por circunstâncias da vida não

“Que quer dizer cativar? (...) Significa criar laços.”  
(O Pequeno Príncipe, Antoine de Saint-Exupéry)

SERAFIM, Camila Cano. **Espectroscopia de infravermelho próximo para caracterização nutricional de gramíneas dos gêneros *Urochloa*, *Cynodon* e *Megathyrus***. 2023. 176 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## RESUMO

A pecuária brasileira é representada em grande parte pela criação de bovinos a pasto de gramíneas tropicais. Para monitorar o valor nutritivo dessas forrageiras são realizadas análises químicas por métodos convencionais. Como alternativa a esses métodos, tem-se utilizado a Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) de forma mais rápida, ecologicamente correta por não utilizar reagentes químicos e por determinar diversos parâmetros simultaneamente. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de modelos preditivos para caracterizar os atributos nutricionais de gramíneas tropicais do gênero *Cynodon*, *Megathyrus* e *Urochloa* pela NIRS, e avaliar o efeito de validações espécie-específicas em modelos multi-espécies. O banco amostral total foi constituído de 1120 amostras, sendo 712 amostras de *Urochloa brizantha* cultivares Marandu e Piatã, compostas de lâmina foliar e colmo+bainha, coletadas de propriedades com sistema de pastejo com lotação contínua; 345 amostras de *Megathyrus maximus* cultivar Tanzânia compostas de lâmina foliar, colmo+bainha e planta inteira, de uma propriedade com sistema de pastejo com lotação contínua; e 63 amostras de *Cynodon* spp. cultivar Tifton 85 compostas de lâmina foliar, colmo+bainha e planta inteira, de uma propriedade com área para fenação. Com as amostras secas e moídas determinaram-se os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e cinzas (esse último apenas para *M. maximus*), além de se determinar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), pelas metodologias bromatológicas de referência. Posteriormente, as amostras foram escaneadas em espectrômetro Vis-NIR para obtenção dos espectros na faixa de comprimento de onda de 1100 a 2500 nanômetros. A análise de componentes principais (PCA) foi empregada para análise exploratória, seja com os resultados dos métodos convencionais, seja com os espectros NIRS coletados em valores de absorvância. A calibração dos modelos preditivos foi realizada a partir do emprego da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Com o banco amostral de *M. maximus* foram desenvolvidos e validados modelos espécie-específicos para cada atributo nutricional

estudado, enquanto para o estudo dos modelos com amostras de *U. brizantha*, *Cynodon* spp. e *M. maximus*, esses foram calibrados e validados de forma conjunta, originando modelos multi-espécies, e em seguida as validações foram fragmentadas em espécie-específicas para teste desses mesmos modelos. Os modelos desenvolvidos demonstraram excelente capacidade preditiva para os teores de cinzas, PB, DIVMS, FDN e FDA de *M. maximus* cv. Tanzânia. Foram obtidos resultados de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior que 0,90; taxa de desvio preditivo (RPD) acima de 3; taxa de desvio da performance (RER) maior que 12 para todos os parâmetros estudados, com uso de sete a oito variáveis latentes (VL). Dessa forma, pode-se considerar a metodologia NIRS como uma ferramenta alternativa para a avaliação nutricional do capim Tanzânia nas condições apresentadas. Os modelos preditivos multi-espécies de *U. brizantha*, *M. maximus* e *Cynodon* spp., apresentaram boa capacidade de predição da composição nutricional dessas espécies forrageiras, com resultados para PB, DIVMS, FDN e FDA de  $R^2$  na faixa de 0,84 a 0,89; RPD de 2,5 a 3,0; RER > 11 e *Bias* próximos de 0. Na validação de forma espécie-específica dos modelos multi-espécies, sua precisão diminuiu para alguns atributos, classificados com baixa ou nenhuma qualidade de uso. Para os parâmetros DIVMS ( $R^2$  0,38; RPD 1,3; RER 4,4) e FDN ( $R^2$  não significativo; RPD 0,9; RER 3,7) de *Cynodon* spp, e para DIVMS ( $R^2$  0,54; RPD 1,5; RER 6,6) e FDA ( $R^2$  0,51; RPD 1,4; RER 5,2) de *M. maximus* não foi possível considerar os modelos NIRS como alternativa às técnicas convencionais da análise dessas gramíneas. Conclui-se que modelos multi-espécies devem possuir um número amostral suficiente para representar cada espécie analisada, bem como ser avaliados minuciosamente para evitar possíveis predições errôneas e indesejadas. Em geral, os resultados encontrados demonstram que a espectroscopia de infravermelho próximo apresenta potencial como alternativa para a análise de atributos nutricionais de gramíneas tropicais. Entretanto, o estudo de todo o processo de modelagem apresenta importância e é preciso observar fatores de variabilidade extrema que possam afetar negativamente a precisão dos modelos e formas de amenizá-los, principalmente em relação a constituição do banco de dados.

**Palavras-chave:** Análise quantitativa, gramíneas tropicais, modelos de predição, quimiometria, valor nutritivo.

SERAFIM, Camila Cano. **Near infrared spectroscopy for nutritional characterization of grasses of the genus *Urochloa*, *Cynodon* e *Megathyrsus***. 2023. 176 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

### ABSTRACT

Brazilian livestock farming is largely represented by raising cattle grazing tropical grasses. To monitor the nutritional value of these forages, chemical analyzes are carried out using conventional methods. As an alternative to these methods, Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has been used in a faster, more environmentally friendly way as it does not use chemical reagents and determines several parameters simultaneously. The objective of this study was to develop predictive models to characterize the nutritional attributes of tropical grasses of the genus *Cynodon*, *Megathyrsus* and *Urochloa* by NIRS, and to evaluate the effect of species-specific validations in multi-species models. The total sample dataset consisted of 1120 samples, 712 samples of *Urochloa brizantha* cultivars Marandu and Piatã, composed of leaf blade and stem+sheath, collected from properties with a continuous stocking grazing system; 345 samples of *Megathyrsus maximus* cultivar Tanzania composed of leaf blade, stem+sheath and whole plant, from a property with a continuous stocking grazing system; and 63 samples of *Cynodon* spp. cultivar Tifton 85 composed of leaf blade, stem+sheath and whole plant, from a property with an area for haymaking. With the dried and ground samples, the contents of dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and ash (the latter only for *M. maximus*) were determined, in addition to determining the *in vitro* digestibility of dry matter (IVDMD), using reference bromatological methodologies. Subsequently, the samples were scanned in a Vis-NIR spectrometer to obtain spectra in the wavelength range of 1100 to 2500 nanometers. Principal component analysis (PCA) was used for exploratory analysis, either with the results of conventional methods or with NIRS spectra collected at absorbance values. The calibration of the predictive models was carried out using partial least squares (PLS) regression. With the *M. maximus* dataset, species-specific models were developed and validated for each nutritional attribute studied, while for the study of models with samples of *U. brizantha*, *Cynodon* spp. and *M. maximus*, these were calibrated and validated together, originating multi-species models, and then the validations were fragmented into specific species to test these same models. The models developed demonstrated excellent predictive capacity for ash, CP, IVDMD, NDF and ADF contents of *M. maximus* cv. Tanzania. Results were obtained with a coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.90; residual prediction deviation (RPD) above 3; range error

ratio (RER) greater than 12 for all parameters studied, using seven to eight latent variables (VL). Therefore, the NIRS methodology can be considered as an alternative tool for the nutritional assessment of Tanzania grass under the conditions presented. The multi-species predictive models of *U. brizantha*, *M. maximus* and *Cynodon* spp., showed good capacity to predict the nutritional composition of these forage species, with results for CP, IVDMD, NDF and ADF of  $R^2$  in the range of 0.84 to 0.89; RPD from 2.5 to 3.0; RER > 11 and Bias close to 0. In the species-specific validation of multi-species models, their accuracy decreased for some attributes, classified as having low or no quality of use. For the parameters IVDMD ( $R^2$  0.38; RPD 1.3; RER 4.4) and NDF ( $R^2$  not significant; RPD 0.9; RER 3.7) of *Cynodon* spp, and for IVDMD ( $R^2$  0.54; RPD 1.5; RER 6.6) and ADF ( $R^2$  0.51; RPD 1.4; RER 5.2) of *M. maximus*, it was not possible to consider NIRS models as an alternative to conventional techniques for analyzing these grasses. It is concluded that multi-species models must have a sufficient sample number to represent each species analyzed, as well as be thoroughly evaluated to avoid possible erroneous and unwanted predictions. In general, the results found demonstrate that near-infrared spectroscopy has potential as an alternative for the analysis of nutritional attributes of tropical grasses. However, the study of the entire modeling process is important, and it is necessary to observe factors of extreme variability that may negatively affect the accuracy of the models and ways to mitigate them, especially in relation to the constitution of the database.

**Keywords:** Chemometrics, predictive models, nutritional value, quantitative analysis, tropical grass.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ilustração sistemática da obtenção de espectro.....29
- Figura 2** – Modos vibracionais moleculares após interação com a radiação eletromagnética.....31
- Figura 3** – Diagrama em bloco com os passos básicos para desenvolvimento de uma calibração NIR.....37
- Figura 4** – Dinâmica da variância e tendência de modelos PLS, em geral – linhas tracejadas. A linha contínua representa o erro na previsão.....40

### ARTIGO A

- Figura 1** – **A)** Representação espacial dos resultados bromatológicos (*Scores*) de capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia a partir da análise de componentes principais (PCA). **B)** *Loadings* dos atributos nutricionais e digestibilidade *in vitro* da matéria seca.....88
- Figura 2** – Representação gráfica dos espectros médios brutos do conjunto amostral analisado de capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.....89
- Figura 3** – **A)** Representação gráfica e espacial das amostras espectrais (*Scores*) de capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia a partir da análise de componentes principais (PCA). **B)** *Loadings* de componentes principais 1 e 2 do conjunto de dados estudado.....90
- Figura 4** – Representação gráfica da etapa de validação dos modelos desenvolvidos para a caracterização química do capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.....98

### ARTIGO B

- Figura 1** – **A)** Representação gráfica dos resultados das análises químicas de referência do banco amostral multi-espécies (*Scores*), a partir da análise de componentes principais. **B)** *Loadings* das características nutricionais de *Urochloa brizantha*,

	<i>Cynodon</i>	spp.	e	<i>Megathyrus</i>	
	<i>maximus</i>	.....			124
<b>Figura 2</b>	– Gráfico de espectros médios brutos do conjunto amostral multi-espécies.....				126
<b>Figura 3</b>	– A) Representação gráfica dos dados espectrais ( <i>Scores</i> ) do banco amostral multi-espécies, a partir da análise de componentes principais. B) <i>Loadings</i> dos componentes principais 1, 2 e 3 do banco amostral estudado.....				128
<b>Figura 4</b>	– Gráficos de dispersão da etapa de validação externa multi-espécies para proteína bruta (A), digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C), fibra em detergente ácido (D).....				133
<b>Figura 5</b>	– Representação gráfica da etapa de validação externa espécie-específica de <i>Urochloa brizantha</i> para proteína bruta (A), digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C) fibra em detergente ácido (D).....				137
<b>Figura 6</b>	– Representação gráfica da etapa de validação externa espécie-específica de <i>Cynodon</i> spp. para proteína bruta (A), digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C) fibra em detergente ácido (D).....				139
<b>Figura 7</b>	– Representação gráfica da etapa de validação externa espécie-específica de <i>Megathyrus maximus</i> para proteína bruta (A), digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C) fibra em detergente ácido (D).....				141

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Compilado das principais regiões do espectro no infravermelho próximo com relação as moléculas de proteína, fibra e gordura.....49

### ARTIGO A

**Tabela 1** – Parâmetros descritivos dos atributos químicos e digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados por metodologia de referência (em porcentagem da matéria seca) do capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.....86

**Tabela 2** – Resultados da estatística multivariada para desenvolvimento de modelos de calibração e validação externa da caracterização química do capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.....91

**Tabela 3** – Intervalos de comprimentos de onda de importância para o desenvolvimento de cada modelo de calibração da caracterização química do capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia, pelo gráfico de *Weighted regression coefficients*.....94

### ARTIGO B

**Tabela 1** – Banco amostral utilizado para o desenvolvimento de modelos de predição da qualidade de *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*.....115

**Tabela 2** – Análise descritiva dos capins *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus* e seus atributos químicos e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados pelos métodos de referência (em porcentagem da matéria seca).....122

**Tabela 3** – Resultados da calibração, validação cruzada e validação externa de modelos multi-espécies desenvolvidos para proteína bruta, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de amostras de *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*.....129

**Tabela 4** – Estatística multivariada para as validações espécie-específicas do modelo multi-espécies desenvolvido para predição de proteína bruta, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*.....136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
DIVMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
EMBRAP	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
A	
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
ha	Hectare
$h_1$	<i>Leverage</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KS	Kennard-Stone
Log 1/R	Inverso da reflectância
MC	<i>Mean centering</i>
MS	Matéria seca
MSC	<i>Multiplicative scatter correction</i>
NIRS	<i>Near infrared reflectance spectroscopy</i>
PB	Proteína bruta
PC	<i>Principal component</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PLS	<i>Partial least squares</i>
$R^2$	<i>Coefficient of determination</i>
RER	<i>Range error ratio</i>
RMSE	<i>Root mean square of error</i>
RMSEC	<i>Root mean square error of calibration</i>
RMSECV	<i>Root mean square error of cross-validation</i>
RMSEP	<i>Root mean square error of prediction</i>
RPD	<i>Residual prediction deviation</i>
SECV	<i>Standard error of cross-validation</i>
SEC	<i>Standard error of calibration</i>
SEP	<i>Standard error of prediction</i>
SG	Savitzky-Golay

SNV	<i>Standard normal variate</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VL	Variável latente
VN	Valor nutritivo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>22</b>
2.1	GÊNERO <i>UROCHLOA</i>	22
2.2	GÊNERO <i>CYNODON</i>	23
2.3	GÊNERO <i>MEGATHYRSUS</i>	24
2.4	VALOR NUTRITIVO DAS PLANTAS FORRAGEIRAS	25
2.5	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)	28
2.5.1	Histórico e equipamento	29
2.5.2	Técnica analítica	30
2.5.3	Utilização da Quimiometria	33
2.5.4	Métodos de pré-processamento de dados espectrais	33
2.5.5	Análise de componentes principais	36
2.5.6	Calibração multivariada	37
2.5.7	Validação dos modelos preditivos	42
2.5.8	Figuras de mérito utilizadas para avaliação dos modelos	43
2.6	USO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO NA AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE PLANTAS FORRAGEIRAS	47
2.7	DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE PREDIÇÃO MULTI-ESPÉCIES PARA A AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE PLANTAS FORRAGEIRAS	51
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>73</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	73
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
<b>5</b>	<b>ARTIGO A – ESPECTROSCOPIA NIR: DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE PREDIÇÃO DE ATRIBUTOS QUÍMICOS E DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATÉRIA SECA DE <i>Megathyrsus maximus</i> CV. TANZÂNIA</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO B – DESENVOLVIMENTO DE MODELOS PREDITIVOS MULTI-ESPÉCIES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE GRAMÍNEAS TROPICAIS PELA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO:</b>	

	<b>VALIDAÇÕES GERAIS <i>VERSUS</i> VALIDAÇÕES ESPÉCIE-ESPECÍFICAS.....</b>	110
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	152
	<b>ANEXOS.....</b>	154
	ANEXO A – Normas para preparação do artigo científico para submissão a publicação na Revista <i>Grassland Science</i> .....	155
	ANEXO B – Normas para preparação do artigo científico para submissão a publicação na Revista <i>Journal of Animal Science</i> .....	165

## 1 INTRODUÇÃO

No cenário atual da pecuária brasileira a produção animal a pasto é uma alternativa mais barata do que a produção de bovinos em confinamento, uma vez que existe o menor custo por quilo de matéria seca de forragem produzida (BARROS et al., 2019). Com a existência de diversos gêneros forrageiros, a bovinocultura de corte brasileira, na maioria das vezes, é mantida em pastagens tropicais cultivadas de *Urochloa*, *Cynodon* e *Megathyrsus*. A partir do uso das plantas forrageiras para a alimentação dos animais é necessário que elas sejam manejadas de forma correta, com acompanhamento do seu valor nutritivo e condições que podem afetá-lo, com o objetivo de manter sua qualidade.

A qualidade nutricional de plantas forrageiras está relacionada com fatores intrínsecos como espécie e morfologia, e fatores externos como manejo, condições do solo em que é cultivada e clima. Sabe-se que nos trópicos, o fator de extrema influência na produção de forragens, é o clima que determina a sazonalidade produtiva. Essa condição é caracterizada por alta disponibilidade forrageira e de água no solo, durante o período chuvoso do ano, ocorrendo então a situação inversa na época de escassez de chuvas. Em consequência, no período de menor oferta de alimento e quando a planta apresenta baixo valor nutritivo, os animais diminuem o consumo de massa verde e dessa forma, têm seu desempenho produtivo afetado.

Para contornar essa perda de desempenho podem ser necessárias estratégias de suplementação alimentares, como por exemplo a suplementação proteica. Para se ter conhecimento do que é necessário complementar na dieta dos animais, é importante a análise química e nutricional das plantas forrageiras para o monitoramento de sua qualidade.

As análises químicas laboratoriais são amplamente utilizadas para a determinação dos principais nutrientes das plantas forrageiras como os teores de proteína bruta, de fibra e de características como a digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Os métodos empregados na análise bromatológica de referência fazem uso de reagentes químicos que geram impacto ambiental negativo devido ao seu descarte. Em geral são de alto custo e demorados, causando atraso na tomada de decisão do produtor ou técnico em relação ao uso de suplementação. Nesse caso, a demora dos resultados pode refletir uma condição diferente daquela encontrada nas pastagens, devido a diferença e intervalo de tempo entre coleta de amostras no campo, análise propriamente dita e a disponibilidade do resultado. O período entre o recebimento de uma amostra e a obtenção dos resultados referentes ao seu conteúdo de fibra e proteína (pelos métodos convencionais), por exemplo, pode chegar até 15 dias úteis.

Diante desse cenário, há a necessidade do emprego de alternativas rápidas e seguras para a análise bromatológica da forragem destinada a alimentação animal. A Espectroscopia de infravermelho próximo (do inglês, *Near Infrared Reflectance Spectroscopy* – NIRS) tem sido utilizada como uma alternativa complementar às metodologias convencionais, que pode fornecer resultados sobre a constituição química de uma planta forrageira em até três dias úteis.

Para tanto há necessidade de um banco de dados robusto, que represente várias condições de cultivo das plantas analisadas. O potencial de uso NIRS tem sido citado na análise bromatológica de dieta total, gramíneas e leguminosas temperadas e tropicais, e de fezes para predição da digestibilidade do alimento fornecido (BAATH et al. 2020, DECRUYENAERE et al, 2009; FONTANELLI et al., 2004; PARRINI et al., 2022; SERAFIM et al., 2021). A metodologia NIRS é baseada na interação da radiação infravermelha do espectro eletromagnético com a composição molecular da amostra em questão, e dessa forma, é possível correlacionar a informação contida no espectro às características das amostras, a partir do uso da quimiometria (LANDAU; GLASSER; DVASH, 2006; MUÑIZ et al., 2012). A absorção ou reflexão da luz em relação a amostra acarreta uma vibração que caracteriza os compostos presentes, indicando comprimentos de onda e bandas de absorbância específicos de grupos com moléculas de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio (GILLON; HOUSSARD; JOFFRE, 1999).

O emprego da tecnologia NIRS de forma acurada e confiável para a análise nutricional de plantas forrageiras depende da elaboração e atualização de bancos amostrais com variabilidade significativa de diversas condições de cultivo e espécies, e que sejam representativos de amostras futuras a serem analisadas. Dessa forma, são desenvolvidos os modelos de calibração, naqueles em que se relacionam os resultados das análises de referência com a assinatura espectral de cada amostra (AGELET & HURBURGH, 2010); e posteriormente, esses devem ser testados mediante sua validação. A validação dos modelos com amostras externas ao conjunto de calibração é um passo extremamente importante para legitimar o uso da metodologia NIRS no âmbito da nutrição animal.

De maneira geral são desenvolvidos modelos espécie-específicos para cada forrageira ou multi-espécies, para um grupo delas. Ambos os tipos de modelos apresentam boa capacidade preditiva, porém é passível de questionamento em qual forma há uma melhor representatividade das condições reais de cultivo e de qualidade das plantas. Esse questionamento pode ser realizado em relação ao número de amostras existentes nos modelos, a forma com que os modelos preditivos são desenvolvidos e testados, a representatividade de

cada grupo amostral no contexto dos modelos, entre outros.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *UROCHLOA*

A criação de bovinos no Brasil é baseada na exploração das pastagens tropicais devido ao menor custo por quilo de matéria seca de forragem produzida, à disponibilidade de área para produção, à diversidade de espécies forrageiras disponíveis e capacidade produtiva (BARROS et al., 2019). O Brasil é reconhecido como maior produtor mundial de carne bovina, com rebanho de 218.150.298 de cabeças (IBGE, 2020), sendo a maior parte (cerca de 90%) desses animais criados em pastagens de capim *Urochloa*.

As espécies do gênero *Urochloa* (*Brachiaria*) representam cerca de 90% das pastagens cultivadas no Brasil, juntamente com o gênero *Megathyrsus* (DA SILVA; SBRISSIA; PEREIRA, 2015). O amplo uso pode ser atribuído à sua adaptabilidade e produtividade em condições adversas, como solos ácidos, pobres em nutrientes e longos períodos de estiagem (ARAÚJO et al., 2017; FLORINDO et al., 2014; LOPES et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014). Com alto potencial de produção, fácil adaptação às condições de clima tropical e baixo custo, algumas espécies podem chegar à produção de 18 toneladas/ha de matéria seca (SÁ et al., 2010). Além disso, a produção e comercialização de sementes dessa gramínea é economicamente importante, representando cerca de 35% de contribuição no mercado brasileiro de sementes de forrageiras (JANK; VALLE; RESENDE, 2011).

O gênero *Urochloa* é originário da África (FLORINDO et al., 2014), e possui cerca de 100 espécies, e entre as mais difundidas está a *Urochloa brizantha*, que se destaca pelas cultivares Piatã e Marandu. Mesmo com sua boa adaptabilidade às condições adversas, a qualidade da gramínea depende das condições ambientais como clima e fertilidade de solo, portanto, é importante que seja realizada a avaliação nutricional frequente (MONRROY et al., 2017).

A espécie foi introduzida no Brasil em meados de 1970, porém apenas dez anos mais tarde é que houve o lançamento da cultivar Marandu pela EMBRAPA e os produtores passaram a utilizá-la na formação de pastagens (NUNES et al., 1984; PIRES, 2006; RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). Essa espécie tem desenvolvimento cespitoso podendo chegar a aproximadamente 1,5m de altura, com folhas longas e largas, colmos eretos e inflorescência tipo racemo, com importante resistência a cigarrinha e significativa produção de sementes (JANK; VALLE; RESENDE, 2011; NUNES et al., 1984).

A boa produtividade do capim Marandu é um atrativo para sua utilização e essa condição pode ser intensificada com diferentes manejos. Ruggieri et al. (2020) trabalharam em uma mesma área com pastagem de Marandu adubada durante sete anos e com 25 cm de altura residual e em sistema de pastejo com lotação contínua. Relataram que a produção de massa de forragem oscilou entre 5 e 10 toneladas de matéria seca (MS)/ha, com teores de 11-16% e 54-80% de proteína bruta e digestibilidade da MS, respectivamente. O crescimento cespitoso dessa cultivar contribui para melhor constituição químico-nutricional, uma vez que possui maior proporção não fibrosa em relação ao tecido de sustentação. Esse fato se associa com a provável eliminação dos meristemas apicais, o que estimula o aparecimento de tecidos mais novos e consequentemente, melhor composição química (VELÁSQUEZ et al., 2010).

A cultivar Piatã foi lançada em 2007 a partir de estudos de seleção entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Associação de Fomento à Pesquisa de Melhoramento Genético de Forrageiras Tropicais (Unipasto). O nome Piatã significa “fortaleza” e tem sua origem no tupi-guarani, representando suas características de produção e robustez (ALMEIDA. R. G. et al., 2009; VALLE et al., 2007). Essa cultivar pode ser utilizada como alternativa de diversificação de forragens (EUCLIDES et al., 2008), tendo como características o crescimento ereto que contribui para a formação de touceiras de até 1,10 m de altura, folhas com bordas serrilhadas e cortantes, com colmos finos e inflorescências tipo racemo. Possui perfilhamento aéreo e alta capacidade de rebrota com boa disponibilidade de massa foliar (VALLE et al., 2007). A resistência a cigarrinhas das pastagens também é um ponto de interesse de cultivo do capim Piatã (ANDRADE; ASSIS, 2010).

## 2.2 GÊNERO *CYNODON*

As gramíneas do gênero *Cynodon* estão entre as mais utilizadas no país, devido a sua qualidade nutricional, facilidade de rebrota e baixo índice de perda de folhas, com boa resposta à adubação nitrogenada (BRIGHENTI; SOUZA SOBRINHO; BENITES, 2020; BURTON; GATES; HILL, 1993; PEDREIRA, 2010).

O capim *Cynodon* spp. cv. Tifton 85 é um dos representantes desse gênero, híbrido F<sub>1</sub> resultante do cruzamento entre PI290884 sul-africano e o capim Tifton 68 (*Cynodon nlemfuensis*), e seu lançamento aconteceu em outubro de 1992 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos juntamente com a Universidade da Georgia (BURTON; GATES; HILL, 1993).

A cultivar Tifton 85 é uma planta perene que demonstra boa adaptação ao clima tropical e subtropical como do Brasil, o que permite seu cultivo com boa produtividade e valor nutritivo. Possui folhas largas com colmos longos, rizomas grandes e estolões de rápida expansão, que ajudam na propagação por mudas (BENITES; SOBRINHO; VILELA, 2016; CASTRO et al., 2010; PEDREIRA, 2010; TIECHER et al., 2016). Essa cultivar apresenta exigência em relação a fertilidade do solo, e uma boa resposta a adubação nitrogenada (PEDREIRA, 2010). Sua alta relação folha/colmo e boa produção de MS contribuem para a indicação dessa gramínea para produção de feno e pastejo, com grande aceitabilidade pelos bovinos, equinos, ovinos e caprinos (AVILA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2008).

Os potenciais zootécnicos aliado ao econômico em relação a produção de Tifton 85 estão ligados ao fato de que essa cultivar possui boa palatabilidade e digestibilidade, apresentando significativos teores de proteína bruta e concomitantemente, tem seu valor agregado maior com a fenação, sendo uma estratégia em regiões de pouca disponibilidade de alimento aos animais em épocas de escassez (ARAÚJO et al., 2018).

### 2.3 GÊNERO *MEGATHYRSUS*

O gênero forrageiro *Megathyrsus (Panicum)*, juntamente com *Urochloa*, representam cerca de 90% das pastagens cultivadas no Brasil, e são de boa adaptabilidade, produtividade e resistência (DA SILVA; SBRISSIA; PEREIRA, 2015; IWAMOTO et al., 2015). A utilização de cultivares de *Megathyrsus* proporcionou uma intensificação na forragicultura brasileira em virtude da qualidade bromatológica dessas plantas e sua alta produção (JANK et al., 2014; PACIULLO et al., 2016).

Quando manejadas de forma apropriada, as espécies demonstram uma resposta satisfatória à irrigação e adubação, bem como tolerância ao pisoteio, e sua alta produtividade é resultado da capacidade fotossintética e adaptação ao clima tropical (CUTRIM JUNIOR et al., 2011; GOMES et al., 2011; LOPES et al., 2013).

A cultivar Tanzânia foi desenvolvida pela EMBRAPA em 1990 e possui porte alto, boa resposta a adubação nitrogenada e alta produção de MS (JANK et al., 2014; VIANA et al., 2014). Essa cultivar apresenta crescimento cespitoso podendo atingir até 1,3 metros, desenvolvimento em touceiras com folhas decumbentes e inflorescências tipo panícula (EMBRAPA, 1990). O capim Tanzânia é exigente em fertilidade do solo principalmente em relação a teores de nitrogênio (PACIULLO et al., 2016).

#### 2.4 VALOR NUTRITIVO DAS PLANTAS FORRAGEIRAS

A dieta de ruminantes é constituída principalmente de plantas forrageiras, sendo importantes na manutenção da saúde ruminal e no consumo de matéria seca pelos animais (RAFFRENATO et al., 2017). Ao se estudar a qualidade da planta usada na alimentação animal, é possível obter informações e definir a implementação ou não de suplementação de dieta, principalmente em relação aos teores de proteína e fibra.

As gramíneas tropicais são consideradas como alimentos de baixo valor nutritivo, devido principalmente às condições de subfertilidade natural dos solos em que são cultivadas. Em geral, as forrageiras apresentam baixo conteúdo de nutrientes digestíveis totais, ou seja, baixo teor de proteína, de minerais e alto conteúdo fibroso digestível, resultando em baixa digestibilidade e limitação de consumo (BARBOSA et al., 2014).

O valor nutritivo (VN) de uma planta forrageira pode ser medido pela sua composição química, digestibilidade e consumo pelo animal (VAN SOEST, 1994a). Conhecendo a composição química da forrageira é possível estimar e analisar o potencial de produção animal, e determinar uma possível orientação para suplementação da dieta. Os níveis de consumo de nutrientes digestíveis pelos animais são influenciados pelo VN da planta, e isso impacta diretamente no desempenho e produção animal (REIS; PAVEZZI BARBERO; HOFFMANN, 2016; TSUZUKIBASHI et al., 2016).

Os componentes químicos, e conseqüentemente o VN, da planta forrageira são variáveis e a sua qualidade depende de fatores como estágio de desenvolvimento e estrutura morfológica, condições edafoclimáticas, fertilidade, manejo, entre outros, sendo que esses influenciam diretamente o consumo pelo animal (LOPES et al., 2017; MERTENS, 2002; VAN SOEST, 1994a).

A estrutura do pasto, principalmente em relação às gramíneas tropicais afeta o processo ingestivo de forragem e o potencial de consumo pelo animal devido à dificuldade de apreensão da forragem. Características como altura de pasto, densidade de folhas e seu comprimento final, densidade de perfilho, relação folha/colmo e proporção de material senescente influenciam no consumo por modificar o tamanho e a taxa de bocado, bem como o tempo de pastejo (BARBOSA et al., 2014).

Com o decorrer da maturidade da planta, o processo de lignificação é intensificado ocorrendo o aumento da espessura de parede celular (com conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina e outros). Portanto, há redução da digestibilidade do alimento pela diminuição de nutrientes digestíveis como carboidratos solúveis, proteínas e outros

(MAGALHÃES et al., 2015; MINSON, 1990; REIS et al., 2005). A maturidade da planta também altera a relação folha/colmo, e com sua diminuição há maior deposição fibrosa na forragem total, tanto no colmo como nas folhas (BUXTON; REDFEARN, 1996).

Em relação as condições edafoclimáticas, Van Soest (1994a) salientou que a ocorrência de altas temperaturas proporcionam rápida lignificação da parede celular da planta, com diminuição do *pool* de metabólitos de conteúdo celular. A temperatura ótima de gramíneas de clima subtropical é de 30-35 °C o que indica um dos motivos de possuírem maior conteúdo fibroso. Em temperaturas de 10-15 °C seu crescimento é afetado (PEREIRA et al., 2011). A umidade acarreta efeitos variáveis nas plantas, sendo que a restrição hídrica acentuada promove paralisação no crescimento e consequente senescência da porção aérea resultando em baixa qualidade e disponibilidade de forragem (VAN SOEST, 1994a).

A fibra é utilizada como critério básico para o fracionamento de alimentos utilizados na nutrição de ruminantes, pois contém a porção orgânica mais robusta e resistente à atuação dos microrganismos no sistema gastrointestinal. Em contrapartida, as porções não fibrosas são digeridas com facilidade e quase totalmente pela maioria dos animais (HALL, 2003; MERTENS, 2002; VAN SOEST, 1993, 1994b).

Para determinar a composição química da planta forrageira faz-se a partição das frações fibrosas. A fragmentação entre conteúdo e parede celular é realizada na análise química com a utilização de um detergente neutro. A fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) é a porção constituída por celulose, hemicelulose, proteína ligada a parede celular, sais e demais componentes da parede celular. Depois de realizada a digestão com o detergente neutro, procede-se a dissolução em detergente ácido, do conteúdo celular, da hemicelulose e dos sais ali presentes. Esse resíduo é chamado de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), constituído de celulose, lignina, algum resíduo de proteína e sais insolúveis. Logo, o conteúdo celular é formado por ácidos orgânicos, açúcares, amido, pectina e proteínas (VAN SOEST, 1967).

A fração fibrosa da gramínea está intimamente relacionada com o funcionamento e a saúde ruminal dos animais, pela manutenção de pH evitando problemas como acidose, bem como, manutenção da fermentação, produção de saliva e ruminação (GOULART et al., 2020; VAN SOEST, 1994b; WEISS et al., 2017). Valores de FDN superiores a 60% podem acarretar diminuição do consumo voluntário pelos animais, sendo um importante indicador de qualidade da forragem. Porém em plantas forrageiras de origem tropical dificilmente há teores menores que esses valores (PEREIRA et al., 2011; VAN SOEST, 1994b). É importante salientar que quando o consumo de FDN na dieta excede a

1,2% do peso vivo do animal, a capacidade de ingestão é limitada fisicamente (MERTENS, 1994). O conteúdo de FDA pode ser um indicador de digestibilidade de gramíneas. Em geral, plantas forrageiras com mais de 40% de FDA, e conseqüentemente, maiores teores de lignina, possuem baixa digestibilidade (NUSSIO; MANZANO; PEDREIRA, 1998; OLIVEIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011). O teor de FDA de uma planta forrageira pode ser um indicador do seu valor energético, sendo que uma menor quantidade acarreta um maior valor energético da planta (MAGALHÃES et al., 2015).

O teor de FDN de gramíneas geralmente é maior em comparação às leguminosas, sendo que essas pertencem ao grupo de plantas caracterizadas pelo ciclo fotossintético  $C_3$  com menor taxa de crescimento e de deposição de carboidratos estruturais na parede celular. Em contrapartida, as gramíneas tropicais por integrarem o grupo de plantas de ciclo  $C_4$ , possuem grande capacidade produtiva no acúmulo de matéria seca, e desse conteúdo, uma parte considerável é de carboidratos estruturais (TAIZ et al., 2017).

Além da avaliação e conhecimento da fibra das plantas forrageiras, deve-se atentar ao teor proteico dessas. A proteína é importante para a atividade microbiana do rúmen e metabolismo ruminal, sendo que a exigência mínima é de 7% na MS. Baixos níveis de proteína causam declínio na taxa de fermentação ruminal e deficiência no metabolismo animal (CANESIN et al., 2007; MINSON, 1982; PINHEIRO et al., 2014).

O baixo teor de proteína da planta forrageira, além dos carboidratos não estruturais, também pode ocorrer em decorrência do estágio de floração, quando há menor relação folha/colmo na composição de biomassa geral (SIMIONI et al., 2014).

A digestibilidade da gramínea está intimamente ligada à sua fase de crescimento, como citado anteriormente, por influência de aspectos químicos e físicos. A lignificação da parede celular reduz drasticamente a digestibilidade de plantas forrageiras (MINSON, 1990). Forragens de alta digestibilidade são correlacionadas com tecidos de maior concentração de compostos solúveis (açúcares, amido) e parece celular delgada ((WILSON, 2015).

O valor nutritivo da forragem é um dos mais importantes aspectos a se considerar na nutrição de ruminantes e na avaliação de pastagens. É importante se monitorar as alterações de qualidade da forragem em animais criados a pasto pois os nutrientes devem suprir as exigências de manutenção dos animais. Além disso, a qualidade da forragem influencia o consumo, a digestibilidade e o metabolismo dos nutrientes (CHAMBELA NETO et al., 2018). Portanto, com as constantes mudanças no ciclo de vida da forrageira, faz-se necessário o entendimento desses processos e a quantificação de indicadores de qualidade, o que se torna

determinante para uma produção pecuária sustentável (MAZABEL et al., 2020).

## 2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)

A espectroscopia de infravermelho próximo baseia-se na absorção diferenciada de luz de determinados segmentos no intervalo de 1100 a 2500 nm do espectro eletromagnético, marcados por várias ligações químicas (LANDAU; GLASSER; DVASH, 2006). As ligações covalentes existentes na matéria orgânica absorvem a energia da radiação do infravermelho conforme os constituintes químicos existentes. Dessa forma, acarreta alterações vibracionais e rotacionais das moléculas, o que torna possível a estimativa do tipo e número de ligações existentes entre as moléculas (AGELET; HURBURGH, 2010; FERNANDES, 2015; OLIVEIRA, 2017). O espectro obtido pela radiação infravermelha pode ser dividido em distante (FIR: 5000-100000 nm), médio (MIR: 2500-5000 nm) e próximo (NIR: 780-2500 nm) (SKOOG et al., 2006).

Quando uma amostra é escaneada, a energia radiante incidente é absorvida seletivamente de acordo com as vibrações específicas das moléculas presentes, o que produz sobretons no espectro. Avaliações da energia absorvida ou refletida permitem a obtenção de informações úteis após calibrações multivariadas para construção de modelos empíricos. Estes modelos relacionam a variabilidade contida no espectro de um determinado conjunto de amostras com suas características químicas determinadas em laboratório mediante emprego de métodos convencionais utilizados como referência (ALOMAR et al., 2009; LOBOS et al., 2013).

As análises realizadas com uso da espectroscopia NIR tem sua precisão influenciada por três fatores principais que são: a relação sinal-ruído dos dados espectrais; a proporção da absorbância do componente a ser medido em relação a absorbância total; e a sobreposição dos componentes espectrais do componente a ser medido e o componente de fundo. Para que a precisão da análise seja a maior possível, é desejável que haja maior relação sinal-ruído e maior proporção do componente a ser medido, bem como menor grau de sobreposição entre linha espectral do componente medido e a linha do componente de fundo (WANG et al., 2018).

É necessário que seja feita uma preparação adequada das amostras, especialmente das sólidas. O efeito da dispersão da luz, induzida por variações na densidade de compactação das amostras nas câmaras pode causar grandes fontes de erro nos espectros. O tamanho de partículas, propriedades da superfície, porosidade, índice de refração e a

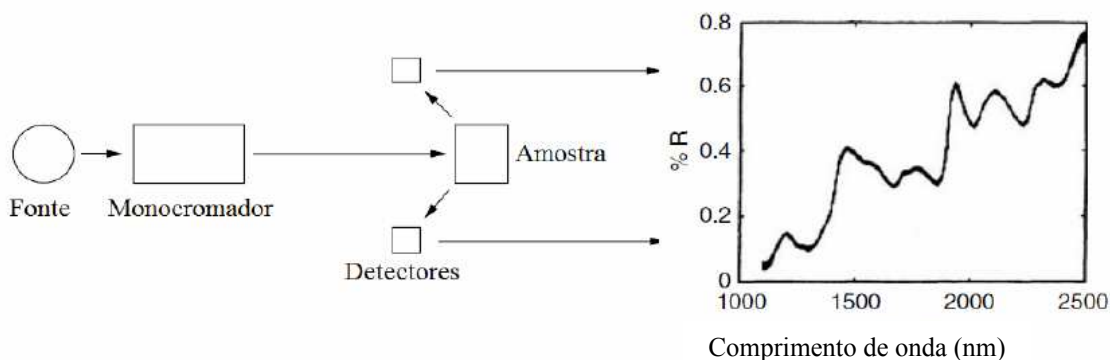
densidade das amostras moídas influenciam nas propriedades de reflexão, absorção e dispersão (CAIRÓS; COELLO; MASPOCH, 2008). Uma parte da luz emitida pelo espectrômetro em amostra sólida interage com as moléculas da mesma e é absorvida, sendo que a outra parte é refletida até o detector. Essa luz refletida é aquela que contém as informações espectrais da amostra que foi analisada (GINDRI, 2016).

### 2.5.1 Histórico e equipamento

A radiação no infravermelho próximo foi descoberta no ano de 1800 pelo cientista inglês Frederick Herschel, enquanto trabalhava em um experimento em que procurava a contribuição de forma individual das cores, pela decomposição da luz branca com o uso de alta temperatura (PASQUINI, 2003). Em seu experimento, Herschel, identificou que a medição de calor produzida pela luz solar em cores, utilizando um termômetro, acarretou um aumento na temperatura da cor azul (450-475 nm) para vermelho (620-750 nm), sendo que continuou crescendo depois da mudança de posicionamento do termômetro do vermelho visível. Dessa forma, Herschel concluiu que havia a presença de energia além do espectro visível (AGELET; HURBURGH, 2010; HERSCHEL, 1800).

Um espectrômetro é basicamente composto por cinco partes: (I) compartimento para a amostra, (II) uma fonte de luz, (III) sistema de seleção de comprimentos de onda, (IV) detectores e (V) processador de sinal ou computador (AGELET; HURBURGH, 2010). Normalmente, a composição das cubetas nas quais são colocadas as amostras é formada de materiais que não absorvem a luz utilizada na análise (GINDRI, 2016). O sistema de obtenção espectral está apresentado na Figura 1.

**Figura 1** – Ilustração sistemática da obtenção de espectro.



Fonte: Adaptado de Siesler (2007).

Como fonte de luz, habitualmente são utilizadas lâmpadas de halogênio de

tungstênio, que tem comprimento de onda de emissão que varia entre 320 e 2500 nm. O gás halogênio permite a reciclagem do tungstênio evaporado (STARK; LUCHTER, 2005), e dessa forma oferece a vantagem de uma vida útil maior em comparação às lâmpadas tradicionais (em halogênio) (AGELET; HURBURGH, 2010).

### 2.5.2 Técnica analítica

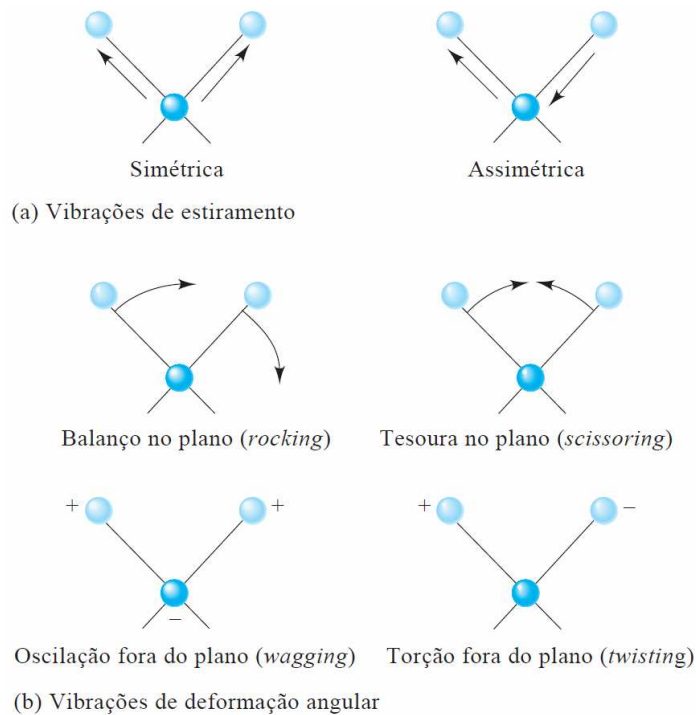
A espectroscopia de infravermelho próximo (*Near infrared reflectance spectroscopy* – NIRS) é uma técnica utilizada para avaliação dos constituintes da amostra, tanto de forma quantitativa quanto qualitativa. Isso ocorre devido a interações de ondas eletromagnéticas do infravermelho próximo com as moléculas químicas presentes na amostra (MUÑIZ et al., 2012).

A região NIR pode ser segmentada em três sub-regiões: I) varia de 800 a 1200 nm e pode ser nomeada de região ‘Herschel’, nessa faixa há a presença de transições eletrônicas, além dos sobretons e bandas de combinação; II) varia de 1200 a 1800 nm e contém os primeiros sobretons; III) varia de 1800 a 2500 nm, e é a região de modo de combinação (OZAKI, 2012).

O princípio da técnica é relacionado ao desenvolvimento de um espectro oriundo da energia da radiação absorvida, que é transformada em energia vibracional das moléculas, que gera movimento e alteram ângulo e comprimento das ligações (PASQUINI, 2003). A distribuição dos átomos nas moléculas bem como o tipo de ligação influencia na absorção da luz, fazendo com que haja vibração dessas ligações causando então estiramento e compressão de moléculas. Desse modo, são criados comprimentos de onda específicos considerando a energia absorvida naquelas ligações (SKOOG et al., 2006).

Os espectros obtidos na região NIR contém informações relacionadas a composição química de uma determinada amostra, que são fornecidas por sobretons e bandas de combinação das vibrações dos grupos C-H, O-H e N-H. Os chamados sobretons (ou *overtones*) são transações harmônicas que são resultados das vibrações moleculares, pois essa região é que absorve energia e, esta absorção está ligada a propriedade das ligações moleculares, definidas pela forma com que os átomos estão dispostos nas moléculas. As ligações moleculares existentes possuem vibração, causando estiramento ou compressão de moléculas. Dessa forma, origina-se uma emissão de frequência característica, com relação aos constituintes químicos presentes na amostra (VAN KEMPEN; JACKSON, 1996). É possível visualizar exemplos dos modos vibracionais moleculares na Figura 2.

**Figura 2** – Modos vibracionais moleculares após interação com a radiação eletromagnética.



**Fonte:** adaptado de Skoog et al. (2006).

O espectro NIR é composto de muitas bandas de sobretons e de combinação, que normalmente são sobrepostos, amplos e muitas vezes, demonstram baixa absorção de radiação. A região do infravermelho próximo é repleta de informações, sendo que as bandas de combinação de alongamento C-H e os sobretons de C-H ocorrem quatro vezes cada, e as bandas de combinação de O-H, os sobretons O-H e N-H ocorrem três vezes cada (SHENK; WORKMAN; WESTERHAUS, 2001; WORKMAN; WEYER, 2007). Um pico de absorção é definido como o ponto de maior absorção em uma determinada banda de absorvância (SHENK; WORKMAN; WESTERHAUS, 2001).

A identificação vibracional dos grupos de C-H, O-H e N-H permite que esse tipo de informação espectral possa ser utilizado para a definição de famílias espectrais, que são grupos de amostras que compartilham características bioquímicas dentro de uma população amostral (GILLON; HOUSSARD; JOFFRE, 1999). As moléculas que contêm hidrogênio em sua composição apresentam espectro NIR mensurável, o que origina uma grande diversidade de materiais orgânicos que podem ser medidos pela NIRS (MANLEY, 2014).

A partir do tipo de interação da intensidade da luz com a amostra analisada e do tipo de aparelho empregado, origina-se um espectro que pode ser de absorvância,

reflectância ou transmitância (SEFARA; CONRADIE; TURNER, 2000).

A espectroscopia de reflectância é aquela em que a luz é refletida por determinada amostra, sendo de maior complexidade, e pode se apresentar de forma especular ou difusa. O ângulo de reflexão do componente especular é o mesmo que a luz incidente, refletida em uma única direção e que atinge sua intensidade máxima quando a luz irradiada é perpendicular a uma superfície lisa. O componente de reflectância difusa da NIR refere-se a parte do feixe incidente que atinge um certo grau de penetração da amostra, sendo espalhado dentro desta e devolvido à superfície após a absorção (AGELET; HURBURGH, 2010). A radiação se propaga através do material de forma difusa, refletindo por espalhamento. Quando a radiação dispersa encontra diferentes limites de partículas, essa dispersão acontece em todas as direções, e de tal forma que, parte da radiação é absorvida e conseqüentemente sua intensidade diminui. Diante disso, dispersão e absorção ocorrem concomitantemente na camada da amostra em questão, até que a radiação atenuada restante ressurgir da superfície de entrada (PASIKATAN et al., 2001). A reflectância difusa decorre do tipo de partículas do meio e da profundidade efetiva de penetração da radiação para fornecimento de um espectro que seja representativo de toda a amostra (SCHWANNINGER; RODRIGUES; FACKLER, 2011). Para as análises NIR, a mais utilizada é a de reflectância do tipo difusa. A energia que as moléculas das amostras refletem exibem alterações nos comprimentos de onda na faixa de 1100 a 2500 nm (SEFARA; CONRADIE; TURNER, 2000). A granulometria é um fator que pode interferir na reflectância difusa, uma vez que as partículas mais finas podem apresentar menor absorção, em decorrência do menor percurso que a luz percorre (KRAGTEN; WYSS, 2014).

A complexidade dos espectros NIRS se dá pelo fato de que há vários modos de combinação e harmônicos associados ao grande número vibracional, sendo que esses fatores associados resultam em picos sobrepostos e conseqüentes bandas largas. Devido a essa situação, a interpretação visual dos espectros NIRS é difícil, bem como a atribuição dos componentes químicos ou características específicas, e também a extração de informações espectrais presentes. Para tornar possível a compreensão desses pontos citados, a partir do emprego de técnicas de regressão pode-se estabelecer relações entre valores de referência (MANLEY, 2014).

Dessa forma, a associação de técnicas quimiométricas de análise de dados, ou seja, a análise multivariada para a execução de regressões, com a identificação da assinatura espectral pela NIRS, é possível determinar simultaneamente diversas características de uma amostra a partir de bancos de dados que contenham resultados de referência robustos

e confiáveis.

### 2.5.3 Utilização da Quimiometria

A quimiometria é um ramo da química que associa o uso de matemática, estatística e dispositivos computacionais em análises químicas, e que sem o uso desses recursos de computação e métodos multivariados tornaria a tecnologia NIR algo sem possibilidade de uso, sendo efetiva para caracterização e identificação de padrões. Então, a quimiometria possibilita a interpretação dos espectros NIRS, dada por picos muito amplos e sobrepostos, alta sensibilidade às características físicas das amostras e alta redundância de informações devido ao baixo nível energético da faixa do infravermelho próximo (AGELET; HURBURGH, 2010; MANLEY, 2014; VISCARRA ROSSEL, 2008).

São utilizados procedimentos matemáticos para a remoção de informações indesejáveis, como efeito de granulometria e ruído espectral, visando a manutenção de informações importantes. No desenvolvimento dos modelos preditivos pela NIRS é feita a relação entre as variáveis independentes (os valores de absorvância em comprimentos de onda) representando a matriz  $\mathbf{X}$ , com os valores de concentração dos parâmetros de interesse analisados em laboratório, representando a matriz  $\mathbf{Y}$ . Desta forma, pode-se tornar efetivo o uso da espectroscopia NIR como técnica analítica para determinados materiais (AGELET; HURBURGH, 2010).

### 2.5.4 Métodos de pré-processamento de dados espectrais

A constituição dos dados espectrais apresenta sinais ligados à composição orgânica da amostra, bandas sobrepostas, alteração de linha de base e sinais sem informações oriundos de ruídos (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Como técnica para manuseio desses dados espectrais, os métodos de pré-processamento espectral (ou pré-tratamentos matemáticos) são um conjunto de procedimentos matemáticos aos quais os espectros podem ser submetidos antes da etapa de calibração como uma técnica fundamental que pode reduzir e corrigir sinais indesejáveis que os dados brutos possuem. Portanto, há a possibilidade de melhorar a relação entre o atributo de interesse e o espectro infravermelho (AGELET; HURBURGH, 2010; DE MARCHI et al., 2014; MCPARLAND; BERRY, 2016; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

O emprego de pré-tratamentos deve ser realizado com cautela para não

haver distorção ou inutilização dos resultados e visa a correção de efeitos produzidos na medida e que permaneceram após a aquisição dos dados e que não são eliminadas de forma natural durante a análise, influenciando nos resultados. Dois tipos de pré-tratamentos são possíveis de uso: aquele que é aplicado às amostras (linhas da matriz de dados – transformação de dados) e o outro, nas variáveis (colunas de X – pré-processamento) (FERREIRA, 2015c).

Ao utilizar um pré-tratamento no espectro, pode-se utilizar filtros de ruído visando aprimoramento de sinal (técnicas de alisamento) e fazer correção de linha de base (normalização) (AGELET; HURBURGH, 2010; MARTENS; JENSEN; GELADI, 1983). Esses pré-tratamentos podem eliminar, reduzir ou padronizar possíveis fatores de interferência como ruídos, espalhamentos de luz, distorções causadas pelo aparelho e aqueles relacionados à própria amostra. O ponto importante é que essa etapa é realizada sem causar qualquer tipo de alteração nas informações espectrais (SIESLER; OZAKI, 2002).

É importante lembrar que o pré-tratamento ‘ideal’ para um determinado espectro depende do tipo de sinal (transmitância, reflectância), das características da amostra, da constituição do aparelho e da aplicação ou objetivo final (calibração ou discriminação de dados). Ou seja, para que o método adequado seja aplicado existe dependência do tipo de instabilidade presente nos dados espectrais. Não existe regra geral para escolha do método de pré-processamento adequado, geralmente utiliza-se tentativa e erro, juntamente com a experiência do técnico.

A centragem na média (*Mean centering* – MC) é um pré-processamento básico que remove a absorbância absoluta (linha de base absoluta), melhorando a absorbância individual por comprimento de onda. Nesse método, é realizado o cálculo do valor médio de cada coluna da matriz de dados e posteriormente, faz-se a subtração desse valor cada um dos valores da mesma coluna – originando uma transposição dos dados para o centro do sistema de coordenadas, mantendo a estrutura dos dados. O intuito da MC é salientar a variação importante entre as amostras, com efeito adicional de remoção do deslocamento dos dados (AGELET; HURBURGH, 2010; BRO; SMILDE, 2003; FERREIRA, 2015c; SANTOS et al., 2021; VAN DEN BERG et al., 2006). A equação para cálculo é dada a seguir, na qual amostra  $i$ , uma medida  $j$  realizada para todas  $i$  amostras e representa a média da coluna.

O auto escalamento (*Auto-scaling*) é um pré-processamento no qual se faz a subtração de cada unidade de uma coluna da matriz de dados do valor médio da mesma coluna e posteriormente, divide-se o resultado obtido pelo desvio-padrão dessa coluna. Isto

possibilita que cada comprimento de onda possua a mesma relevância durante a calibração, evitando o efeito de uma variável dominante. Esse método é proposto quando há diferença de escalas entre as variáveis, ou quando há grande variação entre os dados. Existe um contraponto ao utilizar o auto escalamento que é quando variáveis que possuem muito ruído, se tornam importantes após o processamento, o que traz a indicação de não o usar quando dados forem assim caracterizados (AGELET; HURBURGH, 2010; BRO; SMILDE, 2003; FERREIRA, 2015c; SANTOS et al., 2021; VAN DEN BERG et al., 2006). Para calcular o auto escalamento pelo desvio-padrão é utilizada seguinte equação, na qual amostra  $i$ , uma medida  $j$  realizada para todas  $i$  amostras  $e$  representa a média da coluna, e  $s$  o desvio padrão da coluna.

A correção multiplicativa de espalhamento (*Multiplicative scatter correction – MSC*) e a padronização normal de sinal (*Standard normal variate – SNV*) são transformações de dados que permitem a correção de efeitos de distorções espectrais causados por espalhamento (AGELET; HURBURGH, 2010; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). As implicações de espalhamento são causadas por fatores físicos, tais como: granulometria, temperatura, sensibilidade do sistema de detecção e que não são correlacionadas com a constituição das amostras (SANTOS et al., 2021). A MSC considera todo o conjunto de espectros, que são calculados primeiro em média, depois são calculados individualmente por mínimos quadrados parciais para a média total, enquanto a SNV centraliza e dimensiona individualmente os espectros (cada um com média igual a zero e desvio-padrão igual a 1) (DHANOA et al., 1994).

Outro método de transformação de dados que é bastante utilizada em análises quimiométricas é o uso de derivadas, podendo essas ser de primeira e segunda ordem com o intuito da correção de deslocamento vertical ou inclinação (ENGEL et al., 2013). As derivadas servem como alternativa para a correção do efeito de sobreposição de picos que melhoram o sinal obtido, para remoção do desvio da linha de base espectral e para inclinação da linha de base (AGELET; HURBURGH, 2010). A derivação de espectros brutos evidencia as informações contidas nos diferentes comprimentos de onda, o que possibilita melhora evidente da resolução espectral. Dessa forma, bandas sobrepostas podem ser notáveis e pequenas variações espectrais dos dados brutos que antes não eram notáveis, são destacadas (SAVITZKY; GOLAY, 1964).

A primeira derivada retira o deslocamento da linha de base, enquanto a segunda faz o mesmo, mais a remoção da inclinação da linha de base. Dessa forma, ao reduzir

a razão sinal-ruído, os algoritmos de Savitzky-Golay (SG) podem ser empregados para o cálculo das derivadas dos polinômios ajustados (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Os filtros de derivadas polinomiais de Savitzky-Golay são os mais utilizados, e auxiliam na suavização do espectro ou filtragem dos dados antes do cálculo da derivada, diminuindo o efeito negativo da razão sinal-ruído. A técnica é realizada a partir de uma função polinomial de determinado grau indicado, com ajuste a uma janela de pontos espectrais por mínimos quadrados (SAVITZKY; GOLAY, 1964).

As derivadas são bastante usadas na análise de espectros de refletância difusa devido a constante ocorrência de complicações de deslocamento e inclinação de linha de base (FERREIRA, 2015c).

### 2.5.5 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (*Principal components analysis* – PCA) é uma técnica que visa a redução da dimensionalidade dos dados, para que se encontre similaridade entre os grupos de amostras e para a detecção de algumas que possam ser consideradas como *outliers* (FERREIRA, 2015a; SOUZA; POPPI, 2012).

A PCA projeta os dados espectrais em um novo espaço dimensional, sendo que os comprimentos de onda, e o conjunto inicial de variáveis são delineados no novo espaço definido pelo eixo chamado componentes principais (*Principal component* – PC). Consecutivamente as componentes principais são elaboradas, seguindo a direção da variabilidade dos dados em ordem decrescente, mantendo restrição ortogonal entre eles. Dessa forma, as variáveis que eram redundantes (absorbância dos comprimentos de onda), são substituídas por um novo pequeno conjunto de variáveis não relacionadas (AGELET; HURBURGH, 2010; FERREIRA, 2015a).

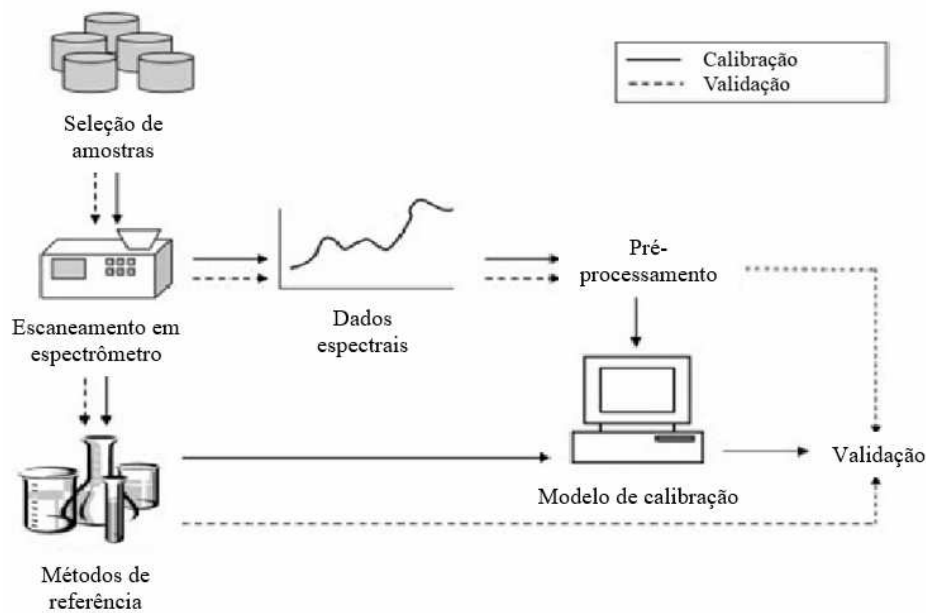
A informação presente em uma PC não está incluída em outra. Isso porque as componentes principais são ‘não’ correlacionadas e ortogonais entre si, e também existe a diferença entre a quantidade das informações originais que cada uma pode representar. A PC1 é estabelecida a partir da direção que pode caracterizar a variância máxima dos dados originais, enquanto a PC2 possui a direção da maior variância no subespaço ortogonalmente à PC1. Prontamente, as componentes decorrentes se apresentam ortogonais às prévias e têm sua orientação de acordo com a variância restante (FERREIRA, 2015a). Para interpretar uma PCA, pode-se utilizar os gráficos de *scores* e *loadings*. Esses dois parâmetros são variações da matriz X decomposta (matriz prévia com dados originais), sendo possível a determinação

de variáveis que auxiliam e melhoram a caracterização de diferenças entre as amostras (SOUZA; POPPI, 2012).

#### 2.5.6 Calibração multivariada

A etapa de calibração consiste no desenvolvimento do modelo de predição NIRS. O processo como um todo envolve (a) a aquisição dos dados espectrais; (b) a realização de análises pelo método de referência adequado para as amostras em questão; (c) pré-processamentos espectrais, caso necessário; (d) emprego de um método de regressão para relacionar os dados espectrais com os dados de amostras analisadas; (e) e por último, a validação dos modelos com a utilização de um conjunto amostral distinto daquele utilizado para a calibração do modelo (CEN; HE, 2007). Os modelos de calibração NIRS são capazes de correlacionar os espectros brutos ou pré-processados (matriz  $\mathbf{X}$ ) com uma ou mais propriedades físico-químicas (Matriz  $\mathbf{Y}$ ) de uma população amostral, de forma a desenvolver um modelo matemático que visa a predição de amostras desconhecidas (AGELET; HURBURGH, 2010; MELQUIADES et al., 2012). Na calibração multivariada, deve-se levar em consideração a multicolinearidade, ou seja, há informações redundantes devido à alta correlação das variáveis (espectros). A inclusão de muitas dessas variáveis pode reduzir a generalização de um modelo (SOUZA; MADARI; GUIMARÃES, 2012). Na Figura 3 está apresentado um esquema dos processos de calibração multivariada.

**Figura 3** – Diagrama em bloco com os passos básicos para desenvolvimento de uma calibração NIR.



Fonte: adaptado de Agelet e Hurburgh (2010).

Um ponto importante para emprego da calibração multivariada é a confecção do conjunto amostral a ser utilizado. Nesse conjunto amostral deve haver características de interesse anteriormente estabelecidas pelas metodologias laboratoriais de referência, representando a variabilidade de amostras desconhecidas ao modelo de calibração (MUÑIZ et al., 2012). A calibração é uma etapa que demanda maior tempo, e a qual deve ser dada muita atenção, tanto na construção do banco de dados, que é um processo complexo na escolha do tratamento dos dados, quanto na utilização do equipamento em si. Existe a necessidade de um amplo número de amostras para que haja credibilidade no banco de dados criado, sendo que quando um banco amostral de pouca abrangência é utilizado, ocorre o comprometimento da confiabilidade das predições (ALMEIDA et al., 2018; DEEPA et al., 2016).

A regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Regression* – PLS) é um dos métodos de calibração, sendo o mais utilizado para calibração multivariada. Baseia-se em informações presentes nas variáveis medidas, para que possam ser interpretadas e concentradas em menor número de variáveis que sejam representativas do todo e sem perder informações relevantes. Dessa forma, a regressão é realizada com essas ‘novas’ variáveis, simplificando o modelo de calibração e a interpretação dos resultados (LOBOS et al., 2013).

A PLS foi introduzida por Wold (1975) com a proposta de realizar uma regressão nos dados projetados para um novo espaço dimensional, em que as novas

coordenadas (chamadas de variáveis latentes) criadas em um processo semelhante ao da realização da PCA, levam em consideração a informação da matriz dos valores de referência (AGELET; HURBURGH, 2010).

A PLS realiza técnica de análise de componentes principais que reduz a dimensionalidade do conjunto amostral para correlacionar a matriz **X** (espectros) com a matriz **Y** (propriedade medida), objetivando encontrar a maior covariância entre esses. Quando há uma propriedade, **y** é um vetor e a metodologia é chamada de PLS1, que origina um modelo ótimo para cada atributo analisado. As matrizes **X** e **Y** são posteriormente decompostas em *scores* e *loadings*, sendo que o primeiro caracteriza a posição das amostras no sistema de PC, enquanto o segundo, a contribuição de cada variável original (comprimento de onda). Na PLS, o cálculo de cada PC leva-se em consideração a concentração dos atributos medidos nas amostras, assim, as PC são nomeadas variáveis latentes (VL). Além da PLS1, é possível utilizar a PLS2 quando há mais de uma coluna na matriz **Y** e todas são empregadas simultaneamente no momento da regressão. É uma técnica alternativa quando as características medidas são correlacionadas, e nesse caso, **Y** é uma matriz (FERREIRA, 2015b; SOUZA et al., 2013).

Em relação ao número ótimo de variáveis latentes de uma PLS, é importante evitar situações extremas como superajuste ou subajuste. Na primeira situação, ocorre o emprego excessivo de VLS e conseqüente ruído, enquanto na segunda pode haver perda de informações importantes e poucas VLS (FERREIRA, 2015b). Esse parâmetro é uma medida da eficácia potencial da calibração propriamente dita, sendo que preferencialmente, é desejável que uma PLS seja desenvolvida com não mais que seis a oito fatores (WILLIAMS; DARDENNE; FLINN, 2017).

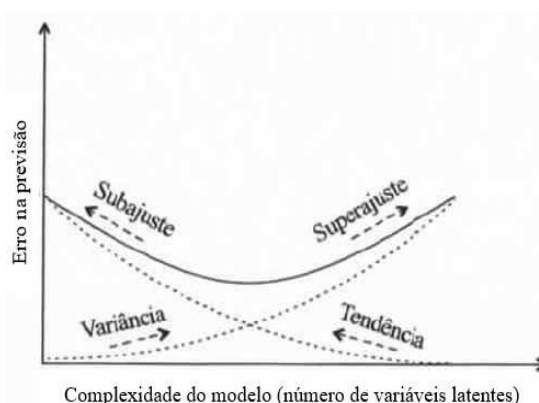
Uma das abordagens mais utilizadas para a escolha do número de fatores a ser mantido no modelo de calibração é referente a obtenção do menor valor da raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (*Root mean square error of cross-validation* – RMSECV) e a respectiva resposta à variância, juntamente com *loadings* e *scores* que são considerados para essa avaliação, evitando um alto erro de previsão (BUONAIUTO et al., 2021; FERREIRA, 2015b; GONTIJO NETO; SIMEONE; GUIMARÃES, 2010). O uso de um número adequado de variáveis latentes permite comprovar a eficácia de modelos desenvolvidos para uso futuro, como uma comprovação de estabilidade dos mesmos (AGELET; HURBURGH, 2010; SIMONI et al., 2021).

A validação cruzada consiste em um tipo de validação interna do modelo com intuito de verificar a adequação do modelo ao menor valor de RMSECV, como citado

anteriormente para definir o número de VLs. Nessa técnica uma amostra ou grupo de amostra (espectro) que pertence ao banco de calibração é retirado do modelo, sendo realizada uma predição com as amostras restantes. O sistema é repetido para a totalidade do conjunto amostral, e RMSECV é calculada para cada número de VLs utilizadas. Então, a partir de um número ótimo de variáveis latentes, e quando se atinge uma RMSECV que não apresente muita variação, considera-se esse valor a ser utilizado no modelo (AGELET; HURBURGH, 2010; SOUZA et al., 2013).

Na Figura 4 é possível visualizar um gráfico representativo do comportamento de erro preditivo, tornando o modelo tendencioso. Tendência e variância explicada em  $\mathbf{X}$  combinadas acarretam maior erro de previsão. É necessário que haja um equilíbrio entre elas, para futuras previsões. Quando há um pequeno número de VLs e um alto erro de previsão, origina-se um modelo subajustado com informações consideravelmente excluídas. O oposto ocorre quando um modelo superajustado é desenvolvido, com inclusão de informações em excesso (ruído) juntamente com aumento da variância em  $\mathbf{X}$  e diminuição de tendência. O ideal para o desenvolvimento do modelo de calibração é que conforme são incluídas VLs no modelo, adiciona-se informações importantes, aumentando naturalmente a variância explicada (diminuindo erro e tendência), ao encontrar o número ótimo de variáveis latentes (obtido a partir do menor valor de RMSECV), com a curva passando pelo mínimo (FERREIRA, 2015b; PARRINI et al., 2019; SIMONI et al., 2021).

**Figura 4** – Dinâmica da variância e tendência de modelos PLS, em geral – linhas tracejadas. A linha contínua representa o erro na previsão.



**Fonte:** adaptado de Ferreira (2015b).

No momento de avaliação de uma calibração é necessário levar em consideração medidas de tendência central, dispersão e qualidade dos modelos (MARTENS; NAES, 1992). É desejável que a distribuição dos valores de referência seja uniforme

(distribuição normal), para que amostras com concentrações mais altas ou mais baixas de determinado componente não sejam tão relevantes na calibração (AGELET; HURBURGH, 2010). O modelo de calibração deve apresentar equilíbrio entre a precisão (que restringe a variação espectral para obter uma calibração precisa) e a robustez (que prolonga a variabilidade espectral para obtenção de uma calibração que pode ser aplicada a um conjunto de material diversificado) (GILLON; HOUSSARD; JOFFRE, 1999).

Para a execução de uma calibração multivariada como no caso da PLS, é importante escolher um conjunto amostral adequado e confiável. Essa técnica exige os seguintes requisitos: (1) é necessário que o conjunto seja representativo para as amostras futuras, das quais os novos espectros serão mensurados; (2) deve englobar as possíveis variações de medição existentes, que podem afetar a calibração multivariada; (3) as condições de mensuração devem ser semelhantes o máximo possível; (4) o espaço espectral (variável  $X$ ) e o espaço dinâmico de referência (variável  $Y$ ) devem possuir uma variação ampla, principalmente em  $Y$  (ESBENSEN, 2002).

Não existe uma regra geral para determinar o número ‘ideal’ de amostras a compor o banco de calibração. Entre 20 e 30 amostras, pelo menos, devem ser utilizadas para estudos de viabilidade e calibrações iniciais (WILLIAMS, 2007). Para calibrações mais robustas devem utilizar no mínimo 100 amostras (AGELET; HURBURGH, 2010; MANLEY, 2014), e com resultados acurados que sejam representativos dos mais variados manejos, características da planta, estágios de desenvolvimento da mesma e outros (BAATH et al., 2020). Calibrações com amostras que apresentam complexidade e heterogeneidade de composição como forragens e grãos, necessitam de maior número amostral do que aquelas com misturas mais homogêneas (AGELET; HURBURGH, 2010). Na rotina analítica, normalmente são usados dois terços do banco amostral total para a etapa de calibração, e o terço remanescente para teste dos modelos, ou seja, para a validação.

Mesmo sem uma regra geral, é possível encontrar sugestões de composição de bancos amostrais para calibrações multivariadas. A norma ASTM E 1655-00 sugere que o conjunto possua após a remoção de *outliers* caso sejam utilizados dados centrados na média, no qual  $VL$  é o número de variáveis latentes da calibração (ASTM E 1655-00, 2000).

Na etapa de calibração, pode ser necessária a identificação e retirada de amostras consideradas anômalas, os chamados *outliers*. Esses *outliers* são aquelas amostras que podem prejudicar a predição de futuras amostras por não representarem a população estudada (ALMEIDA et al., 2018). A retirada pode ser feita a partir de verificação visual (o que nem sempre é suficiente nem recomendado), e através de indicadores do quanto a amostra

é divergente do demais dados em uma determinada dimensão (AGELET; HURBURGH, 2010; MARTENS; NAES, 1992). A identificação de *outliers* é imprescindível para o desenvolvimento de modelos NIRS precisos (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013). É possível retirar *outliers* de dados espectrais e dos valores medidos pelas técnicas de referência por meio da alavancagem (*leverage*), observando o valor de resíduo espectral alto e nas concentrações medidas (ASTM E 1655-00, 2000; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007).

A *leverage* ( $h_i$ ) (ou ancoragem) mede a influência amostral no modelo, ou seja, aquelas amostras que possuem  $h_i$  devem ser eliminadas no momento do desenvolvimento da PLS, no qual  $VL$  é o número de variáveis latentes do modelo e  $n$  é o número de amostras do banco de calibração. As amostras com valor de resíduo espectral alto são identificadas pela conferência entre o desvio padrão total e o desvio padrão individual por amostra. Isto é relacionado aos valores de absorbância ou  $\log(1/R)$  medidos e preditos com o número de VLs. Se uma amostra apresentar  $h_i > 2$ , essa deve ser eliminada. Altos resíduos nos valores medidos, ou seja, na concentração de determinada amostra, configura um *outlier* desse grupo. Se a diferença entre o valor medido e o predito for maior que três vezes o valor da raiz quadrada do erro médio da calibração (*Root mean square error of calibration – RMSEC*), a amostra deve ser excluída do modelo (ASTM E 1655-00, 2000; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; HASTIE; TIBSHIRANI; FRIEDMAN, 2009; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007)

### 2.5.7 Validação dos modelos preditivos

Para atender ao propósito do desenvolvimento dos modelos de calibração pela tecnologia NIRS, é importante a adequada validação desses modelos para determinação da capacidade preditiva em relação a novas amostras (AGELET; HURBURGH, 2010). A etapa de validação tem como objetivo avaliar o modelo desenvolvido previamente, sendo que um modelo pode ser aprovado e considerado para utilização para prever determinado parâmetro caso apresente desempenho desejado (MUÑIZ et al., 2012).

Considera-se que uma validação ‘ideal’ deve ser feita com amostras externas ao banco de dados utilizado na calibração, e esse processo é chamado de validação independente ou externa. Para a validação externa são utilizadas amostras diferentes das que participaram da etapa de calibração com os valores de  $Y$  e de  $X$  conhecidos, que sejam representativas dessas e de futuras amostras que podem ser preditas (AGELET; HURBURGH, 2010; FERREIRA, 2015b). A validação externa é uma ferramenta consistente

para testar o desempenho de modelos de predição, principalmente para a análise de amostras desconhecidas, em relação a validação cruzada (LOBOS et al., 2013).

Entretanto, esse procedimento pode ser um problema devido à dificuldade de manutenção de bancos de dados diferentes com relação mínima entre eles, o que consequentemente leva à alternativa de realizar a chamada validação cruzada ou interna (*Cross validation*). Essa pode fornecer uma avaliação básica sobre o desempenho da calibração (AGELET; HURBURGH, 2010).

Para a validação cruzada, duas formas podem ser aplicadas: manter uma única amostra (*full cross-validation*) ou um grupo de amostras separados em segmentos (*k-fold cross validation*) e assim desenvolver uma calibração com as amostras restantes, dependendo do método escolhido a ser utilizado. Posteriormente, a calibração desenvolvida é validada com as amostras retiradas e o processo repetido até todas serem preditas uma vez – dessa forma testa-se vários submodelos desenvolvidos com os subconjuntos dos dados de calibração e não o modelo inicial (AGELET; HURBURGH, 2010). A separação dos conjuntos de calibração e validação pode ser realizada como (a) validação cruzada *holdout*: na qual cria-se aleatoriamente dois subconjuntos de dados, sendo uma determinada porcentagem utilizada para calibração e o remanescente, para validação; (b) validação cruzada *leave-one-out (full cross-validation)*: considerando o conjunto de dados da calibração retira-se uma amostra e dessa forma, é realizada essa divisão N vezes até todas serem utilizadas na validação; (c) validação cruzada *k-fold*: todo o banco de dados da calibração é dividido aleatoriamente em subconjuntos de tamanhos semelhantes e um grupo é separado para validação – todos os conjuntos devem ser utilizados para essa última (ARLOT; CELISSE, 2010; PARRINI et al., 2019; SIMONI et al., 2021; STONE, 1974). O modelo escolhido para uso na validação deve ser aquele que apresenta menor resíduo, e que sejam aleatórios e não correlacionados, com distribuição normal (AGELET; HURBURGH, 2010; FERREIRA, 2015b).

Em relação ao número de amostras do conjunto externo de validação, sugere-se que esse grupo seja similar ao do conjunto de calibração (FERREIRA, 2015b). A complexidade do modelo também determina o número de amostras a ser utilizado. Modelos desenvolvidos com cinco ou menos VLS devem ter no mínimo 20 amostras no grupo de validação, senão, deve-se usar um conjunto com quatro vezes o número de VLS do modelo (ASTM E 1655-00, 2000).

## 2.5.8 Figuras de mérito utilizadas para avaliação dos modelos

As figuras de mérito são essenciais para verificar a viabilidade do modelo e a metodologia empregada para desenvolvê-lo (SANTOS et al., 2021), e devem ser avaliados em conjunto.

A avaliação geral do modelo de calibração pode se fundamentar no número de fatores ou variáveis latentes selecionadas que diminuam o valor da raiz quadrada do erro médio (*Root mean square of error* – RMSE) (SIMONI et al., 2021). A RMSE pode ser empregada na análise da dispersão da concentração medida de um atributo em relação a linha de dispersão. Quanto menor o valor de erro, mais próxima é a estimativa do valor medido na variável dependente (MILLMIER et al., 2000).

A raiz quadrada do erro médio de calibração (*Root mean square error of calibration* – RMSEC) sugere informações sobre o ajuste dos modelos aos dados do banco de calibração, sendo ilustrada na equação a seguir, expressando a diferença entre os valores dos resultados das análises de referência pelos métodos convencionais e aqueles estimados pela NIRS (LOBOS et al., 2013; PARRINI et al., 2019).

Na equação,  $e$  são os valores de referência e os valores estimados da amostra  $i$  no conjunto de calibração,  $n_c$  é o número de amostras do banco de calibração e 1 é o número de graus de liberdade.

A diferença entre valores de referência (obtido pelos métodos convencionais) e os valores preditos é expressa como a raiz quadrada do erro médio da predição (*Root mean square error of prediction* – RMSEP) ou pela raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (*Root mean square error of cross validation* – RMSECV). A RMSEP determina a eficiência de um modelo de calibração na predição de um parâmetro em um grupamento de amostras de valor desconhecido, e que sejam diferentes daquelas que foram utilizadas na calibração (SOUSA et al., 2011), e é definida pela equação a seguir.

Na equação,  $e$  são os valores medidos e preditos da amostra  $i$  no conjunto de predição e  $n_p$  é o número de amostras do conjunto de predição.

A RMSEP é considerada um parâmetro muito robusto (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; FERREIRA, 2015b). A partir da RMSEC e da RMSEP é possível avaliar a veracidade ou acurácia dos modelos preditivos, e é preferível que a diferença entre eles seja pequena (BOTELHO; DANTAS; SENA, 2017; PARRINI et al., 2022).

A RMSECV normalmente é utilizada para determinar o número ótimo de variáveis latentes utilizadas no modelo de calibração, com intuito de evitar subajuste ou

superajuste e alto erro de previsão (BUONAIUTO et al., 2021; FERREIRA, 2015b). A RMSECV é calculada a partir de:

Na equação citada,  $\hat{y}_i$  e  $y_i$  são os valores preditos e observados da amostra  $i$  no conjunto de calibração e o  $n_c$  é o número de amostras do mesmo.

O coeficiente de determinação (*Coefficient of determination* –  $R^2$ ) representa a proporção da variância explicada nos dados de referência contabilizada pelo modelo de regressão, indicando a interação linear dos dados medidos e preditos (LANDAU; GLASSER; DVASH, 2006; PARRINI et al., 2022; TRAN et al., 2010), e possibilita a interpretação pelos gráficos de dispersão. O  $R^2$  é definido pela seguinte fórmula, na qual  $\hat{y}_i$  e  $y_i$  são os valores medidos e preditos da amostra  $i$  no conjunto de calibração ou predição, o  $n$  é o número amostral e o  $\bar{y}$  é a média do método de referência para todas as amostras nos conjuntos de calibração e validação.

Geralmente consideram-se valores acima de 0,90 como utilizáveis para maior parte das aplicações (TRAN et al., 2010; WILLIAMS; ANTONISZYN; MANLEY, 2019). Williams et al. (2019) propuseram uma escala de categorização para valores de  $R^2$  com sete faixas: 1)  $R^2$  de até 0,25 – não utilizável; 2)  $R^2$  de 0,26-0,49 – baixa correlação dos dados (investigar razões); 3)  $R^2$  de 0,5-0,64 – triagem grosseira; 4)  $R^2$  de 0,66-0,81 – aceitável para triagem e outras calibrações aproximadas; 5)  $R^2$  de 0,82-0,90 – usável com cautela para a maioria das aplicações, incluindo pesquisa; 6)  $R^2$  de 0,92-0,96 – utilizável para na maioria das aplicações incluindo controle de qualidade;  $R^2 >$  que 0,98 – excelentes, para qualquer tipo de aplicação.

A razão de intervalo de erro (*Range error ratio* – RER) é uma medida calculada pela divisão da amplitude da faixa de concentração de um determinado dado pelo SEC/SEP ou RMSEC/RMSEP e é considerado como um indicador de utilidade prática do modelo. A RER é definida pela equação:

Na equação,  $y_{max}$  representa o valor máximo do conjunto amostral de calibração ou predição e  $y_{min}$ , o valor mínimo do mesmo banco – sendo considerados os valores obtidos pelos métodos de referência.

Aqueles modelos com valor de RER maior que 10 apresentam alta utilidade prática; enquanto os modelos com valores entre 10 e 3 têm uma utilidade prática considerada

limitada; e modelos com valor de RER menor que 3 apresentam pouca utilidade prática (WILLIAMS; SOBERING, 1996). Outra classificação foi proposta por Millmier et al. (2000) com três faixas de variação. Resultados de RER entre 4 e 8 foram atribuídos a modelos com capacidade de distinção de valores altos e baixos; RER de 8 a 12, modelos para predição quantitativa; e RER > que 12 para modelos com habilidade de boa predição.

Para a etapa de validação dos modelos são considerados mais dois parâmetros, o desvio preditivo residual e o erro sistemático.

O desvio preditivo residual (*Residual prediction deviation* – RPD) é utilizado para avaliar a capacidade preditiva e veracidade dos modelos, definido como a razão do desvio-padrão amostral do método convencional e entre os valores de RMSEP dos modelos de validação (AGELET; HURBURGH, 2010; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; PARRINI et al., 2018; WILLIAMS, 2014; WILLIAMS; SOBERING, 1993). O RPD é ilustrado pela equação a seguir:

Na equação,  $DP_{pred}$  é o desvio-padrão amostral dos valores obtidos pelo método convencional, do conjunto de predição.

Esse parâmetro é relacionado com a capacidade preditiva do modelo com dados futuros, em relação a variabilidade inicial dos dados de calibração (AGELET; HURBURGH, 2010), sendo considerado extremamente robusto em termos absolutos, abordando a veracidade (acurácia) dos modelos (BOTELHO; DANTAS; SENA, 2017; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013).

Várias faixas de classificação podem ser empregadas quando se considera o RPD de um modelo preditivo. Segundo Goldshleger et al. (2013), valores de RPD abaixo de 1,5 mostra um modelo de predição inutilizável; valores entre 1,5 e 2,0 apontam modelos com potencial de distinção entre valores baixos e altos; valores entre 2,0 e 2,5, o modelo pode ser utilizado para predição quantitativa; e modelos com RPD maiores que 2,5 podem indicar uma excelente capacidade preditiva. Quando o RPD possui um valor maior que 10, pode-se dizer que é excelente e equivalente, ou até mesmo melhor que, os métodos físico-químicos de referência utilizados para controle de processos, desenvolvimento e pesquisa aplicada. Valores entre 5 e 10 são considerados adequados para controle de qualidade; valores entre 2,5 e 5 são satisfatórios para triagem em programas de melhoramento genético. A obtenção de valores de RPD menores que 1,0 indica a igualdade de SEP e desvio-padrão. Conseqüentemente a isso, é considera-se que a ferramenta utilizada para a análise não é capaz de predizer o parâmetro desejado de forma acurada ao utilizar o modelo de calibração em

questão (WILLIAMS; SOBERING, 1993).

Uma das classificações mais ajustadas para avaliação de RPD de materiais como plantas forrageiras, sementes e rações pela NIRS foi sugerida por Williams (2014). O pesquisador relatou que fatores como preparação de amostras, técnicas de referência e baixa variabilidade do banco amostral podem originar valores de RPD menores que 3. Dessa forma indicou uma classificação mais adequada e realista para forragens, rações e solos. Valores de RPD na faixa de 0,0-1,9 foram desconsiderados para uso; entre 2,0-2,4 foram sugeridos para triagem aproximada; entre 2,5-2,9 foram sugeridos para triagem; entre 3,0-3,4 foram classificados como controle de qualidade; entre 3,5-4,0 avaliados como muito bons e para controle de processo; e valores acima de 4,1 foram interpretados como excelentes e utilizáveis para qualquer aplicação (WILLIAMS, 2014). Um banco de dados com informações de forragens de diferentes idades, bem como de forragens conservadas, pode melhorar a variabilidade desse banco, melhorando o valor de RPD (ANDUEZA et al., 2011).

O erro sistemático ou *Bias* de um modelo preditivo, mesmo pouco citado em trabalhos na literatura, pode ser mais um parâmetro de avaliação da qualidade/capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos. Entretanto, é importante lembrar que o *Bias* deve ser calculado apenas quando os valores preditos e de referência são conhecidos (BELLON-MAUREL et al., 2010). O *Bias* caracteriza a acurácia do modelo, que considera a média do grupo geral e o valor real – sendo calculado pela diferença entre valor medido e predito, dividido pelo número amostral do banco de validação (BOTELHO; DANTAS; SENA, 2017). Pode ser ilustrado pela equação a seguir.

Na equação,  $\bar{y}_r$  representa os valores determinados pelos métodos de referência e  $\bar{y}_p$  representa os valores preditos, ambos do conjunto amostral de predição; e o  $n_p$  é o número de amostras do mesmo conjunto.

Quando são encontrados valores de *Bias* positivos ou negativos, há a possibilidade de superestimativas ou subestimativas, respectivamente (HEIL; SCHMIDHALTER, 2021; TRAN et al., 2010). Ao utilizar amostras de validação externa para calcular esse parâmetro, presume-se que valores diferentes de zero sejam apresentados (WIEDEMAIR et al., 2019).

É necessário considerar as figuras de mérito em conjunto para que haja confiabilidade na avaliação dos modelos preditivos, além disso é preciso atentar para a qualidade das análises de referência e para a taxa de erro de previsão a ser aceita. Assim, há a possibilidade de uso dos modelos no auxílio de tomadas de decisão de maneira mais ágil

(VRANIC et al., 2016).

## 2.6 USO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO NA AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE PLANTAS FORRAGEIRAS

A partir da primeira utilização em 1976, o emprego e a pesquisa em relação a análise de alimentos vêm progredindo para a tentativa de substituição das técnicas químicas tradicionais pela espectroscopia de infravermelho próximo (PARRINI et al., 2022). Uma calibração NIRS pode ser considerada utilizável para predição da composição química de forragem quando há um erro de ordem semelhante ao obtido na análise química de referência (LANDAU; GLASSER; DVASH, 2006).

Vários estudos têm demonstrado a importância da avaliação de parâmetros simultâneos na análise nutricional de plantas forrageiras pela espectroscopia NIR, desde gramíneas a leguminosas com resultados otimistas (ANDUEZA et al., 2011; BAATH et al., 2020; DECRUYENAERE et al., 2009; FONTANELI et al., 2002, 2004; LOBOS et al., 2013; NORMAN et al., 2015; PARRINI et al., 2022; SAHA et al., 2017, 2018; SERAFIM et al., 2021; YANG et al., 2017).

Para que haja confiabilidade nos modelos elaborados, um grande banco amostral deve ser desenvolvido a partir dos resultados de referência para se obter uma representatividade de diversas condições de cultivo, de manejo, áreas de produção, e variações ambientais e de genética (BAATH et al., 2020; RUSHING et al., 2016). Para aplicabilidade e capacidade de reprodução de um modelo é sugerido que existam mais de 100 amostras compondo o banco de dados com resultado mais exatos e precisos determinados pelos métodos de referência (MANLEY, 2014). A qualidade das análises químicas laboratoriais utilizadas como dados de referência, influenciam de forma importante nas calibrações pela tecnologia NIRS (AGELET; HURBURGH, 2010).

A identificação das bandas características de moléculas orgânicas é facilitada pela natureza das ligações de C-H, N-H, O-H e S-H na região do infravermelho próximo, o que torna a técnica analítica confiável (SHENK; WORKMAN; WESTERHAUS, 2001). A sensibilidade da NIRS propicia a identificação e avaliação dos teores de água, de moléculas de carboidratos e proteína, e de gordura em amostras variadas. A composição química com constituintes em abundância pode acarretar sobreposição de bandas de absorvância e nesse caso, emprega-se a quimiometria para o desenvolvimento e uso dos modelos preditivos (KRAGTEN; WYSS, 2014). Na Tabela 1 a seguir é possível visualizar um

compilado dos comprimentos de onda mais característicos de moléculas orgânicas presente em materiais vegetais.

**Tabela 1.** Compilado das principais regiões do espectro no infravermelho próximo com relação as moléculas de proteína, fibra e gordura em amostras de material vegetal.

Comprimento de onda (nm)	Molécula identificada	Bibliografia
1436, 1464, 1506, 2076, 2058, 2166, 2302, 2344	Proteína	Ferner et al. (2015); Jin e Wang (2019); Rushing et al. (2016); Saha et al. (2018); Andueza et al. (2011); Osborne e Fearn (1986), Bertrand (2002)
1430, 1780, 1600, 1800, 2078, 2100, 2110, 2268, 2300	Fibra	Andueza et al. (2011); Osborne e Fearn, (1986); Decruyenaere et al. (2009); Parrini et al. (2022); Saha et al. (2018); Bertrand (2002)
1730, 1764, 2310, 2350	Gordura	Bertrand (2002)

**Fonte:** adaptado de Andueza et al. (2011), Bertrand (2002), Decruyenaere et al. (2009), Ferner et al. (2015); Jin e Wang (2019); Osborne e Fearn (1986), Parrini et al. (2022), Rushing et al. (2016); Saha et al. (2018).

A análise das frações proteicas de plantas forrageiras com a utilização da tecnologia NIRS baseia-se na capacidade dos procedimentos laboratoriais em determinar com precisão esse parâmetro, e na relação significativa existente entre as ligações de amidas, características de componentes proteicos, e espectros da amostra. Todavia, quando algumas frações de proteína apresentam interações entre N e componentes de parede celular ou carboidratos, podem prejudicar a obtenção de modelos preditivos de boa precisão (NIE et al., 2008).

Os compostos nitrogenados relacionados à predição de proteína bruta possuem uma estrutura química bem determinada que facilitam a absorção de luz na região do infravermelho próximo. Ocorre a identificação de ligações assimétricas de primeiro *overtone* de N-H e ligações de segundo *overtone* de N=H em comprimentos de onda de 1436-1464 nm e as ligações de C=O relacionadas a N-H da  $\alpha$ -hélice de moléculas proteicas ocorrem por volta de 2302-2344 nm (FERNER et al., 2015; JIN; WANG, 2019; RUSHING et al., 2016; SAHA et al., 2018). Por essa facilidade de caracterização de moléculas proteicas, os modelos preditivos para esse constituinte nutricional são relatados de forma satisfatória na literatura,

inclusive em trabalhos com forrageiras tropicais no Brasil (FONTANELI et al., 2014; FREITAS et al., 2016; GONTIJO NETO; SIMEONE; GUIMARÃES, 2010; SERAFIM et al., 2021). A predição de componentes químicos como a proteína é de grande importância na nutrição animal, pois ela participa ativamente nos processos metabólicos do animal, sendo que sua deficiência pode comprometer o funcionamento ruminal pela diminuição de proteína microbiana.

O desenvolvimento de modelos de predição da digestibilidade de plantas forrageiras pode ser mais difícil porque essa característica não é constituída de moléculas químicas definidas, e não possui correlação direta com a energia vibracional de moléculas. Além disso, existe grande heterogeneidade das forragens aumentando a variação das equações de calibração (ANDUEZA et al., 2011; ROBERTS; STUTH; FLINN, 2004). Parâmetros que não são caracterizados diretamente na região espectral, como a digestibilidade, muitas vezes determinam uma baixa capacidade da NIRS. Dessa forma, uma boa estimativa por essa metodologia deve identificar sinais diretos das ligações químicas dos espectros representativos do parâmetro (PARRINI et al., 2018). A digestibilidade pode ser identificada com auxílio das predições de proteína e fibra, pois esses constituintes nutricionais atuam diretamente nessa característica da planta. A recuperação de sinais das ligações químicas moleculares de fibra e proteína e a sua caracterização espectral pode ajudar na predição da digestibilidade (ALOMAR et al., 2009). É possível observar que forragens com alta digestibilidade da matéria orgânica apresentam baixa absorbância em regiões do infravermelho próximo ligadas ao conteúdo fibroso (1430 e 1780 nm), enquanto em regiões ligadas aos conteúdos proteicos (1506 e 2076 nm) apresentam uma maior absorbância (ANDUEZA et al., 2011; OSBORNE; FEARN, 1986).

Ao considerar as relações entre  $\log(1/R)$  e várias estimativas de digestibilidade e degradabilidade ruminal, torna-se possível a identificação de duas regiões NIR que representam baixa digestibilidade: 1670-1690 nm e 2240-2290 nm. Esse fato mostra que pode haver zonas espectrais que caracterizam essa digestibilidade (muito baixa e até mesmo, inexistente), sendo que esses valores de absorbância em tais bandas poderiam ser utilizados como possíveis “marcadores espectrais” (LANDAU; GLASSER; DVASH, 2006).

A fração fibrosa das forragens é constituída de uma combinação de moléculas químicas que envolvem variadas regiões espectrais de absorção do infravermelho próximo, podendo assim alterar a relação entre os métodos de referência e os espectros (BROGNA et al., 2018). As avaliações espectrais NIRS e a concentração de lignina dificilmente são diretamente relacionadas, o que faz com que a metodologia de quantificação

desse parâmetro baseie-se em alterações espectrais relacionadas a outros componentes como proteína e fibra, portanto, pode ocorrer imprecisão cumulativa a partir de outras análises (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005). Os picos de absorvância referentes a fibra são identificados nos comprimentos de onda de 1600, 1800, 2078, 2100, 2110, 2268 e 2300 nm (DECRUYENAERE et al., 2009; PARRINI et al., 2022; SAHA et al., 2018). Esses picos são caracterizados quimicamente por açúcar, amido e celulose e suas ligações de C, H e O (BERTRAND, 2002). Moléculas de celulose e hemicelulose são caracterizadas pela presença de ligações de alongamento de C-H, combinações de C-C e estiramento de C-O-O, enquanto as de lignina são oriundas das ligações fenólicas de primeiro *overtone* do alongamento de O-H (LI et al., 2015; LUGASSI et al., 2015; SAHA et al., 2018).

Em relação a digestibilidade da parede celular, a interferência da absorvância residual da água e da absorvância variável das ligações C-H, que ocorrem em muitas regiões espectrais, pode dificultar a interpretação dos espectros NIRS. Pode ocorrer sobreposição da absorção de componentes digeríveis da fibra e outros, como açúcares e amido (NOUSIAINEN et al., 2004). Analisar a fração fibrosa da planta é de extrema importância na nutrição de ruminantes uma vez que esse componente nutricional é intimamente ligado a saúde ruminal e pode ser um limitador de consumo.

A utilização da espectroscopia de infravermelho próximo para predição dos teores de minerais nas forragens, pode ser mais difícil por ocorrer uma subestimação dos resultados. As formas iônicas e salinas existentes na amostra não absorvem a energia na região do infravermelho próximo, sendo que essa absorção se dá por moléculas orgânicas, principalmente de H juntamente com C, O e N (SHENK; WESTERHAUS, 1994). Portanto, desenvolver modelos de predição para os constituintes minerais pode ser bem-sucedido quando ocorre uma associação desses com alguma substância orgânica para tornar a análise satisfatória (ROBERTS; STUTH; FLINN, 2004).

Em geral, a região de absorção da luz infravermelha entre 350 e 780 nm em plantas, ou seja, a região do visível, pode ser associada à presença de pigmentos fotossintetizantes (SCHWANNINGER; RODRIGUES; FACKLER, 2011), enquanto na região NIR associa-se a presença de moléculas de água, carboidratos, proteínas e óleos. Na caracterização de forragens pela tecnologia NIRS, sabe-se que existe uma forte absorção de radiação em picos de absorvância em regiões de 1730, 1764, 2310 e 2350 nm que caracterizam a presença de gorduras; em 2078-2110, 2268 nm caracteriza a presença de fibras; e 2058 e 2166 nm presença de proteína (BERTRAND, 2002).

## 2.7 DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE PREDIÇÃO MULTI-ESPÉCIES PARA AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE PLANTAS FORRAGEIRAS

A maioria dos modelos de predição para determinar a qualidade das plantas forrageiras são desenvolvidos a partir de bancos de dados de espécie-específicos. Porém, há como alternativa o uso de modelos de predição multi-espécies, sendo que esses podem ser utilizados com o intuito de uma maior abrangência em relação ao banco amostral – composto por mais de uma espécie ou gênero forrageiro. A partir dessa otimização de uso, visto que o modelo preditivo pode ser empregado de forma mais ampla para a avaliação da qualidade nutritiva de uma forrageira, deve-se atentar a capacidade preditiva dos mesmos.

Quando um número suficiente de amostras é utilizado, as calibrações desenvolvidas com múltiplas espécies de forragens podem apresentar acurácia semelhantes àquelas desenvolvidas apenas para uma determinada espécie (SHENK; WESTERHAUS, 1993).

Os resultados espécie-específicos são considerados como excelentes (ABREU et al., 2022; KARAYILANLI et al., 2016; SAHA et al., 2018; SERAFIM et al., 2021; YANG et al., 2017; ZHANG et al., 2021), sendo empregados em programas de melhoramento genético e avaliação de espécies amplamente utilizadas na produção animal. Entretanto, na rotina laboratorial pode ser um entrave a aquisição de um número significativo de amostras para uma calibração de espécie única, principalmente quando há uma ampla gama de espécies disponíveis – o que não garante um número amostral suficiente para o desenvolvimento de um modelo. Nessas situações, as calibrações com espécie única podem perder a viabilidade e praticidade (NORMAN et al., 2020).

O emprego de modelos preditivos multi-espécies pode ser uma alternativa para avaliação de forrageiras, com resultados satisfatórios sem perder a capacidade de predição (ANDRÉS et al., 2005; BAATH et al., 2020; CHATAIGNER et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2021; HERNANDEZ et al., 2021; MASSIGNANI et al., 2021; PARRINI et al., 2018, 2019, 2022). A abordagem multi-espécies pode abranger valores muito amplos pois considera-se plantas cultivadas ou manejadas de forma consorciada, solteira ou com difícil distinção entre as plantas existentes, retratando diversas condições de ambiente, estágio de maturidade e manejo (BAATH et al., 2020). Para ambos os tipos de modelos, espécies-específicos ou multi-espécies, é importante que haja muitas amostras distribuídas de maneira uniforme em uma abrangente faixa de concentração (GODIN et al., 2015).

Catunda et al. (2022) demonstraram que a utilização de calibrações amplas

com várias espécies de gramíneas e leguminosas comuns na Austrália (*Biserrula pelecinus*, 139 amostras; *Chloris gayana*, 157 amostras; *Digitaria eriantha*, 300 amostras; *Festuca arundinacea*, 429 amostras; *Lolium perenne*, 92 amostras; *Medicago sativa*, 542 amostras; *Phalaris aquatic*, 332 amostras; *Rytidosperma caespitosum*, 185 amostras; *Themeda triandra*, 417 amostras; e *Trifolium subterraneum*, 29 amostras) foram capazes de prever parâmetros nutricionais como cinzas, proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido. Os autores salientaram que os modelos foram representativos da faixa de variação existente entre as amostras em relação a caracterização nutricional. Dessa forma, concluíram que a atualização e melhora de calibrações são essenciais para monitorar as mudanças na qualidade da forragem.

Norman et al. (2020) analisaram 102 espécies de plantas forrageiras quanto aos teores de FDN, FDA e digestibilidade da MS, configuradas em quatro modelos multi-espécies com diversas condições: 1 – leguminosas anuais (50 espécies); 2 – gramíneas anuais (nove espécies); 3 – mistura de gramíneas e leguminosas perenes (13 e 20 espécies, respectivamente) e 4 – plantas herbáceas (dez espécies). As predições dos grupos 1, 2 e 4 foram melhores do que do grupo 3, e os autores associaram esses resultados às técnicas analíticas de referência. Os autores concluíram que a separação taxonômica das espécies semelhantes para compor os grupos para desenvolvimento dos modelos não aumentou a precisão das predições. Dessa forma, sugeriram que os modelos NIRS multi-espécies podem ser utilizados como ferramentas de análise, por abranger a maior parte das forrageiras cultivadas em monoculturas ou de forma consorciada.

Para avaliar a qualidade nutricional de pastagens naturais da região da Toscana, na Itália, Parrini et al. (2018) desenvolveram modelos multi-espécies de gramíneas e outras plantas herbáceas (*Avena fatua* L, *Capsella bursa pastoris* L, *Dactylis glomerata* L, *Festuca ovina* L, *Festuca pratensis* H, *Holcus lanatus* L, *Lolium perenne* L, *Poa pratensis* L, *Poa annua* L, *Trifolium pratense* L, *Trifolium repens* L, *Ranunculus bulbosus* L, *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers) para os teores de matéria seca, proteína bruta, cinza e fibras. Os resultados encontrados demonstraram que apesar da grande variabilidade do conjunto amostral, foi possível estimar a constituição química das pastagens estudadas com acurácia e precisão.

As calibrações de espécie única são geralmente mais precisas do que as calibrações amplas com várias espécies, sendo que modelos com mais espécies objetivam englobar uma variedade espectral maior. Assim, pode haver uma troca entre a robustez dos modelos (sua capacidade de previsão de atributos das amostras que possuem ampla variabilidade) e a precisão das previsões ao incluir fatores de variação como espécies

diferentes (LANDAU; GLASSER; DVASH, 2006). Essa condição deve ser bem avaliada pelo técnico responsável pela formação do banco amostral e as consequentes calibrações desenvolvidas.

O número de amostras de determinada espécie presente nos conjuntos de calibração e validação, ao representar muitos ambientes, demonstram uma confiança razoável de que os modelos funcionam ou funcionarão adequadamente quando aplicados na rotina (KARAYILANLI et al., 2016). Segundo Parrini et al. (2022) a capacidade de estimar determinada característica pelo NIRS não deve reduzir a precisão do modelo se novas amostras de diferentes colheitas ou origens for avaliada.

A avaliação dos modelos espécie-específicos e multi-espécies deve ser realizada pelas figuras de mérito, para checagem da possibilidade de uso. O desempenho de predição de um modelo multi-espécies deve ser estimado a partir de um conjunto de validação independente com um pequeno conjunto de amostras representativas (independentes em relação a calibração) daquelas que foram previstas. O nível de independência das amostras do conjunto de validação apresenta grande influência nos resultados de desempenho de predição de modelos multi-espécies (GODIN et al., 2015). A validação de dados com muitas variáveis como os oriundos de pastagens, podem ser influenciados por inúmeros fatores e devem ser ajustados previamente para que a aplicabilidade NIRS seja possível na prática (BERAUER et al., 2020).

Por fim, é necessário compreender os aspectos que podem influenciar na qualidade de modelos multi-espécies e sua posterior capacidade preditiva. Estes fatores podem estar ligados ao número de amostras representantes de cada espécie nas etapas de calibração e validação; as variações intrínsecas de cada grupo amostral, abordagens de agrupamento, amostragem e validação dos modelos ao longo do tempo, e também variações no equipamento de medida consequentes a desgaste de tempo e uso. Todos esses fatores devem ser testados e, se possível, corrigidos para originar o melhor desempenho preditivo e o modelo possa ser utilizado na rotina de análise de plantas forrageiras.

### 3 REFERÊNCIAS

- ABREU, J. G. et al. Estimation of *in vitro* digestibility and fermentation of elephant grass by near infrared spectroscopy. **Grassland Science**, p. 1–9, 2022.
- AGELET, L. E.; HURBURGH, C. R. A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 246–260, 2010.
- ALMEIDA, M. T. C. et al. Near-IR spectroscopy predictions can determine the digestibility and feed intake from feedlot lambs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 597–605, 1 mar. 2018.
- ALMEIDA, R. G. et al. Taxas e Métodos de Semeadura para *Brachiaria brizantha* cv. BRS Piatã em Safrinha. **Comunicado Técnico**, Campo Grande. EMBRAPA, 2009. Disponível em: <www.inmet.gov.br>
- ALOMAR, D. et al. Prediction of the composition of fresh pastures by near infrared reflectance or interactance-reflectance spectroscopy. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 69, n. 2, p. 198–206, 2009.
- ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L. *Brachiaria brizantha* cv. Piatã: Gramínea Recomendada para solos bem-drenados do Acre. **Circular Técnica**, Rio Branco. EMBRAPA, 2010.
- ANDRÉS, S. et al. Nutritive evaluation of herbage from permanent meadows by near-infrared reflectance spectroscopy: Prediction of chemical composition and *in vitro* digestibility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 9, p. 1564–1571, 2005.
- ANDUEZA, D. et al. NIRS prediction of the feed value of temperate forages: Efficacy of four calibration strategies. **Animal**, v. 5, n. 7, p. 1002–1013, 2011.
- ARAÚJO, I. M. M. DE et al. Animal Performance with and without Supplements in Mombaça Guinea Grass Pastures during Dry Season. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 7, p. 145, 2017.
- ARAÚJO, E. D. et al. Effects of gibberellic acid on Tifton 85 bermudagrass (*Cynodon* spp.) in constructed wetland systems. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–26, 2018.

ARLOT, S.; CELISSE, A. A survey of cross-validation procedures for model selection. **Statistics Surveys**, v. 4, p. 40–79, 2010.

ASTM E 1655-00. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. **Designation: E 1655 - 00**, 2000.

AVILA, A. S. et al. Tifton 85 bermudagrass (*Cynodon* spp.) silage as a replacement for Tifton 85 hay to feed lactating cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, p. 766–772, 2017.

BAATH, G. S. et al. Predicting forage quality of warm-season legumes by near infrared spectroscopy coupled with machine learning techniques. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 3, 2020.

BARBOSA, M. A. A. DE F. et al. Produção de carne bovina a pasto. *In*: OLIVEIRA, R. L.; BARBOSA, M. A. A. DE F. (Eds.). **Bovinocultura de corte: desafios e tecnologias**. 2 ed. ed. Salvador: EDUFBA, 2014. p. 327–375.

BARROS, J. S. et al. Nutritive value of Xaraés palisade grass in three light intensities. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 5, p. 1703–1711, 2019.

BELLON-MAUREL, V. et al. Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1073–1081, 2010.

BENITES, F. R. G.; SOBRINHO, F. S.; VILELA, D. A contribuição do gênero *Cynodon* para pecuária de leite. *In*: VILELA, D. et al. (Eds.). **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, 2016. p. 147–166.

BERAUER, B. J. et al. Predicting forage quality of species-rich pasture grasslands using vis-NIRS to reveal effects of management intensity and climate change. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 296, 2020.

BERTRAND, D. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. **INRA Productions Animales**, v. 3, p. 209–219, 2002.

BOTELHO, B. G.; DANTAS, K. C. F.; SENA, M. M. Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 167, p. 44–49, 2017.

BRIGHENTI, A. M.; SOUZA SOBRINHO, F.; BENITES, F. R. G. Differential tolerance and selectivity of herbicides in forages of the genus *Cynodon*. **Grassland Science**, v. 66, n. 2, p. 88–94, 2020.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Centering and scaling in component analysis. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 1, p. 16–33, 2003.

BROGNA, N. et al. Technical note: Near infrared reflectance spectroscopy to predict fecal indigestible neutral detergent fiber for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 1234–1239, 2018.

BUONAIUTO, G. et al. The accuracy of NIRS in predicting chemical composition and fibre digestibility of hay-based total mixed rations. **Italian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, p. 1730–1739, 2021.

BURTON, G. W.; GATES, R. N.; HILL, G. M. Registration of ‘Tifton 85’ Bermudagrass. **Crop Science**, v. 33, n. 3, p. 644–645, 1993.

BUXTON, D. R.; REDFEARN, D. D. Plant Limitations to Fiber Digestion and Utilization. **Experimental Biology**, 1996. Disponível em:  
<<https://academic.oup.com/jn/article/127/5/814S/4724072>>

CAIRÓS, C.; COELLO, J.; MASPOCH, S. Application of Representative Layer Theory to Near-Infrared Reflectance Spectra of Powdered Samples. **Applied Spectroscopy**, v. 62, n. 12, p. 1363–1369, 2008.

CANESIN, R. C. et al. Desempenho de bovinos de corte mantidos em pastagem de capim-Marandu submetidos a diferentes estratégias de suplementação no período das águas e da seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 411–420, 2007.

CASTRO, J. J. et al. Brown midrib corn silage and Tifton 85 bermudagrass in rations for early-lactation cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, p. 2143–2152, 2010.

CATUNDA, K. L. M. et al. Near infrared spectroscopy calibration strategies to predict multiple nutritional parameters of pasture species from different functional groups. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 30, n. 5, p. 254–263, 2022.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in

determination of food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 72–83, 2007.

CHAMBELA NETO, A. et al. Pasture quality of *Panicum maximum* cv. Tanzania subjected to different rest periods for milk production. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 40, p. 2173–2182, 2018.

CHATAIGNER, F. et al. Determination of Botanical Composition in Multispecies Forage Mixtures by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. In: **Sustainable use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 199–203.

CUTRIM JUNIOR, J. A. A. et al. Características estruturais do dossel de capim-Tanzânia submetido a três frequências de desfolhação e dois resíduos pós-pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 489–497, 2011.

DA SILVA, S. C.; SBRISSIA, A. F.; PEREIRA, L. E. T. Ecophysiology of C4 Forage Grasses—Understanding Plant Growth for Optimising Their Use and Management. **Agriculture (Switzerland)**, v. 5, n. 3, p. 598–625, 2015.

DE MARCHI, M. et al. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1171–1186, 2014.

DECRUYENAERE, V. et al. Evaluation of green forage intake and digestibility in ruminants using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Developing a global calibration. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, n. 2–4, p. 138–156, 2009.

DEEPA, K. et al. NIRS IN ANIMAL SCIENCES. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 5, n. 2, p. 605–610, 2016.

DHANOVA, M. S. et al. The Link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) Transformations of NIR Spectra. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 2, n. 1, p. 43–47, 1994.

EMBRAPA. Capim Tanzânia-1: uma opção para a diversificação das pastagens. Campo Grande **EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte**, 1990.

ENGEL, J. et al. Breaking with trends in pre-processing? **TrAC - Trends in Analytical**

**Chemistry**, v. 50, p. 96–106, 2013.

ESBENSEN, K. H. Multivariate modeling (X, Y): The Calibration Stage. *In*: GUYOT, D.; WESTAD, F.; HOUMØLLER, L. P. (Eds.). **Multivariate Data Analyses in Practice – An Introduction to Multivariate Data Analyses and Experimental Design**. 5th. ed. Esbjerg: CAMO Software, 2002. p. 115–116.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Produção de forragem e características da estrutura do dossel de cultivares de *Brachiaria brizantha* sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1805–1812, 2008.

FERNANDES, A. M. F. **Uso da espectroscopia de reflectância do infravermelho próximo (NIRS) para previsão da composição bromatológica de vagens de algaroba e palma forrageira**. Dissertação de Mestrado—Sobral: Universidade Estadual Vale do Acaraú, 2015.

FERNER, J. et al. Spectral indicators of forage quality in West Africa's tropical savannas. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 41, p. 99–106, 2015.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 158–164, 2013.

FERREIRA, M. M. C. Análise exploratória dos dados. *In*: FERREIRA, M. M. C. (Ed.). **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, 2015a. p. 107–250.

FERREIRA, M. M. C. Calibração – Métodos de Regressão. *In*: FERREIRA, M. M. C. (Ed.). **Quimiometria – conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2015b. p. 251–358.

FERREIRA, M. M. C. Preparação de dados para análise. *In*: FERREIRA, M. M. C. (Ed.). **Quimiometria – conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, 2015c. p. 43–90.

FLORINDO, J. B. et al. *Brachiaria* species identification using imaging techniques based on

fractal descriptors. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 103, p. 48–54, 2014.

FONTANELI, R. S. et al. Validação do Método da Reflectância no Infravermelho Proximal para Análise de Silagem de Milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 594–598, 2002.

FONTANELI, R. S. et al. Predição da Composição Química de Bermudas (*Cynodon* spp.) pela Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 838–842, 2014.

FREITAS, J. C. et al. Predição do valor nutritivo de gramínea nativa e exótica no pantanal por meio do método de reflectância no infravermelho próximo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 2, p. 251–259, 2016.

GILLON, D.; HOUSSARD, C.; JOFFRE, R. Using near-infrared reflectance spectroscopy to predict carbon, nitrogen and phosphorus content in heterogeneous plant material. **Oecologia**, v. 118, p. 173–182, 1999.

GINDRI, M. **Uso do NIRS como ferramenta de diagnóstico nutricional de ovinos mantidos em pastagem natural**. Dissertação de Mestrado—Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

GODIN, B. et al. Prediction of chemical characteristics of fibrous plant biomasses from their near infrared spectrum: Comparing local versus partial least square models and cross validation versus independent validations. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2015.

GOLDSHLEGER, N.; CHUDNOVSKY, A.; BEN-BINYAMIN, R. Predicting salinity in tomato using soil reflectance spectra. **International Journal of Remote Sensing**, v. 34, n. 17, p. 6079–6093, 2013.

GOMES, R. A. et al. Características anatômicas e morfofisiológicas de lâminas foliares de genótipos de *Panicum maximum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 205–211, 2011.

GONÇALVES, G. D. et al. Produção e valor nutritivo de gramíneas do gênero *Cynodon* em diferentes idades ao corte durante o ano. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p.

1163–1174, 2008.

GONTIJO NETO, M. M.; SIMEONE, M. L. F.; GUIMARÃES, C. C. Predição do teor de proteína bruta em biomassa de capins braquiária por meio de espectroscopia NIR.

**Comunicado Técnico**, Sete Lagoas. EMBRAPA, 2010.

GOULART, R. S. et al. Effects of source and concentration of neutral detergent fiber from roughage in beef cattle diets on feed intake, ingestive behavior, and ruminal kinetics. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 5, 2020.

HALL, M. B. Challenges with nonfiber carbohydrate method. **Journal of Animal Science**. Quebec Animal Science and Dairy Science Joint Annual Meeting, 2003.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; FRIEDMAN, J. **The Elements of Statistical Learning**. 2nd. ed. New York, NY: Springer New York, 2009.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 832–839, 2005.

HEIL, K.; SCHMIDHALTER, U. An evaluation of different NIR-spectral pre-treatments to derive the soil parameters C and N of a humus-clay-rich soil. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1–24, 2021.

HERNÁNDEZ, E. A. et al. Calibraciones de espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano para carbohidratos en pasto *Urochloa*. **Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**, v. 8, n. 2, 2021.

HERNANDEZ, E. A. et al. Espectroscopia de reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para estimar fracciones protéicas en pasto *Urochloa*. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 44, n. 4, p. 781–787, 2021.

HERSCHEL, W. Investigation of the Powers of the Prismatic Colours to Heat and Illuminate Objects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 90, p. 255–283, 1800.

IBGE. **Efetivo de rebanhos, por tipo (cabeças)**, 2020. Pesquisa Da Pecuária Municipal. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

IWAMOTO, B. S. et al. Características morfogênicas do capim Tanzânia fertilizado ou não com nitrogênio nas estações do ano. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 181–193, 2015.

JANK, L. et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132–1137, 2014.

JANK, L.; VALLE, C. B.; RESENDE, R. Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 27-34, 2011.

JIN, J.; WANG, Q. Evaluation of informative bands used in different PLS regressions for estimating leaf biochemical contents from hyperspectral reflectance. **Remote Sensing**, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2019.

KARAYILANLI, E. et al. Botanical composition prediction of alfalfa–grass mixtures using NIRS: Developing a robust calibration. **Crop Science**, v. 56, n. 6, p. 3361–3366, 2016.

KRAGTEN, S. A.; WYSS, U. Les fourrages à la lumière du proche infrarouge (NIRS). **Recherche Agronomique Suisse**, v. 5, n. 5, p. 204–211, 2014.

LANDAU, S.; GLASSER, T.; DVASH, L. Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: A review. **Small Ruminant Research**, v. 61, n. 1, p. 1–11, 2006.

LI, X. et al. Determination of Hemicellulose, Cellulose and Lignin in Moso Bamboo by Near Infrared Spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 5, 25, 2015.

LOBOS, I. et al. Evaluation of potential NIRS to predict pastures nutritive value. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 463–468, 2013.

LOPES, C. M. et al. Massa de forragem, composição morfológica e valor nutritivo de capim-braquiária submetido a níveis de sombreamento e fertilização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 225–233, 2017.

LOPES, F. C. F. et al. Composição química e digestibilidade ruminal *in situ* da forragem de quatro espécies do gênero *Brachiaria*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 883–888, 2010.

LOPES, M. N. et al. Biomass flow in Massai grass fertilized with nitrogen under intermittent

stocking grazing with sheep. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 1, p. 13–21, 2013.

LUGASSI, R. et al. Spectral slope as an indicator of pasture quality. **Remote Sensing**, v. 7, n. 1, p. 256–274, 2015.

MAGALHÃES, J. A. et al. Bromatologic composition the Marandu grass under effect of different irrigation and nitrogen fertilization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 933–942, 2015.

MANLEY, M. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 24, p. 8200–8214, 2014.

MARTENS, H.; JENSEN, S. A.; GELADI, P. Multivariate linearity transformations for near infrared reflectance spectroscopy. **United States Patent**, Stavanger, 1983.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate Calibration**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1992.

MASSIGNANI, C. et al. A single calibration of near-infrared spectroscopy to determine the quality of forage for multiple species. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e548101018990, 2021.

MAZABEL, J. et al. Using near infrared reflectance spectroscopy for estimating nutritional quality of *Brachiaria humidicola* in breeding selections. **Agrosystems, Geosciences and Environment**, v. 3, n. 1, 2020.

MCPARLAND, S.; BERRY, D. P. The potential of Fourier transform infrared spectroscopy of milk samples to predict energy intake and efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 4056–4070, 2016.

MELQUIADES, F. L. et al. Direct determination of sugar cane quality parameters by X-ray spectrometry and multivariate analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 43, p. 10755–10761, 2012.

MERTENS, D. R. Regulation of Forage Intake. *In*: FAHEY, G. C.; COLLINS, M.; MERTENS, D. R. (Eds.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Lincoln: American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc., 1994. p. 450–493.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 6, p. 1217–40, 2002.

MILLMIER, A. et al. Near-infrared sensing of manure nutrients. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 43, n. 4, p. 903–908, 2000.

MINSON, D. J. Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. *In*: HACKER, J. B. (Ed.). **Nutritional limits to animal production from pasture**. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1982. p. 167–182.

MINSON, D. J. **Forage in Ruminant Nutrition**. San Diego: Elsevier, 1990.

MONRROY, M. et al. Determination of *Brachiaria* spp. forage quality by near-infrared spectroscopy and partial least squares regression. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 62, n. 2, p. 3472–3477, 2017.

MUÑIZ, G. I. B. et al. Fundamentos e estado da arte da espectroscopia no infravermelho próximo no setor florestal. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 4, p. 865–875, 2012.

NIE, Z. et al. Hot Topic: Application of support vector machine method in prediction of alfalfa protein fractions by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2361–2369, 2008.

NORMAN, H. C. et al. Broad NIRS calibrations to predict nutritional value of the southern feedbase. **Proceedings of the 17th ASA Conference**, 2015.

NORMAN, H. C. et al. Broad near-infrared spectroscopy calibrations can predict the nutritional value of >100 forage species within the Australian feedbase. **Animal Production Science**, v. 60, n. 8, p. 1111–1122, 2020.

NOUSIAINEN, J. et al. Prediction of indigestible cell wall fraction of grass silage by near infrared reflectance spectroscopy. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, n. 3–4, p. 295–311, 2004.

NUNES, S. G. et al. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Campo Grande: EMBRAPA - CNPCG**, 1984. v. Documento 21

NUSSIO, L. G.; MANZANO, R. P.; PEDREIRA, C. G. S. Valor alimentício em plantas do gênero *Cynodon*. Simpósio sobre manejo de pastagem. **Anais...**Piracicaba: FEALQ/ESALQ, 1998.

OLIVEIRA, D. M. **Análise de forragens por espectroscopia no infravermelho próximo, espectroscopia de emissão óptica em plasma induzido por laser e fusão de dados.** Dissertação de Mestrado—Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2017.

OLIVEIRA, D. A. DE et al. Valor nutritivo do capim-braquiária no primeiro ano de recuperação com aplicações de nitrogênio e enxofre. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 716–726, 2010.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T. **Near infrared spectroscopy in food analysis.** [s.l.] Longman Scientific and Technical, 1986.

OZAKI, Y. Near-Infrared Spectroscopy—Its Versatility in Analytical Chemistry. **Analytical Sciences**, v. 28, p. 545–563, 2012.

PACIULLO, D. S. C. et al. Morphogenesis, biomass and nutritive value of *Panicum maximum* under different shade levels and fertilizer nitrogen rates. **Grass and Forage Science**, v. 72, n. 3, p. 590–600, 1 set. 2016.

PARRINI, S. et al. Use of FT-NIRS for determination of chemical components and nutritional value of natural pasture. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 1, p. 87–91, 2018.

PARRINI, S. et al. Near Infrared Spectroscopy technology for prediction of chemical composition of natural fresh pastures. **Journal of Applied Animal Research**, v. 47, n. 1, p. 514–520, 2019.

PARRINI, S. et al. Can grassland chemical quality be quantified using transform near-infrared spectroscopy? **Animals**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2022.

PASIKATAN, M. C. et al. Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 9, p. 153–164, 2001.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal Brazilian of Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PEDREIRA, C. G. S. Gênero *Cynodon*. In: FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. (Eds.). **Plantas forrageiras**. Viçosa: Editora UFV, 2010. p. 78–130.

PEREIRA, R. C. et al. Produtividade, composição químico-bromatológica e extração de minerais das cultivares Marandu e Xaraés nas estações do ano. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 570–582, 2011.

PINHEIRO, A. A. et al. Produção e valor nutritivo da forragem, e desempenho de bovinos Nelore em pastagem de capim-Tanzânia adubado com nitrogênio ou consorciado com estilosantes Campo Grande. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2147–2158, 2014.

PIRES, W. **Manual de pastagem: formação, manejo e recuperação**. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2006.

RAFFRENATO, E. et al. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on in vitro and in vivo neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 8119–8131, 2017.

REIS, R. A. et al. Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica. In: REIS, R. A. et al. (Eds.). **Volúmosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2005. p. 187–238.

REIS, R. A.; PAVEZZI BARBERO, R.; HOFFMANN, A. Impactos da qualidade da forragem em sistemas de produção de bovinos de corte. **Informe Agropecuário**, v. 37, n. 292, p. 36–53, 2016.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. (Eds.). *Brachiaria: Biology, agronomy and improvement*. Campo Grande: CIAT, 1996. p. 1–15.

RIBEIRO, A. F. et al. Chemical composition, *in vitro* digestibility and gas production of *Brachiaria* managed under different forage allowances. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 1, p. 36–43, 2014.

RINNAN, Å.; BERG, F. VAN DEN; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v.

28, n. 10, p. 1201–1222, 2009.

ROBERTS, C. A.; STUTH, J.; FLINN, P. Analysis of Forages and Feedstuffs. *In*: ROBERTS, C. A.; WORKMAN JR, J.; REEVES III, J. B. (Eds.). **Near-infrared spectroscopy in agriculture**. [s.l.]. 2004. p. 231–267.

RUGGIERI, A. C. et al. Grazing intensity impacts on herbage mass, sward structure, greenhouse gas emissions, and animal performance: analysis of *Brachiaria* pastureland. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1–19, 2020.

RUSHING, J. B. et al. Analysis of Some Important Forage Quality Attributes of Southeastern Wildrye (*Elymus glabriflorus*) Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 07, n. 09, p. 642–662, 2016.

SÁ, J. et al. Fracionamento de carboidratos e proteínas de gramíneas tropicais cortadas em três idades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 667–676, 2010.

SAHA, U. et al. Analysis of Various Quality Attributes of Sunflower and Soybean Plants by Near Infrared Reflectance Spectroscopy: Development and Validation Calibration Models. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 08, n. 07, p. 462–492, 2017.

SAHA, U. et al. Near-infrared spectroscopic models for analysis of winter pea (*Pisum sativum* L.) quality constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4253–4267, 2018.

SANTOS, F. R. et al. Evaluation of pre-processing and variable selection on energy dispersive X-ray fluorescence spectral data with partial least square regression: A case of study for soil organic carbon prediction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 175, p. 106016, 2021.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

SCHWANNINGER, M.; RODRIGUES, J. C.; FACKLER, K. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 19, n. 5, p. 287–308, 2011.

SEFARA, N. L.; CONRADIE, D.; TURNER, P. Progress in the use of near-infrared absorption spectroscopy as a tool for the rapid determination of pulp yield in plantation eucalypts. **Tappsa Journal**, v. 53, n. 11, p. 15–17, 2000.

SERAFIM, C. C. et al. Use of near-infrared spectroscopy for prediction of chemical composition of Tifton 85 grass. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 1287–1302, 2021.

SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O. Near Infrared Reflectance Analysis with Single and Multiproduct Calibrations. **Crop Science**, v. 33, n. 3, p. 582–584, 1993.

SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O. The application of near infrared spectroscopy (NIRS) to forage analysis. *In*: FAHEY JR., G. C. (Ed.). **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Madison: 1994. p. 406–449.

SHENK, J. S.; WORKMAN, J. J. J.; WESTERHAUS, M. O. Application of NIR to Agricultural Products in Handbook of Near-Infrared Analysis. *In*: BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. (Eds.). **Handbook of Near-Infrared Analysis**. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 419–474.

SIESLER, H. W. Basic Principles of Near-Infrared Spectroscopy. *In*: BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. (Eds.). **Handbook of Near-Infrared Analysis**. 3rd edition ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 13–27.

SIESLER, H. W.; OZAKI, Y. **Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications**. 1st. ed. Weinheim: Wiley – VCH, 2002.

SIMIONI, T. A. et al. Senescência, remoção, translocação de nutrientes e valor nutritivo em gramíneas tropicais. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 8, n. 13, p. 1–53, 2014.

SIMONI, M. et al. The use of visible/near-infrared spectroscopy to predict fibre fractions, fibre-bound nitrogen and total-tract apparent nutrients digestibility in beef cattle diets and faeces. **Italian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, p. 814–825, 2021.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. [s.l.] Cengage, 2006.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de

componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SOUZA, D. M.; MADARI, B. E.; GUIMARÃES, F. F. Aplicação de técnicas multivariadas e inteligência artificial na análise de espectros de infravermelho para determinação de matéria orgânica em amostras de solos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1738–1745, 2012.

SOUZA, A. M. DE et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.

STARK, E.; LUCHTER, K. NIR Instrumentation Technology. **NIR News**, v. 16, n. 7, p. 13–16, 1 nov. 2005.

STONE, M. Cross-Validatory Choice and Assessment of Statistical Predictions. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 36, n. 2, p. 111–147, 1974.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6a edição ed. [s.l.] Artmed, 2017.

TIECHER, D. D. et al. Morfogênese e estrutura do Tifton 85 cultivado em clima subtropical e adubado com nitrogênio. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 38, n. 4, p. 389–393, 2016.

TRAN, H. et al. “Global” and “local” predictions of dairy diet nutritional quality using near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4961–4975, 2010.

TSUZUKIBASHI, D. et al. Anatomia quantitativa, digestibilidade in vitro e composição química de cultivares de *Brachiaria brizantha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 46–53, mar. 2016.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Variable selection, outlier detection, and figures of merit estimation in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8331–8338, 2007.

VALLE, C. B. et al. *Brachiaria brizantha* cv. Piatã: uma forrageira para diversificação de pastagens tropicais. **Seed News**, v. 11, n. 2, p. 28–30, 2007.

VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 142, 2006.

VAN KEMPEN, T.; JACKSON, D. NIRS may provide rapid evaluation of amino acids. **Feedstuffs**, v. 12, p. 12–15, 1996.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119–128, 1967.

VAN SOEST, P. J. Cell Wall Matrix Interactions and Degradation-Session Synopsis. *In*: JUNG, H. G. et al. (Eds.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison: John Wiley & Sons, Ltda, 1993. p. 377–395.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2nd. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994a.

VAN SOEST, P. J. Fiber and Physicochemical Properties of Feeds. *In*: **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2nd edition ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994b. p. 140–155.

VELÁSQUEZ, P. A. T. et al. Composição química, fracionamento de carboidratos e proteínas e digestibilidade *in vitro* de forrageiras tropicais em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1206–1213, 2010.

VIANA, M. C. M. et al. Production and nutrition of irrigated Tanzania guinea grass in response to nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 5, p. 238–243, 2014.

VISCARRA ROSSEL, R. A. ParLeS: Software for chemometric analysis of spectroscopic data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 90, n. 1, p. 72–83, 2008.

VRANIC, M. et al. Prediction of chemical composition from semi-natural grassland by NIR spectroscopy. **Agriculture Conspectus Scientificus**, v. 81, n. 1, p. 35–41, 2016.

WANG, H. Q. et al. The influence of spectral characteristics on the accuracy of concentration quantitatively analysis by near infrared spectroscopy. **Infrared Physics and Technology**, v. 94, p. 96–101, 2018.

WEISS, C. P. et al. Effects of roughage inclusion and particle size on digestion and ruminal fermentation characteristics of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 4, p. 1707–1714, 2017.

WIEDEMAIR, V. et al. Investigations into the performance of a novel pocket-sized near-infrared spectrometer for cheese analysis. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 428, 2019.

WILLIAMS, P. Sampling, Sample Preparation, and Sample Selection. *In*: BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. (Eds.). **Handbook of Near-Infrared Analysis**. 3rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 267–298.

WILLIAMS, P. The RPD Statistic: A Tutorial Note. **NIR News**, v. 25, n. 1, p. 22–26, 2014.

WILLIAMS, P.; ANTONISZYN, J.; MANLEY, M. Statistical terms for evaluation of accuracy and precision. *In*: **Near-infrared Technology: Getting the best out of light**. 1. ed. [s.l.] AFRICAN SUN MeDIA, 2019.

WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. Comparison of Commercial Near Infrared Transmittance and Reflectance Instruments for Analysis of Whole Grains and Seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, n. 1, p. 25–32, 1993.

WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near-infrared calibrations. *In*: DAVIES, A. M. C.; WILLIAMS P. L. (Eds.). **Near infrared spectroscopy: the future waves**. Chichester: NIR Publications, 1996. p. 185–188.

WILLIAMS, P.; DARDENNE, P.; FLINN, P. Tutorial: Items to be included in a report on a near infrared spectroscopy project. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 25, n. 2, p. 85–90, 2017.

WILSON, J. R. Organization of Forage Plant Tissues. *In*: JUNG, H. G. et al. (Eds.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., 2015. p. 1–32.

WOLD, H. Soft Modelling by Latent Variables: The Non-Linear Iterative Partial Least Squares (NIPALS) Approach. **Journal of Applied Probability**, v. 12, n. S1, p. 117–142, 1975.

WORKMAN, JR., J.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. 1st edition ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

YANG, Z. et al. Development and validation of near-infrared spectroscopy for the prediction of forage quality parameters in *Lolium multiflorum*. **PeerJ**, v. 5, n. 10, p. 3867, 2017.

ZHANG, G. J. et al. Comparison of two *in situ* reference methods to estimate indigestible NDF by near infrared reflectance spectroscopy in alfalfa. **Heliyon**, v. 7, n. 6, 2021.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) para caracterizar nutricionalmente gramíneas tropicais dos gêneros *Urochloa*, *Cynodon* e *Megathyrsus*, a partir do desenvolvimento e validação de modelos de predição para avaliação de seus componentes bromatológicos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e validar modelos de predição específicos para avaliação nutricional de *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.

Desenvolver e validar modelos de predição multi-espécies para a avaliação nutricional de *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*.

Testar a validação espécie-específica dos modelos multi-espécies para verificar possíveis predições equivocadas em relação as diferentes espécies estudadas.

Validar os modelos de predição multi-espécies de forma espécie-específica.



## **5 ARTIGO A – REDIGIDO SEGUNDO AS NORMAS DA REVISTA GRASSLAND SCIENCE PARA SUBMISSÃO**

**Espectroscopia NIR: desenvolvimento de modelos de predição de atributos químicos e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de *Megathyrus maximus* cv.**

**Tanzânia**

**NIR spectroscopy: development of predictive models of chemical attributes and *in vitro* dry matter digestibility of *Megathyrus maximus* cv. Tanzania**

### **Resumo**

O uso de pastagens na produção animal é amplamente empregada e está condicionada a vários fatores que influenciam essa produção. A composição nutricional da planta forrageira pode ser alterada por condições de solo, sazonalidade, maturidade e morfologia da planta, entre outros, o que demonstra a importância de se monitorar sua qualidade através de análises químicas. Para otimizar esse tipo de análise e agilizar a tomada de decisão dos pecuaristas e técnicos, a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) é uma ferramenta que vem sendo aplicada com sucesso. Esta pesquisa objetivou desenvolver modelos preditivos de componentes químicos de *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia por meio da espectroscopia NIR. As determinações laboratoriais de cinzas, proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) de 345 amostras de forragem foram utilizadas como dados de referência, e correlacionados com os espectros NIRS. Para a calibração dos modelos foram aplicadas a análise de componentes principais e a regressão por mínimos quadrados parciais. Os resultados indicaram que os modelos de predição dos parâmetros estudados, apresentaram

coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual ou maior que 0,90; taxa de desvio preditivo residual (RPD) acima de 3,0; razão de intervalo de erro (RER) maiores que 12; valores de erros médios quadráticos próximos entre calibração e validação; e número ótimo de variáveis latentes (VL) entre sete e oito para calibração dos modelos. Para a predição de PB e DIVMS as regiões de maior contribuição simultânea foram de 1414, 1996 e 2384 nm; enquanto para FDN e FDA foram de 1714, 1784, 1786, 2160, 2320 e 2450 nm. O sucesso no desenvolvimento dos modelos preditivos pela espectroscopia NIR para avaliação da digestibilidade da matéria seca e os principais atributos químicos de *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia mostra que a qualidade dos modelos elaborados no presente estudo torna possível o seu emprego alternativo na rotina de análise laboratorial de forma rápida, segura e com acurácia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Composição química, gramínea tropical, nutrição animal de precisão, quimiometria.

### **Abstract**

The use of pastures in animal production is widely used and is conditioned to several factors that influence this production. The nutritional composition of the forage plant can be altered by soil conditions, seasonality, plant maturity and morphology, among others, which demonstrates the importance of monitoring its quality through chemical analysis. To optimize this type of analysis and speed up decision-making by farmers and technicians, the use of near-infrared spectroscopy (NIRS) is a tool that has been successfully applied. This research aimed to develop predictive models of chemical components of *Megathyrus maximus* cv. Tanzania using NIR spectroscopy. Laboratory determinations of ash, crude protein (CP), *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD),

neutral detergent fiber (NDF) and acid (ADF) of 345 forage samples were used as reference data and correlated with the NIRS spectra. To calibrate the models, principal component analysis and partial least squares regression were applied. The results indicated that the prediction models of the studied parameters presented a coefficient of determination ( $R^2$ ) equal to or greater than 0.90; residual predictive deviation rate (RPD) greater than 3.0; error interval ratio (RER) greater than 12; close mean square error values between calibration and validation; and optimal number of latent variables (LV) between seven and eight for model calibration. For the prediction of CP and IVDMD, the regions with the highest simultaneous contribution were 1414, 1996 and 2384 nm; while for NDF and ADF were 1714, 1784, 1786, 2160, 2320 and 2450 nm. The success in the development of predictive models by NIR spectroscopy to evaluate the dry matter digestibility and the main chemical attributes of *Megathyrsus maximus* cv. Tanzania shows that the quality of the models developed in the present study makes it possible to use them alternatively in routine laboratory analysis in a quick, reliable, and accurate way.

**KEYWORDS:** Biochemical composition, chemometrics, precision animal nutrition, tropical grass.

## 1 | INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira é uma atividade composta em sua maior parte por bovinos mantidos em sistema de pastejo, sendo o Brasil o maior produtor de carne bovina do mundo e detentor do maior rebanho com 218.150.298 cabeças (IBGE, 2020). Nessas circunstâncias, as forrageiras tropicais como as do gênero *Urochloa* e *Megathyrsus* são as mais cultivadas devido a sua maior adaptabilidade aos solos e clima brasileiros.

O capim Tanzânia é uma das cultivares de *Megathyrsus maximus* mais plantadas no país em decorrência das suas características favoráveis para a produção animal. Dentre essas vantagens pode-se citar a alta produção de matéria seca, alto valor nutritivo e boa resposta à adubação nitrogenada (Paciullo et al., 2017).

Devido ao fato de as características da planta como constituinte da dieta do animal estar intimamente relacionada ao valor da carne produzida, é de extrema importância monitorar toda e qualquer alteração em relação a qualidade nutritiva das pastagens.

O acompanhamento da qualidade da forragem oferecida é essencial para a determinação correta do manejo. Para se determinar os diferentes parâmetros quantitativos que caracterizam a planta conforme sua qualidade nutricional como proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido e digestibilidade *in vitro* da matéria seca, normalmente se faz o uso de técnicas analíticas físico-químicas clássicas (AOAC International, 2000; Detmann et al., 2012; Tilley & Terry, 1963). Essas análises são demoradas e dispendiosas principalmente quando é necessária a análise de muitas amostras (Baath et al., 2020; Lugassi et al., 2015). Com maior intervalo entre a coleta amostral e o retorno de informações pertinentes aos resultados das análises ao produtor, a sua tomada de decisão pode ser afetada negativamente. Dessa forma, busca-se cada vez mais agilizar esse processo e aliado a isso, utilizar técnicas que sejam sustentáveis, sem o uso e descarte de reagentes. Nesse sentido, a espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) é uma alternativa viável para a avaliação de plantas forrageiras, sendo essas gramíneas ou leguminosas (Baath et al., 2020; Lobos et al., 2013; Serafim et al., 2021). A tecnologia NIRS se enquadra como uma ferramenta da Nutrição animal de precisão por ser apurada e ecologicamente correta. Esse é um sistema ambientado para aperfeiçoar as informações sobre demanda e fornecimento de nutrientes aos animais

para que esses obtenham sua melhor performance, originando lucratividade, qualidade de produto e efeitos ambientais almejados (Gonzalez et al., 2018; Silva et al., 2022).

A análise da qualidade nutricional de uma forragem pela espectroscopia NIR é rápida, barata e possibilita uma rápida tomada de decisão em relação aos intervalos de pastejo (Baath et al., 2020), por exemplo. O prazo entre o recebimento de uma amostra e a retirada do laudo com resultados de proteína e fibra, por exemplo, pode ser de dois a três dias úteis quando se utiliza a tecnologia NIRS, enquanto esse mesmo procedimento para a análise convencional de uma amostra, pode levar de 10 a 15 dias úteis.

Essa técnica tem sido utilizada para avaliação da qualidade de forragem e alimentos para os animais de produção. Entretanto, pastagens nativas ou cultivadas possuem muitos fatores de variabilidade como espécie, sazonalidade, local de cultivo, estágio de maturidade e outros, que podem representar pontos positivos e negativos na estimativa feita pela NIRS (Parrini et al., 2022).

A metodologia NIRS promove a relação entre a interação da reflectância de luz difusa em comprimentos de onda de 750 a 2500 nm que caracteriza a região do infravermelho próximo, e as moléculas químicas presentes na composição da forragem (Rushing et al., 2016). A absorção/reflexão de cada comprimento de onda específico retrata a existência e abundância dos grupos intrínsecos ligados aos compostos orgânicos das amostras (Saha et al., 2018). Para a interpretação dos dados a partir desse processo são aplicados métodos estatísticos de regressão multivariada, ou seja, combina-se a quimiometria com a espectroscopia.

Em nível prático, para que a espectroscopia NIR seja difundida e cada vez mais utilizada na produção animal é necessário que sejam medidos bancos de dados representativos das pastagens utilizadas, para que o desenvolvimento dos modelos de

predição possa ser executado e conseqüentemente, aplicados na rotina laboratorial e até mesmo de campo.

O objetivo deste estudo foi desenvolver modelos de predição com a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo para a quantificação de parâmetros nutricionais (proteína bruta, cinzas, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim *Megathyrsus maximus* cultivar Tanzânia, para o monitoramento da qualidade da dieta de forma rápida, segura e com acurácia.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 | Coleta e preparo das amostras e análises químicas pelas metodologias de referência

As amostras de *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia foram obtidas em uma propriedade no noroeste do estado do Paraná, Brasil, cultivadas em solo de arenito. O período de coleta compreendeu de dezembro de 2013 a maio de 2014 e a amostragem foi realizada a cada 28 dias (totalizando 5 coletas), representando diferentes estádios de maturidade. Inicialmente foram coletadas 230 amostras de planta inteira (PI), das quais 115 amostras foram submetidas a separação morfológica resultando em 115 subamostras de lâmina foliar (LF) e 115 subamostras de colmo+bainha (CB). Dessa forma, o banco de dados total constituiu-se de 345 amostras, sendo: 115 amostras de LF, 115 amostras de CB e 115 de PI. Com o fracionamento da amostra, a variabilidade do banco de dados aumenta, o que pode incrementar o modelo de calibração. Todo o material foi pré-seco em estufa de circulação forçada a 60 °C durante 72 horas, e posteriormente as amostras foram moídas a 1 mm.

Para execução das análises químicas de referência, as amostras pré-secas e moídas

foram submetidas a secagem definitiva a 105° C para obtenção do teor de matéria seca (MS, método 930.15; AOAC *International*, 2000) e em seguida, foram determinados os teores de cinzas por combustão em mufla a 550 °C durante 4 horas (cinzas, método 923.03) e proteína bruta (PB) pelo princípio de Kjeldahl (PB, método 990.03) segundo metodologias de AOAC *International* (2000). A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi executada conforme metodologia de incubação em dois estágios, desenvolvida por Tilley & Terry (1963). As frações fibrosas, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), foram determinadas conforme metodologias descritas por Detmann et al. (2012), utilizando-se, respectivamente, os métodos INCT-CA F-002/1 e INCT-CA F004/1, de forma sequencial de determinação de FDN e FDA nas amostras.

Para cada amostra do conjunto de dados (345 amostras), o procedimento de análise química de referência foi realizado em duplicata, e dessa maneira, foi utilizada a média de cada uma ao final. Os resultados obtidos foram apresentados na base da MS.

## 2.2 | Obtenção dos espectros

As amostras de capim Tanzânia pré-secas em estufa de circulação forçada a 60° C e moídas a 1 mm foram homogeneizadas e acondicionadas em cubetas de quartzo, e posteriormente escaneadas em espectrômetro VIS-NIR (*Foss NIRSystems XDS*; Silver Spring, MD, USA), com banda de reflectância entre 400 e 2500 nanômetros (nm). Os dados espectrais foram obtidos por reflectância (R), os quais foram modificados em absorbância (A) por intermédio da equação  $A = \log(1/R)$ . Para o desenvolvimento dos modelos de calibração e validação, utilizou-se a faixa espectral de 1100 a 2500 nm, que compreende a região do infravermelho próximo.

### 2.3 | Análise estatística – descritiva e quimiométricas

A análise descritiva dos dados foi realizada, sendo calculados os valores de desvio-padrão, valor mínimo, médio, máximo e coeficiente de variação. Dessa forma foi possível observar a composição e variabilidade do banco de dados estudado.

O gráfico de espectros médios brutos foi gerado a partir dos valores de comprimento de onda (nm) obtidos na leitura de cada amostra escaneada, e utilizando a média dos valores de cada grupo de amostras estudado (planta inteira, lâmina foliar, colmo+bainha).

Em relação as análises quimiométricas, foram utilizados a Análise de componentes principais (PCA) e Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), ambas executadas pelo *software The Unscrambler X* (Camo Software ASA, Oslo, Norway).

A PCA é uma técnica que visa a redução da dimensionalidade dos dados estudados com o objetivo de manter as relações originais entre as amostras (M. M. C. Ferreira, 2015). No presente estudo, a PCA foi aplicada para construção dos gráficos demonstrativos – de *scores* e *loadings* (biplot). No gráfico de *scores* é possível visualizar as associações de semelhança entre as amostras e no de *loadings*, verifica-se quais as variáveis que mais favorecem o posicionamento dos grupos apresentados no gráfico de *scores*. A interpretação desses dois indicadores permite identificar aquelas variáveis que melhor representam as diferenças verificadas entre as amostras (Souza & Poppi, 2012).

Os dados espectrais utilizados na PCA foram pré-processados com centragem na média, enquanto os dados bromatológicos foram submetidos ao auto escalamento pelo desvio-padrão. A centragem na média implica em calcular o valor médio de cada coluna da matriz de dados e em seguida, subtrai-se esse valor de cada um dos valores da

respectiva coluna dos dados utilizados, dada pela equação , na qual amostra  $i$ , uma medida  $j$  realizada para todas  $i$  amostras e representa a média da coluna. A centragem na média é empregada para destacar a variação relevante entre as amostras. No auto escalamento é feita a divisão de todas as variáveis pelo seu desvio-padrão após as mesmas serem centradas na média, pela equação , na qual amostra  $i$ , uma medida  $j$  realizada para todas  $i$  amostras e representa a média da coluna, e  $s$  o desvio padrão da coluna. O auto escalamento é utilizado quando as variáveis são expressas em grandezas diferentes ou existe grande variação de dados (Bro & Smilde, 2003; Van den Berg et al., 2006).

O algoritmo de Kennard-Stone foi aplicado nos dados espectrais para a separação dos dados de calibração e validação para o desenvolvimento dos modelos. Esse algoritmo utiliza-se da distância entre as amostras da matriz  $X$  (espectros NIRS) selecionando aquelas que apresentem a maior representatividade (Kennard & Stone, 1969). No processo de separação foi designado que dois terços (230 amostras) do total das amostras fossem utilizadas para a etapa de calibração e o terço restante (115 amostras), para a validação externa. Dessa forma, o banco amostral utilizado para validação ou teste dos modelos de calibração é considerado externo à primeira etapa do procedimento, ou seja, validação externa.

Com a finalidade de aprimorar a relação linear entre os espectros e a técnica de referência (De Marchi et al., 2014), antes de executar a calibração propriamente dita, os espectros foram submetidos a uma transformação de dados para correção da linha de base com a utilização da 1ª derivada pelo método de Savitzky-Golay (SG), sendo essa uma forma de corrigir possíveis problemas como deslocamento vertical ou inclinação do espectro, melhorando sua resolução (Engel et al., 2013; Rinnan et al., 2009). No

presente estudo foram empregadas as combinações de SG 129 e SG 1215, sendo que o primeiro dígito representa a 1ª derivada, o segundo dígito caracteriza o grau polinomial e o terceiro e quarto dígito (quando existente), o intervalo de alisamento (Savitzky & Golay, 1964).

Para a calibração dos modelos de predição da qualidade química de capim Tanzânia foi utilizado o método de Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). A PLS é utilizada para desenvolver uma correlação quantitativa entre os valores da matriz  $\mathbf{X}$  (espectros NIRS) e um vetor  $\mathbf{y}$  (dados das análises de referência) (Geladi & Kowalski, 1986; Shenk & Westerhaus, 1991).

Na avaliação dos modelos de calibração e de validação externa, foram utilizados parâmetros estatísticos chamados de figuras de mérito.

A raiz quadrada do erro médio (RMSE) é um indicador de ajuste dos modelos desenvolvidos na calibração, utilizado para determinar o número ótimo de variáveis latentes (VL) utilizado na PLS (RMSEC) (Buonaiuto et al., 2021; Parrini et al., 2019). O número adequado de variáveis latentes de um modelo avalia sua eficácia e pode evitar superajuste (*overfitting*), que é quando se modela com excesso de ruído (Agelet & Hurburgh, 2010; P. Williams et al., 2017). A raiz quadrada do erro médio de predição (RMSEP) é um parâmetro robusto estimado a partir de amostras de validação externa (M. H. Ferreira et al., 2013). As figuras de mérito citadas são definidas pelas equações 1 e 2, a seguir:

#### **Equação (1) Equação (2)**

Na equação 1,  $y_i$  são os valores de referência e os valores estimados da amostra  $i$  no conjunto de calibração, respectivamente;  $n_c$  é o número de amostras do banco de calibração,  $l$  é o número de graus de liberdade. Na equação 2,  $y_i$  são os valores

medidos e preditos da amostra  $i$  no conjunto de predição e o  $n_p$  é o número de amostras do conjunto de predição.

Para verificar a linearidade dos modelos, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi utilizado na calibração ( $R^2_c$ ) e na validação ( $R^2_v$ ); esse parâmetro indica a proporção da variabilidade nos dados medidos (de referência) contidos na equação de regressão (Landau et al., 2006; Parrini et al., 2022; Tran et al., 2010). O  $R^2$  é calculado como na equação 3, em que  $y_i$  e  $\hat{y}_i$  são os valores medidos e preditos da amostra  $i$  no conjunto de calibração ou predição, o  $n$  é o número amostral e o  $\bar{y}$  é a média do método de referência para todas as amostras nos conjuntos de calibração e validação.

### Equação (3)

A razão de intervalo de erro (RER) de um modelo auxilia no monitoramento de sua utilidade prática, e é definido pela razão da amplitude do conjunto de dados e o valor de RMSEC ou RMSEP (P. C. Williams & Sobering, 1996), sendo calculada para calibração (RER<sub>c</sub>) e para validação (RER<sub>v</sub>), pela equação 4 a seguir:

### Equação (4)

Na equação,  $y_{max}$  representa o valor máximo do conjunto amostral de calibração ou predição e  $y_{min}$ , o valor mínimo do mesmo banco – sendo considerados os valores obtidos pelos métodos de referência.

Valores de RER acima de 8 pode indicar um modelo capaz de prever dados quantitativos (Millmier et al., 2000).

Para a etapa de validação, mais duas figuras de mérito foram consideradas para avaliação dos modelos, o desvio preditivo residual (RPD) e o erro sistemático (*Bias*). O RPD propicia uma comparação da aplicabilidade de um modelo em conjuntos de dados distintos e da sua capacidade preditiva com a utilização de dados desconhecidos, em relação a variabilidade inicial do banco de calibração. Esse parâmetro é calculado pela

razão do desvio-padrão amostral e o valor de RMSEC ou RMSEP (Agelet & Hurburgh, 2010; P. Williams, 2014; P. C. Williams & Sobering, 1993). O RPD é uma marca de robustez dos modelos preditivos (Lobos et al., 2013), e é definido pela equação 5, a seguir:

#### Equação (5)

Na equação,  $DP_{pred}$  é o desvio-padrão amostral dos valores obtidos pelo método convencional, do conjunto de predição.

O *Bias* ou erro sistemático é definido como a diferença entre o valor observado e o valor predito, dividido pelo número de amostras no banco de validação, definido pela equação 6:

#### Equação (6)

Na equação,  $\bar{y}_{ref}$  representa os valores determinados pelos métodos de referência e  $\bar{y}_{pred}$  representa os valores preditos, ambos do conjunto amostral de predição; e o  $n_p$  é o número de amostras do mesmo conjunto.

Um valor positivo de *Bias* pode indicar um modelo superestimado, enquanto um valor negativo, um modelo subestimado (Heil & Schmidhalter, 2021). Esse parâmetro pode ser um indicativo de acurácia do modelo desenvolvido (Tran et al., 2010).

Ainda para a avaliação de cada modelo desenvolvido foi utilizada a função *Important variables* disponível no *software The Unscrambler*. A partir dessa ferramenta foi possível identificar os comprimentos de onda e regiões espectrais (nm) que mais caracterizaram cada modelos de calibração obtido.

As amostras consideradas como *outliers* foram retiradas no momento do desenvolvimento dos modelos de calibração e validação, para cada atributo químico avaliado. Foi considerado o valor do resíduo para detecção e retirada de *outliers*:

quando uma amostra apresentou diferença entre seu valor medido e sua estimativa de até três vezes maior que o RMSEC/RMSEP do modelo, essa foi excluída (M. H. Ferreira et al., 2013). No presente estudo foi utilizado o limite de resíduo de duas vezes maior que o RMSEC/RMSEP para a exclusão dos *outliers*. Dessa forma, o banco de calibração foi composto de 217 amostras para os modelos de PB, FDN e FDA; 218 amostras para modelo de cinzas e 219 amostras para o modelo de DIVMS. Seguindo o mesmo procedimento, o banco de validação foi composto de 103 amostras para o modelo de DIVMS; 107 amostras para o modelo de FDN e FDA; 108 amostras para o modelo de cinzas e 109 amostras para o modelo de PB.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 | Análises químicas pelos métodos de referência

A composição química e a digestibilidade *in vitro* da MS do capim *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia estão apresentadas na Tabela 1. A Figura 1A e 1B corroboram com a interpretação dos parâmetros descritivos, por permitir a visualização da dinâmica dos nutrientes em relação aos resultados dos dados de referência. Foi observada a variabilidade dos dados principalmente em relação aos teores de cinzas e a DIVMS, que apresentaram valores de CV acima de 10%. Para calibrações pela NIRS é desejável que haja amplitude de valores com um banco amostral diverso entre as suas características intrínsecas, para que as mais diferentes amostras possam ser analisadas futuramente com considerada acurácia. A ampla variação existente baseada na análise laboratorial de referência fornece abrangência considerável para o desenvolvimento de modelos preditivos, sendo um fator de importância para precisão e robustez (De Marchi et al., 2014, 2018; Lobos et al., 2013; Pittman et al., 2016; Wiedemair et al., 2019).

**Tabela 1.** Parâmetros descritivos dos atributos químicos e digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados por metodologia de referência (em porcentagem da matéria seca) do capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.

	Mínimo (%)	Média (%)	Máximo (%)	DP (%)	CV (%)
Cinzas (%)	6,3	8,9	12,9	1,3	14,2
PB (%)	4,3	11,2	16,6	3,2	28,6
DIVMS (%)	51,2	64,9	73,7	4,8	5,6
FDN (%)	62,1	70,0	80,5	3,9	9,2
FDA (%)	34,8	41,5	51,9	3,8	7,3

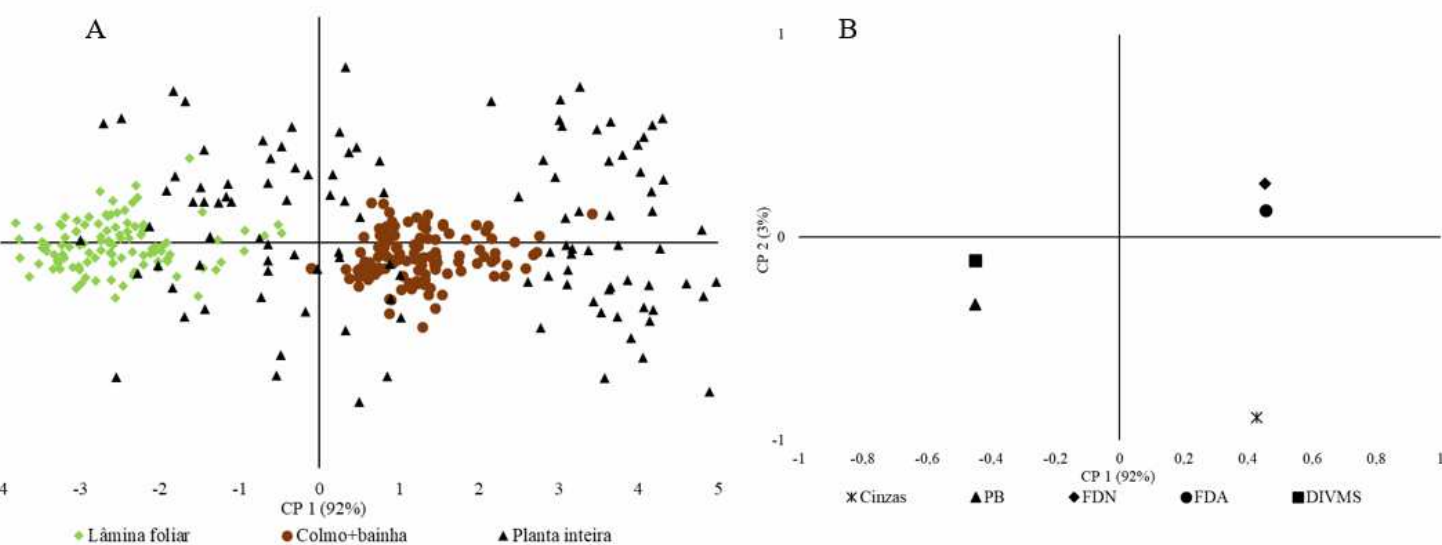
Abreviações: PB, proteína bruta; DIVMS, digestibilidade da matéria seca; FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; DP, desvio-padrão; CV, coeficiente de variação.

O capim Tanzânia é um dos tipos de forrageira mais utilizado na produção de animais a pasto devido a sua alta qualidade nutricional e alto rendimento de matéria seca (Paciullo et al., 2017), o que demanda uma constante avaliação em relação ao seu valor nutritivo e, justifica a utilização da tecnologia NIRS para a análise da qualidade dessa forragem.

É importante salientar que no presente estudo foram utilizadas diferentes partes da mesma planta e de diferentes idades no momento da coleta formando um *pool* de amostras heterogêneas, sendo lâmina foliar e colmo+bainha, juntamente com a planta inteira de capim Tanzânia, submetidas às análises químicas e obtenção dos espectros. Dessa forma, é possível justificar os valores como de PB por exemplo, sendo que na dinâmica de acúmulo de nutrientes é sabido que há maior concentração desse nutriente na folha do que no colmo individualmente. Logo, esse valor é possivelmente diluído

quando se analisa a planta inteira, mostrando assim essa amplitude entre 4,3 e 16,6%.

A análise de componentes principais dos dados bromatológicos permitiu uma melhor visualização da dinâmica dos resultados das análises de referência, ilustrando agrupamentos distintos de componente morfológico (Figura 1A). Essa distribuição decorre principalmente dos resultados de composição química de cada atributo avaliado, o que pode ser observado juntamente com os *loadings* da PCA (Figura 1B). No eixo da PC1 no sentido positivo, observou-se maior influência das variáveis nutricionais FDN e FDA que estão intimamente relacionadas com a composição de colmo+bainha. Em contrapartida, na direção negativa de PC1 estão agrupadas as amostras de lâmina foliar estreitamente ligadas aos teores de PB e DIVMS, que podem caracterizar uma melhor qualidade desse componente morfológico.



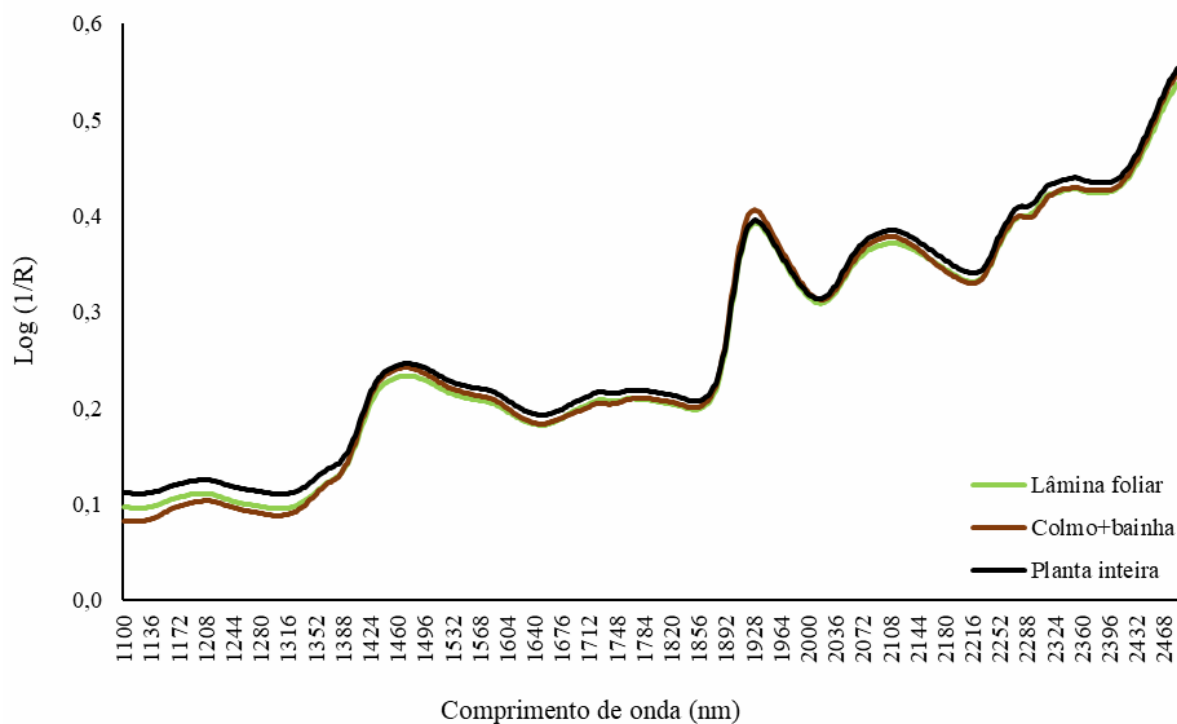
**Figura 1.** **A)** Representação espacial dos resultados bromatológicos (*Scores*) de capim *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia a partir da análise de componentes principais (PCA). **B)** *Loadings* dos atributos nutricionais e digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

Outro aspecto observado na Figura 1A é a formação de dois grupos distintos

representados pelas amostras de PI, mostrando que houve possivelmente, efeitos de diferentes coletas realizadas no experimento, ou seja, em diferentes estádios de maturidade, sobre a composição bromatológica. A variabilidade originada de um banco com condições como as citadas acima favorece a calibração de modelos NIRS.

### 3.2 | Análise por espectroscopia NIR

A identificação das bandas de absorvância características das ligações químicas encontradas na leitura dos espectros de capim Tanzânia foi realizada pelo gráfico de espectros médios, apresentado na Figura 2. A sobreposição dos espectros médios das 345 amostras na maior extensão dos comprimentos de onda pode ser devido ao fato de que são amostras de uma mesma população (Saha et al., 2018). Essa característica demonstra a homogeneidade do banco amostral em relação a morfologia dos espectros de capim Tanzânia, mesmo com diferentes níveis de absorvância entre as amostras, ressaltando a possibilidade de uso e sucesso de um modelo com diferentes constituintes morfológicos da planta.

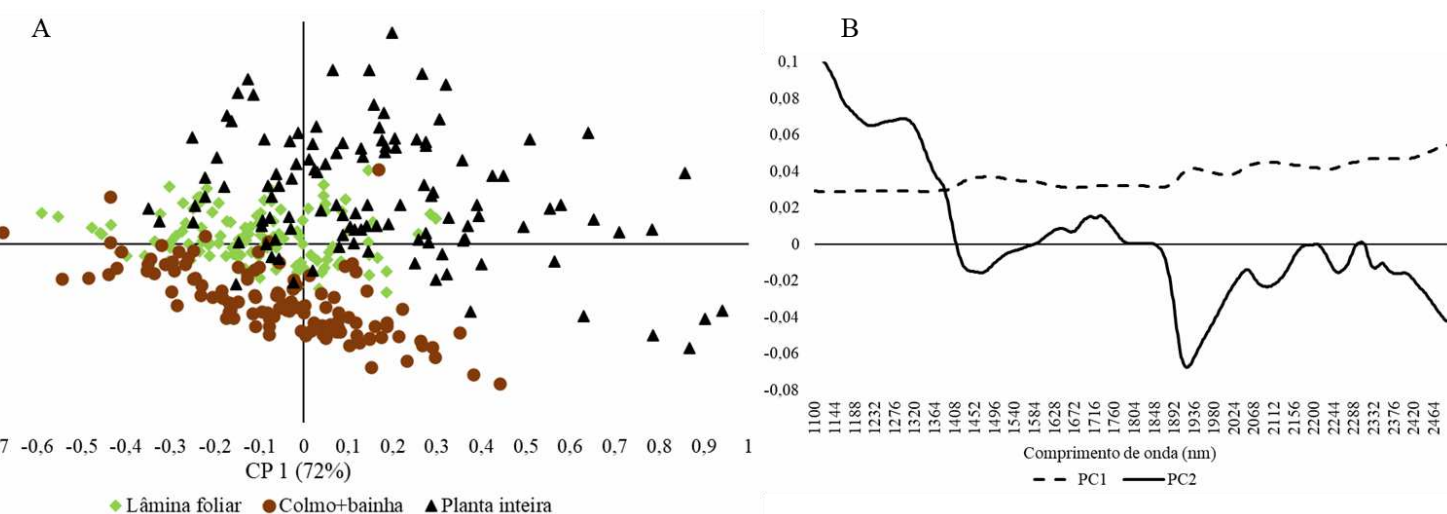


**Figura 2.** Representação gráfica dos espectros médios brutos do conjunto amostral analisado de capim *Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia.

Os maiores valores de absorbância foram encontrados em bandas por volta de 1442–1480, 1898–1936, 2088–2126, 2354 e 2468 nm, caracterizando as diferentes regiões de absorção de luz infravermelha, relacionadas com a presença de ligações vibracionais moleculares. Essas regiões são marcantes pela presença de grupos de moléculas de O-H, N-H e C-H (P. C. Williams, 2020). A presença de proteína em amostras vegetais é amplamente determinada pela NIRS, de forma acurada, devido as ligações de N-H serem bem delimitadas como na região de 1450, 1900 e perto de 2304 nm (Manley, 2014; Saha et al., 2018), enquanto a parte final do espectro NIR próxima de 2488 nm pode ser relacionada com presença de ligações características de celulose (Saha et al., 2018). Bandas de absorbância relacionadas a matriz mineral podem ser identificadas na região de 1100 a 1400 (Windham et al., 1991), enquanto ligações de

estiramento de primeiro *overtone* de água podem ser detectadas por volta de 1400 e 1900 nm (Saha et al., 2018).

Ao executar a análise de componentes principais (PCA) dos espectros de amostras de capim Tanzânia, ilustrada na Figura 3A, observou-se que a componente principal 1 (PC1) e a componente principal 2 (PC2) foram responsáveis por explicitar 93% da variabilidade do banco amostral estudado – PC1 de 72% e PC2 de 21%. A PC1 evidenciou a homogeneidade da morfologia espectral do conjunto de amostras estudado sem apresentar formação de grupos, retratando o que foi visto no gráfico de espectros médios com sobreposição independente do componente morfológico, a partir de 1400 nm (Figura 2) – reforçando a viabilidade de um modelo desenvolvido com lâmina foliar, colmo+bainha e planta inteira.



**Figura 3.** **A)** Representação gráfica e espacial das amostras espectrais (*Scores*) de capim *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia a partir da análise de componentes principais (PCA). **B)** *Loadings* de componentes principais 1 e 2 do conjunto de dados estudado.

Na PC2 foi possível observar uma tendência de agrupamento referente às distintas partes do capim Tanzânia, sendo que essas diferenças foram marcantes na parte inicial

do espectro (1100 a 1400 nm). Esse comportamento pode ser visualizado no gráfico de espectros médios (Figura 2) e também nos *loadings* da PC2 (Figura 3B). Os *loadings* da PC2 são complementares aos da PC1, apresentando informações residuais da primeira componente principal.

### 3.3 | Regressão multivariada dos dados

Os resultados da etapa de calibração dos modelos de predição da qualidade de capim Tanzânia são apresentados na Tabela 2, demonstrando o sucesso desse processo. Para todos os parâmetros obtidos foram identificados valores como  $R^2$  maior que 0,80 e RER maior que 10. Na validação foi possível testar os modelos de calibração e confirmar sua utilidade prática, pois verificou-se que todos os valores de  $R^2$  foram maiores que 0,90; RPD acima de 3; RER maiores que 12 e *Bias* próximos de zero. Os valores de erro médio quadrático (RMSE) apresentaram resultados semelhantes entre calibração e validação, e o número máximo de VLs utilizadas foi de oito, evitando um possível *overfitting*.

**Tabela 2.** Resultados dos parâmetros de avaliação dos modelos de calibração e validação externa da caracterização química do capim *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia.

	CALIBRAÇÃO						VALIDAÇÃO					
	Pré- tratamento matemático	n	VL	RMSEC (%)	$R^2c$	RERc	n	RMSEP (%)	$R^2v$	RERv	RPD	<i>Bias</i>
Cinzas (%)	SG129	218	8	0,5	0,85	11,7	108	0,4	0,90	12,7	3,1	0,1
PB (%)	SG129	217	7	0,8	0,92	14,2	109	1,0	0,91	12,3	3,5	-0,3
DIVMS (%)	SG1215	219	8	1,4	0,90	13,6	103	1,1	0,94	18,5	4,4	-0,3
FDN (%)	SG129	217	8	1,0	0,92	17,0	107	0,9	0,94	15,8	4,5	0,3
FDA(%)	SG129	217	8	1,1	0,91	14,0	107	0,9	0,94	15,2	3,8	0,2

Abreviações: PB, proteína bruta; DIVMS, digestibilidade *in vitro* da matéria seca; FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; n, número de amostras; VL, variável latente; RMSEC, raiz quadrada do erro médio

de calibração; RMSEP, raiz quadrada do erro médio de predição;  $R^2$ , coeficiente de determinação da calibração ( $R^2_c$ ) e da validação ( $R^2_v$ ); RER, razão de intervalo de erro da calibração (RER<sub>c</sub>) e da validação (RER<sub>v</sub>); RPD, desvio preditivo residual; *Bias*, erro sistemático; Pré-tratamentos matemáticos SG 129: Savitzky-Golay 1ª derivada, 2º grau polinomial, 9 pontos de alisamento; SG 1215: Savitzky-Golay 1ª derivada, 2º grau polinomial, 15 pontos de alisamento.

A RMSE das etapas de calibração e validação (RMSEC e RMSEP, respectivamente) pode ser uma medida de ajuste de modelos (Buonaiuto et al., 2021). Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que os erros médios quadráticos apresentados permitiram um bom ajuste, com valores próximos de RMSEC e RMSEP.

O número ótimo de VLs utilizado variou entre sete e oito e permitiu a modelagem dos dados sem embutir ruído ou causar perda de informações relevantes para os modelos, comprovando sua eficácia. Esse fato faz com que o uso desses para predições futuras seja considerado acurado (Agelet & Hurburgh, 2010). O número de VLs foi escolhido com auxílio do menor valor obtido para RMSEC e que conseqüentemente originou um menor valor de RMSEP, sendo esse último parâmetro, conforme sugerido por Buonaiuto et al. (2021). A RMSEP é um dos mais robustos por ser estimado a partir de amostras externas ao banco de calibração (M. H. Ferreira et al., 2013).

A qualificação de um modelo de predição com auxílio do  $R^2$  permite checar a proporção da variância explicada em relação a variável resposta nos bancos de dados de calibração e validação (Parrini et al., 2022), além da resposta linear presente nos gráficos de valores predito *versus* referência (Figura 4). Tran et al. (2010) sugeriram que modelos com  $R^2$  maior que 0,80 possuem boa qualidade e valores acima de 0,90, qualidade excelente. Diante dos resultados de  $R^2$  os modelos de calibração e de validação para a qualidade do capim Tanzânia, exceto para cinzas, podem ser considerados excelentes.

Valores de RER de modelos de predição desenvolvidos pela NIRS pode ser um indicativo da sua utilidade prática (P. C. Williams & Sobering, 1996), e ser dividido em

duas faixas de classificação. Valores de RER entre 4 e 8 indicam uma alternativa para distinção de valores altos e baixos; valores de RER entre 8 e 12 sinalizam positivamente para a possibilidade de predição de dados quantitativos (Millmier et al., 2000). Considerando essa classificação, os valores obtidos no presente estudo (Tabela 3) podem ser utilizados na rotina prática para análise da qualidade química do capim Tanzânia.

Na etapa de validação, os valores de RPD indicam a capacidade preditiva do modelo pela sua aplicabilidade em conjuntos de dados distintos do banco inicial de calibração (Agelet & Hurburgh, 2010). Na literatura diversos valores limítrofes já foram relatados, tais como, Goldshleger et al. (2013) que sugeriram valores maiores que 2,0 a 2,5 para uma boa predição quantitativa, enquanto Williams & Sobering (1993), recomendaram um valor mínimo de 2,5. Porém, uma classificação mais ajustada foi proposta por P. Williams (2014) ao relatar que esse parâmetro estatístico para forragens pode conter seis faixas de variação. Valores de RPD de 0,0 a 1,9 foram desconsiderados para uso; entre 2,0 e 2,4 foram indicados para uma triagem aproximada; 2,5 a 2,9 foram sugeridos para triagem propriamente dita; 3,0 a 3,4 foram classificados como bons e para controle de qualidade; 3,5 a 4,0 foram considerados como muito bons e para controle de processo; e valores maiores que 4,1 foram considerados excelentes e propostos para qualquer aplicação para o material em questão. Em relação aos resultados encontrados no presente estudo para a exceto os valores encontrados para RPD cinzas (3,1), todos foram considerados como muito bons (PB e FDA) ou excelentes (DIVMS e FDN). Altos valores de RPD indicam modelos de predição mais acurados (Heil & Schmidhalter, 2021).

O erro sistemático de um modelo ou *Bias* descreve a acurácia do modelo na sua

validação, sendo que valores baixos desse parâmetro podem indicar confiabilidade (Rushing et al., 2016; Tran et al., 2010). Ao testar os modelos desenvolvidos com um banco externo ao da calibração é esperado que valores diferentes de zero sejam encontrados para *Bias* (Wiedemair et al., 2019), o que foi constatado nesse trabalho quando os resultados obtidos variaram de -0,3 a 0,3. Essa pequena faixa de variação não é suficiente para subestimar ou superestimar um modelo, como sugerido por Heil & Schmidhalter (2021), ou seja, não é considerada a presença de um erro sistemático.

Na avaliação de cada modelo desenvolvido, com o uso da ferramenta de *Important variables* disponível no *software The Unscrambler* foi possível identificar os comprimentos de onda (nm) que mais caracterizaram cada modelo de calibração (Tabela 3). A maior parte dos parâmetros estudados foram identificados em uma combinação de bandas de comprimento de onda (nm).

**Tabela 3.** Intervalos de comprimentos de onda de importância para o desenvolvimento de cada modelo de calibração da caracterização química do capim *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia, pelo gráfico de *Weighted regression coefficients*.

	Pré-tratamento matemático	Comprimento de onda (nm)
Cinzas (%)	SG129	1474-1476, 1712, 1756-1758, 1784-1786, 1876, 1868-1970, 2054-2058, 2160, 2292-2294, 2320, 2450
PB (%)	SG129	1338-1340, 1400-1402, 1414-1416, 1526-1528, 1660-1662, 1992-1996, 2124, 2228-2230, 2256-2258, 2308, 2380-2384

DIVMS (%)	SG1215	1176-1180, 1326-1328, 1410-1414, 1530-1534, 1640-1642, 1686, 1846-1848, 1876, 1994-1996, 2220-2222, 2260-2262, 2304-2306, 2382-2384
FDN (%)	SG129	1222, 1352, 1714, 1784-1786, 1898, 2034, 2160, 2286, 2320-2322, 2436, 2450
FDA (%)	SG129	1220, 1714, 1760-1762, 1784-1786, 1904, 2050-2052, 2160, 2202, 2288-2290, 2320, 2438, 2450-2454

Abreviações: PB, proteína bruta; DIVMS, digestibilidade *in vitro* da matéria seca; FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; Pré-tratamentos matemáticos SG 129: Savitzky-Golay 1ª derivada, 2º grau polinomial, 9 pontos de alisamento; SG 1215: Savitzky-Golay 1ª derivada, 2º grau polinomial, 15 pontos de alisamento.

Para o desenvolvimento de modelos de predição de PB e DIVMS, faixas espectrais de 1992 a 1996 nm e em 2380 a 2384 nm se assemelharam, o que demonstrou a correlação entre a proteína bruta, que é um representante do conteúdo celular da planta, com a digestibilidade da matéria seca da mesma, sendo que a matéria seca é a porção na qual os nutrientes estão concentrados. A repetição de bandas espectrais também ocorreu nos comprimentos de onda específicos de 1714, 2160, 2320 e 2450 nm e na faixa espectral de 1784 e 1786 nm para FDN e FDA. A fração fibrosa representada pelo resíduo de FDN é composta por celulose, hemicelulose e lignina e intimamente correlacionada com aquela representada pelo FDA, que é composta por celulose e lignina (Van Soest et al., 1991), e como foram caracterizadas em pontos simultâneos do espectro infravermelho, foi possível confirmar essa correlação encontrada na análise do capim Tanzânia. A relação entre PB e DIVMS e FDN e FDA pôde ser evidenciada na Figura 2 com a proximidade dos *loadings* representativos desses componentes da planta.

O modelo de validação do conteúdo de cinzas apresentou resultado excelente (RMSEP = 0,4; R<sup>2</sup> = 0,90; RPD = 3,1; RER = 12,7; Bias = 0,1), o que pode ser relacionado com a identificação pela radiação infravermelha dos complexos da matriz inorgânica com as moléculas orgânicas presentes nas plantas. A formação desses

complexos é relevante para a utilização da metodologia NIRS na análise do conteúdo mineral, pois esse pode ser subestimado devido à ausência de absorção de energia na região do infravermelho próximo quando há apenas formas salinas e iônicas de componentes minerais (Shenk & Westerhaus, 1994; Smith et al., 2020).

No que se refere ao modelo desenvolvido para a validação de PB do capim Tanzânia, os resultados obtidos ( $RMSEP = 1,0$ ;  $R^2 = 0,91$ ;  $RPD = 3,5$ ;  $RER = 12,3$ ;  $Bias = -0,3$ ) comprovam a eficiência da metodologia NIRS em estimar esse nutriente na planta, pois a proteína bruta é um composto nitrogenado com estrutura química bem delimitada (Broгна et al., 2018), o que facilita a absorção da luz infravermelha. Regiões de absorbância de ligações características facilitam a correlação com o método de análise, principalmente devido às ligações de N-H que envolvem estiramentos de primeiro *overtone* de proteína em região de 1436 a 1464 nm, bem como C = O ligado ao N-H da  $\alpha$ -hélice das proteínas próximo de 2302 a 2344 nm (Saha et al., 2018). Esse fato facilita a obtenção de modelos confiáveis e que podem ser utilizados como alternativa para a análise de componentes proteicos em forragens tropicais. A análise de proteína bruta é de interesse para a nutrição de ruminantes devido ao fato de que dietas ou alimentos com níveis menores que 7% de PB acarretam redução da atividade microbiana ruminal, ou seja, não há suprimento da exigência proteica para a manutenção do animal, o que resulta em perda de peso do mesmo (Pinheiro et al., 2014).

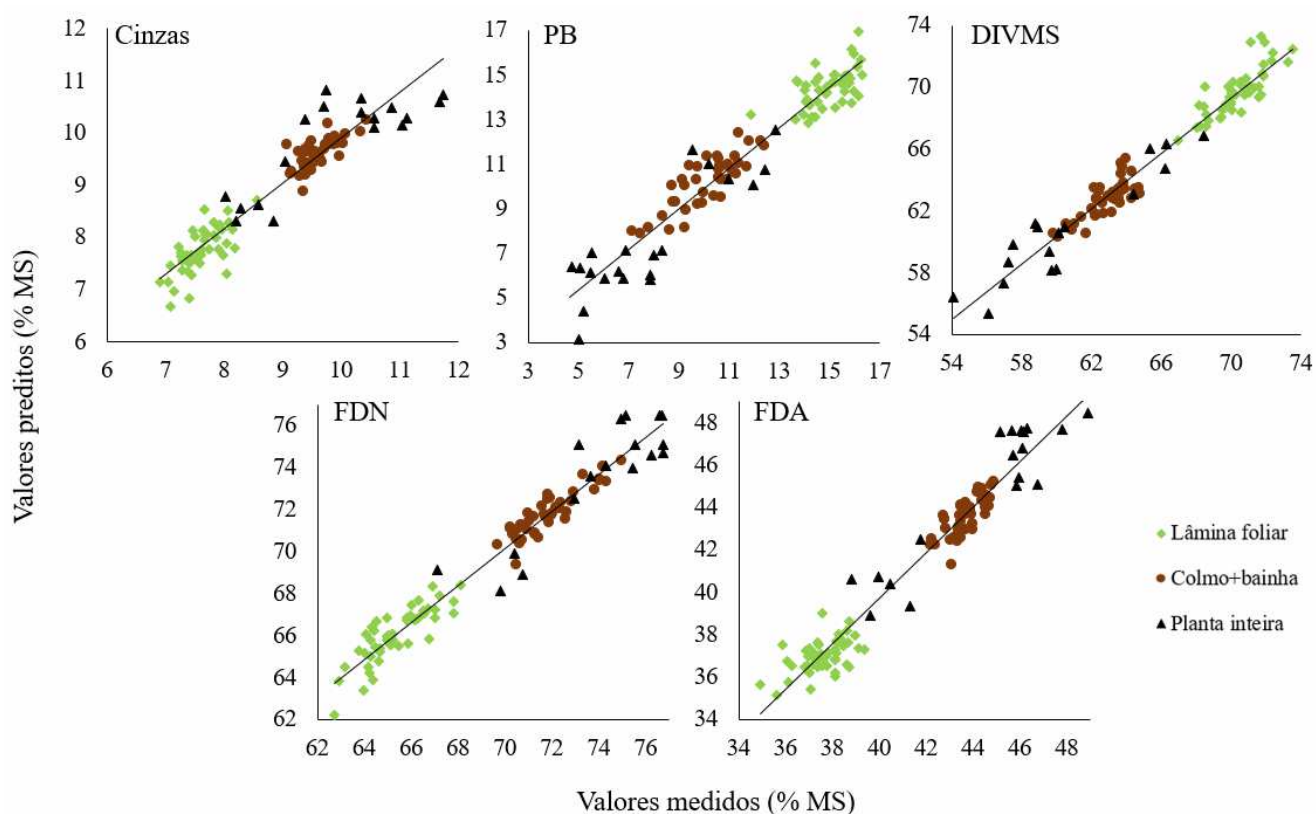
Ao considerar o modelo de validação da DIVMS do capim Tanzânia ( $RMSEP = 1,1$ ;  $R^2 = 0,94$ ;  $RPD = 4,4$ ;  $RER = 18,5$ ;  $Bias = -0,3$ ), os resultados excelentes obtidos podem estar ligados aos de proteína e fibra, sendo que é importante salientar que essas frações interferem na digestibilidade da planta. Portanto, é possível prever a DIVMS mesmo que não haja relação direta da energia vibracional molecular identificada pela

espectroscopia NIR devido a sua ligação com a composição química da planta como um todo (Roberts et al., 2004). É possível relacionar a predição de características complexas como a digestibilidade com a recuperação de indícios das ligações químicas relacionadas a essas, como também pela observação da configuração dos dados apresentados graficamente (Figura 4) (Alomar et al., 2009). A observação da configuração dos dados amostrais entre PB e DIVMS enfatizou essa relação no presente estudo. O desenvolvimento de modelos de predição para a digestibilidade de uma planta forrageira acelera o processo de conhecimento de um dos aspectos do seu valor nutritivo, com o intuito de fornecer informações rápidas sobre a qualidade do tecido vegetal fornecido aos animais.

A modelagem da fração fibrosa foi realizada com sucesso obtendo-se excelentes modelos de validação para FDN (RMSEP = 0,9;  $R^2 = 0,94$ ; RPD = 4,5; RER = 15,8; *Bias* = 0,3) e FDA (RMSEP = 0,9;  $R^2 = 0,94$ ; RPD = 3,8; RER = 15,2; *Bias* = 0,2). Validações bem-sucedidas para componentes fibrosos podem estar correlacionadas à identificação de ligações de estiramento de C-O-O, alongamento de C-H e combinação de C-C, todas características de celulose presentes nos resíduos de FDN e FDA (Saha et al., 2018). O monitoramento da qualidade da fibra alimentar de dietas para ruminantes tem suma importância devido ao papel indispensável que esse componente tem para o funcionamento ruminal, manutenção de pH e prevenção de problemas digestivos, evitando impacto negativo no desempenho animal (Goulart et al., 2020; Weiss et al., 2017). Diante do exposto, modelos de predição desenvolvidos pela NIRS para a fração fibrosa do alimento otimiza a tomada de decisão do produtor para possíveis implementações de manejo nutricional e conseqüentemente, melhora a cadeia produtiva.

Os gráficos de dispersão da etapa de validação estão apresentados na Figura 4 e

ilustram os valores preditos *versus* referência em relação a linha de tendência, no qual foi possível visualizar a relação linear dos teores preditos e determinados pelos diferentes métodos utilizados. Ao observar a disposição das amostras no processo de validação dos modelos de predição para PB e DIVMS, nos gráficos (Figura 4), percebeu-se que os dados estão mais alinhados, explicitando os valores de  $R^2$  de 0,91 e 0,94 para cada nutriente, respectivamente. A interpretação de um gráfico de dispersão que relaciona valores preditos e valores obtidos pelas análises químicas de referência deve identificar os dados amostrais em distribuição uniforme em relação a linha de tendência, permanecendo incluídos nos limites de confiança observados para os parâmetros descritos (Fekadu et al., 2010).



**Figura 4.** Representação gráfica da etapa de validação dos modelos desenvolvidos para a caracterização química do capim *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia.

O aspecto fisiológico também pôde ser evidenciado demonstrando a dinâmica de acúmulo de nutrientes no tecido vegetal. As amostras de lâmina foliar apresentaram maiores teores de PB (componente do conteúdo celular) e maior DIVMS, e menores teores de FDN e FDA (componentes de parede celular), o que evidencia a melhor qualidade dessa porção da planta. A porção de colmo+bainha apresentou valores intermediários dos nutrientes estudados, enquanto a planta inteira apresentou distribuição mais heterogênea, representando o seu valor nutricional e as diferentes coletas realizadas para obtenção das amostras, ou seja, diferentes estádios de maturidade. Essas observações foram feitas também ao analisar os *loadings* (Figura 1B) da PCA bromatológica, que demonstraram a maior influência de PB e DIVMS bem como sua interdependência na composição química de lâmina foliar e amostras de planta inteira. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Serafim et al. (2021), que observaram que a composição de capim Tifton 85 (*Cynodon* spp.) apresentou a mesma dinâmica com maiores teores de PB e maior DIVMS da lâmina foliar, demonstrando uma característica comum de plantas forrageiras tropicais.

Um aspecto importante a ser observado e que foi constatado na Figura 4, é o preenchimento em relação a linha de tendência interligado ao tipo de amostra. Ao observar os grupos compostos por lâmina foliar e colmo+bainha formaram-se dois grupos de dados com um *gap* entre eles, sendo esse preenchido pelas amostras de planta inteira. Conseqüentemente, evidenciou-se a importância da inclusão dessas últimas amostras no banco de dados para que os modelos desenvolvidos fossem capazes de prever amostras futuras, principalmente em nível prático. Essa é uma importante informação obtida visto que na maioria das vezes, o material encaminhado para análise bromatológica é coletado pelo produtor e constituído de planta inteira. Além disso, um

melhor preenchimento do gráfico sem qualquer *gap* amostral representa um modelo mais confiável em relação ao seu uso prático, justamente pela maior quantidade e qualidade de informação obtida, representadas pelos parâmetros estatísticos anteriormente abordados.

Fundamentado nos resultados apresentados, o uso da espectroscopia de infravermelho próximo aplicado a nutrição animal apresentou potencial de uso como alternativa as análises químicas convencionais, uma vez que a partir de modelos desenvolvidos com sucesso, cada vez menos se usaria a análise química de referência para conhecer a estrutura química das plantas forrageiras. O ponto chave para otimizar cada vez mais a utilização dessa tecnologia é a inclusão periódica de amostras desconhecidas para atualização e maior abrangência do banco amostral.

#### 4 | CONCLUSÕES

A espectroscopia de infravermelho próximo apresenta acurácia e confiabilidade para a avaliação dos principais atributos químicos de *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia. Os modelos de calibração e validação desenvolvidos para cinzas, proteína bruta, frações fibrosas e digestibilidade *in vitro* da matéria seca são capazes de predizer a qualidade nutricional da forrageira, podendo ser aplicados em sistemas de produção a pasto, auxiliando o produtor na rápida tomada de decisão em relação a suplementação da dieta utilizada na alimentação animal.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida a autora, ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Agelet, L. E., & Hurburgh, C. R. (2010). A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(4), 246–260. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515468>
- Alomar, D., Fuchslocher, R., Cuevas, J., Mardones, R., & Cuevas, E. (2009). Prediction of the composition of fresh pastures by near infrared reflectance or interactance-reflectance spectroscopy. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(2), 198–206.
- AOAC International. (2000). *Official Methods of Analysis* (W. Horwitz & G. W. Latimer, Eds.; 18th ed.). AOAC INTERNATIONAL.
- Baath, G. S., Baath, H. K., Gowda, P. H., Thomas, J. P., Northup, B. K., Rao, S. C., & Singh, H. (2020). Predicting forage quality of warm-season legumes by near infrared spectroscopy coupled with machine learning techniques. *Sensors*, 20(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/s20030867>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2003). Centering and scaling in component analysis. *Journal of Chemometrics*, 17(1), 16–33. <https://doi.org/10.1002/cem.773>
- Brogna, N., Palmonari, A., Canestrari, G., Mammi, L., Dal Prà, A., & Formigoni, A. (2018). Technical note: Near infrared reflectance spectroscopy to predict fecal indigestible neutral detergent fiber for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1234–1239. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13319>
- Buonaiuto, G., Cavallini, D., Mammi, L. M. E., Ghiaccio, F., Palmonari, A., Formigoni, A., & Visentin, G. (2021). The accuracy of NIRS in predicting chemical composition and fibre digestibility of hay-based total mixed rations. *Italian Journal of Animal*

- Science, 20(1), 1730–1739. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1990804>
- Cen, H., & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>
- de Marchi, M., Penasa, M., Zidi, A., & Manuelian, C. L. (2018). Invited review: Use of infrared technologies for the assessment of dairy products—Applications and perspectives. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10589–10604. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15202>
- De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M., & Penasa, M. (2014). Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1171–1186. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6799>
- Detmann, E., Souza, M. A., Valadares Filho, S. C., Queiroz, A. C., Berchielli, T. T., Saliba, E. O. S., ... Azevedo, J. A. G. (2012). *Métodos para Análise de Alimentos*. UFV.
- Engel, J., Gerretzen, J., Szymańska, E., Jansen, J. J., Downey, G., Blanchet, L., & Buydens, L. M. C. (2013). Breaking with trends in pre-processing? *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 50, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.015>
- Fekadu, D., Bediye, S., Kehaliw, A., Daba, T., Kitaw, G., & Assefa, G. (2010). Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for determination of chemical entities of natural pasture from Ethiopia. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(5), 919–922. <https://doi.org/10.5251/abjna.2010.1.5.919.922>
- Ferreira, M. H., Braga, J. W. B., & Sena, M. M. (2013). Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy.

- Microchemical Journal, 109, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.008>
- Ferreira, M. M. C. (2015). Análise exploratória dos dados. In M. M. C. Ferreira (Ed.), *Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações* (pp. 107–250). Editora Unicamp.
- Geladi, P., & Kowalski, B. R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185, 1–17. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9)
- Goldshleger, N., Chudnovsky, A., & Ben-Binyamin, R. (2013). Predicting salinity in tomato using soil reflectance spectra. *International Journal of Remote Sensing*, 34(17), 6079–6093. <https://doi.org/10.1080/01431161.2013.793859>
- Gonzalez, L. A., Kyriazakis, I., & Tedeschi, L. O. (2018). Review: Precision nutrition of ruminants: Approaches, challenges and potential gains. *Animal*, 12(2), 246–261. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002288>
- Goulart, R. S., Vieira, R. A. M., Daniel, J. L. P., Amaral, R. C., Santos, V. P., Toledo Filho, S. G., ... Nussio, L. G. (2020). Effects of source and concentration of neutral detergent fiber from roughage in beef cattle diets on feed intake, ingestive behavior, and ruminal kinetics. *Journal of Animal Science*, 98(5). <https://doi.org/10.1093/jas/skaa107>
- Heil, K., & Schmidhalter, U. (2021). An evaluation of different nir-spectral pre-treatments to derive the soil parameters C and N of a humus-clay-rich soil. *Sensors*, 21(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/s21041423>
- IBGE. (2020). Efetivo de rebanhos, por tipo (cabeças), 2020. Pesquisa Da Pecuária Municipal. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>
- Kennard, R. W., & Stone, L. A. (1969). *Computer Aided Design of Experiments*.

- Technometrics, 11(1), 137–148. <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490666>
- Kragten, S. A., & Wyss, U. (2014). Les fourrages à la lumière du proche infrarouge (NIRS). *Recherche Agronomique Suisse*, 5(5), 204–211.
- 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), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.12.012>
- Lobos, I., Gou, P., Hube, S., Saldaña, R., & Alfaro, M. (2013). Evaluation of potential nirs to predict pastures nutritive value. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(2), 463–468.
- Lugassi, R., Chudnovsky, A., Zaady, E., Dvash, L., & Goldshleger, N. (2015). Spectral slope as an indicator of pasture quality. *Remote Sensing*, 7(1), 256–274. <https://doi.org/10.3390/rs70100256>
- Manley, M. (2014). Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews*, 43(24), 8200–8214. <https://doi.org/10.1039/c4cs00062e>
- Millmier, A., Lorimor, J., Hurburgh C., J., Fulhage, C., Hattey, J., & Zhang, H. (2000). Near-infrared sensing of manure nutrients. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 43(4), 903–908. <https://doi.org/10.13031/2013.2986>
- Paciullo, D. S. C., Gomide, C. A. M., Castro, C. R. T., Mauricio, R. M., Fernandes, P. B., & Morenz, M. J. F. (2017). Morphogenesis, biomass and nutritive value of *Panicum maximum* under different shade levels and fertilizer nitrogen rates. *Grass and Forage Science*, 72(3), 590–600. <https://doi.org/10.1111/gfs.12264>
- Parrini, S., Acciaioli, A., Franci, O., Pugliese, C., & Bozzi, R. (2019). Near Infrared

- Spectroscopy technology for prediction of chemical composition of natural fresh pastures. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 514–520. <https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1675669>
- Parrini, S., Staglianò, N., Bozzi, R., & Argenti, G. (2022). Can grassland chemical quality be quantified using transform near-infrared spectroscopy? *Animals*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani12010086>
- Pinheiro, A. A., Cecato, U., Lins, T. O. J. D. A., Beloni, T., Piotto, V. C., & Ribeiro, O. L. (2014). Produção e valor nutritivo da forragem, e desempenho de bovinos Nelore em pastagem de capim-Tanzânia adubado com nitrogênio ou consorciado com estilosantes Campo Grande. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 2147–2158. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4p2147>
- Pittman, J. J., Arnall, D. B., Interrante, S. M., Wang, N., Raun, W. R., & Butler, T. J. (2016). Bermudagrass, wheat, and tall fescue crude protein forage estimation using mobile-platform, active-spectral and canopy-height data. *Crop Science*, 56(2), 870–881. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.05.0274>
- Rinnan, Å., Berg, F. Van den, & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201–1222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>
- Roberts, C. A., Stuth, J., & Flinn, P. (2004). Analysis of Forages and Feedstuffs. In C. A. Roberts, J. Workman Jr, & J. B. Reeves III (Eds.), *Near-infrared spectroscopy in agriculture* (pp. 231–267).
- Rushing, J. B., Saha, U. K., Lemus, R., Sonon, L., & Baldwin, B. S. (2016). Analysis of Some Important Forage Quality Attributes of Southeastern Wildrye (*Elymus glabriflorus*) Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *American Journal of*

- Analytical Chemistry, 07(09), 642–662. <https://doi.org/10.4236/ajac.2016.79060>
- Saha, U., Vann, R. A., Chris Reberg-Horton, S., Castillo, M. S., Mirsky, S. B., McGee, R. J., & Sonon, L. (2018). Near-infrared spectroscopic models for analysis of winter pea (*Pisum sativum* L.) quality constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4253–4267. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8947>
- Savitzky, A., & Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627–1639. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Serafim, C. C., Guerra, G. L., Mizubuti, I. Y., de Castro, F. A. B., Prado-Calixto, O. P., Galbeiro, ... Rego, F. C. A. (2021). Use of near-infrared spectroscopy for prediction of chemical composition of Tifton 85 grass. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(3), 1287–1302. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3p1287>
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). Population Definition, Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Science*, 31(2), 469–474. <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100020049x>
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1994). The application of near infrared spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In G. C. Fahey Jr. (Ed.), *Forage Quality, Evaluation, and Utilization* (pp. 406–449). <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/1994.foragequality.c10>
- Silva, J. G., Silva, S. P., Reis, L. A., Oliveira, D. H. A. M., Ribeiro, D. H., & Moura Júnior, R. C. O. (2022). Chemical composition of *Andropogon gayanus* cv. Planaltina predicted through NIRS and analyzed through wet chemistry. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 74(3), 559–562.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-12478>

- Smith, C., Karunaratne, S., Badenhorst, P., Cogan, N., Spangenberg, G., & Smith, K. (2020). Machine learning algorithms to predict forage nutritive value of in situ perennial ryegrass plants using hyperspectral canopy reflectance data. *Remote Sensing*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/rs12060928>
- Souza, A. M., & Poppi, R. J. (2012). Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, 35(1), 223–229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039>
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crop. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Tran, H., Salgado, P., Tillard, E., Dardenne, P., Nguyen, X. T., & Lecomte, P. (2010). “Global” and “local” predictions of dairy diet nutritional quality using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4961–4975. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1893>
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & Van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

- Weiss, C. P., Gentry, W. W., Meredith, C. M., Meyer, B. E., Cole, N. A., Tedeschi, L. O., ... Jennings, J. S. (2017). Effects of roughage inclusion and particle size on digestion and ruminal fermentation characteristics of beef steers. *Journal of Animal Science*, 95(4), 1707–1714. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1330>
- Wiedemair, V., Langore, D., Garsleitner, R., Dillinger, K., & Huck, C. (2019). Investigations into the performance of a novel pocket-sized near-infrared spectrometer for cheese analysis. *Molecules*, 24(3), 428. <https://doi.org/10.3390/molecules24030428>
- Williams, P. (2014). The RPD Statistic: A Tutorial Note. *NIR News*, 25(1), 22–26. <https://doi.org/10.1255/nirn.1419>
- Williams, P. C. (2020). Application of chemometrics to prediction of some wheat quality factors by near-infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry*, 97(5), 958–966. <https://doi.org/10.1002/cche.10318>
- Williams, P. C., & Sobering, D. C. (1993). Comparison of Commercial near Infrared Transmittance and Reflectance Instruments for Analysis of Whole Grains and Seeds. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 1(1), 25–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1255/jnirs.3>
- 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. In A. M. C. Davies & Williams P. L. (Eds.), *Near infrared spectroscopy: the future waves* (pp. 185–188). NIR Publications.
- Williams, P., Dardenne, P., & Flinn, P. (2017). Tutorial: Items to be included in a report on a near infrared spectroscopy project. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 25(2), 85–90. <https://doi.org/10.1177/0967033517702395>

Windham, W. R., Hill, N. S., & Stuedemann, J. A. (1991). Ash in forage, esophageal, and fecal samples analyzed using near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*, 31(5), 1345–1349.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100050053x>



## **6 ARTIGO B – REDIGIDO SEGUNDO AS NORMAS DA REVISTA *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* PARA SUBMISSÃO**

**Desenvolvimento de modelos preditivos multi-espécies para a caracterização de gramíneas tropicais pela espectroscopia de infravermelho próximo: validações gerais *versus* validações espécie-específicas**

**Development of multi-species predictive models for the characterization of tropical grasses by near-infrared spectroscopy: general *versus* species-specific validation**

### **Resumo**

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) pode ser utilizada para a avaliação nutricional de plantas forrageiras a partir do uso de modelos preditivos. Os modelos de espécie única podem ser usados, caracterizando uma população com menor variabilidade em relação a esse fator, porém a predição de variáveis nutricionais de uma forrageira a partir de modelos multi-espécies também pode ser realizada. A confecção do banco amostral é crucial para o sucesso dos modelos para que seu uso seja replicado, retratando a real presença das diferentes espécies e sua representatividade, a abrangência de valores e condições de cultivos das forrageiras estudadas. A utilização de validações espécies-específicas de um modelo multi-espécies pode ser uma ferramenta que permite explorar os fatores de influência na aplicabilidade de cada modelo. O objetivo deste estudo foi desenvolver modelos de predições multi-espécies de gramíneas tropicais *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus* e utilizar uma abordagem com validação espécie-específica e multi-espécies. Foram determinados: proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) pelas metodologias laboratoriais de referência de um conjunto de 1120 amostras. Os resultados foram correlacionados com os dados espectrais respectivos às amostras, coletados pelo escaneamento pela NIRS. A calibração dos modelos preditivos foi realizada com o emprego de técnicas quimiométricas. Foram desenvolvidas calibrações e validações multi-espécies para cada atributo nutricional estudado, e posteriormente o banco de

validação foi testado de forma espécie-específica. A qualidade das validações foi avaliada pela raiz quadrada do erro médio (RMSEP), coeficiente de determinação ( $R^2$ ), razão de intervalo de erro (RER), desvio preditivo residual (RPD) e erro sistemático (*Bias*). Os modelos multi-espécies apresentaram boa capacidade preditiva para a avaliação nutricional de todos os parâmetros estudados com  $R^2$  de 0,84 a 0,89; RER > 11; RPD entre 2,5 e 3,0 e *Bias* próximos de 0. Entretanto, as validações espécie-específicas demonstraram baixa ou nenhuma qualidade de uso, para DIVMS ( $R^2$  0,38; RPD 1,3; RER 4,4) e FDN ( $R^2$  não significativo; RPD 0,9; RER 3,7) de *Cynodon* spp, e para DIVMS ( $R^2$  0,54; RPD 1,5; RER 6,6) e FDA ( $R^2$  0,51; RPD 1,4; RER 5,2) de *M. maximus*. Os modelos multi-espécies possibilitam a avaliação dos atributos nutricionais das gramíneas tropicais estudadas, permitindo a análise e triagem qualitativa dessas amostras. Entretanto, as validações espécie-específicas demonstram que fatores como tamanho da população amostral e descaracterização das amostras de conjuntos pequenos podem diminuir a acurácia e precisão dos modelos preditivos. Para evitar estimativas equivocadas, sugere-se o uso de conjuntos com número amostral representativos, e até mesmo o uso de modelos de espécie única.

**Palavras-chave:** *Urochloa*, *Cynodon*, *Megathyrsus*, pecuária de precisão, modelos de triagem.

### Abstract

Near infrared spectroscopy (NIRS) can be used for the nutritional assessment of forage plants using predictive models. Single-species models can be used, characterizing a population with less variability in relation to this factor, but the prediction of nutritional variables of a forage from multi-species models can also be performed. The making of the sample dataset is crucial for the success of the models so that their use can be replicated, portraying the real presence of the different species and their representativeness, the range of values and cultivation conditions of the studied forages. The use of species-specific validations of a multi-species model can be a tool that allows exploring the factors that influence the applicability of each model. The objective of this study was to develop multi-species prediction models of tropical grasses *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. and *Megathyrsus maximus* and use a species-specific and multi-species validation approach. Crude protein (CP), in

*vitro* dry matter digestibility (IVDMD), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were determined by reference laboratory methodologies from a set of 1120 samples. The results were correlated with the spectral data for the samples, collected by NIRS scanning. Calibration of predictive models was performed using chemometric techniques. Multi-species calibrations and validations were developed for each nutritional attribute studied, and later the validation bank was tested in a species-specific way. The quality of the validations was evaluated by the root mean square error (RMSEP), coefficient of determination ( $R^2$ ), error interval ratio (RER), residual predictive deviation (RPD) and systematic error (Bias). The multi-species models were considered usable for the nutritional assessment of all parameters studied with  $R^2$  from 0.84 to 0.89; RER > 11; RPD between 2.5 and 3.0 and Bias close to 0. However, the species-specific validations showed low or no quality of use, for IVDMD ( $R^2$  0.38; RPD 1.3; RER 4.4) and NDF ( $R^2$  not significant; RPD 0.9; RER 3.7) of *Cynodon* spp, and for IVDMD ( $R^2$  0.54; RPD 1.5; RER 6.6) and ADF ( $R^2$  0.51; RPD 1.4; RER 5.2) of *M. maximus*. The multi-species models allow the evaluation of the nutritional attributes of the studied tropical grasses, allowing the analysis and sorting of these samples. However, species-specific validations demonstrate that factors such as sample size and mischaracterization of samples from small sets can decrease the accuracy and precision of predictive models. To avoid mistaken estimates, it is suggested the use of sets with representative sample numbers, and even the use of single-species models.

**Keywords:** *Urochloa*, *Cynodon*, *Megathyrsus*, precision livestock, screening models.

## Introdução

A utilização de plantas forrageiras na dieta de animais ruminantes é uma alternativa para redução de custos com alimentação, principalmente nas regiões tropicais. Esses animais têm à disposição, na maioria das vezes, pastagens de gêneros *Urochloa*, *Cynodon* e *Megathyrsus*, que são cultivadas por sua alta produção de matéria seca, bom valor nutritivo e adaptabilidade ao sistema produtivo (Castro et al., 2010; Paciullo et al., 2017; Santos et al., 2017).

A produção de forragem de boa qualidade depende de fatores como manejo, condição climática e de solo, tipo de forrageiras e suas peculiaridades. As mudanças que ocorrem durante o seu ciclo produtivo requerem avaliação e acompanhamento dos seus componentes químico-físicos, como, proteína e fibra para garantir a sua qualidade. O entendimento dos parâmetros relacionados a qualidade da forragem é determinante para manter uma pecuária cada vez mais sustentável (Mazabel et al., 2020).

Nesse cenário, a utilização de metodologias avaliativas é necessária para a identificação e quantificação dos nutrientes e características das pastagens tropicais. A Espectroscopia de Infravermelho Próximo (*Near Infrared Spectroscopy* – NIRS) pode ser utilizada como uma ferramenta alternativa às análises químicas convencionais. A NIRS tem sido amplamente empregada na nutrição animal desde a avaliação de dieta total até forrageiras tropicais e temperadas, gramíneas e leguminosas e digestibilidade de dietas a partir das fezes dos animais (Andueza et al., 2011; Yang et al., 2017; Saha et al., 2018; Baath et al., 2020a; Norman et al., 2020; Abreu et al., 2022; Parrini et al., 2022).

O método de NIRS consiste na elaboração de uma relação matemática ligada às características medidas em determinada amostra e a sua absorção de luz na região do infravermelho próximo, de 700 a 2500 nm, e as moléculas químicas existentes na forragem (Norman et al., 2020; Rushing et al., 2016), a partir do emprego de técnicas de quimiometria. As características das ligações químicas entre hidrogênio e oxigênio, hidrogênio e carbono, hidrogênio e nitrogênio influenciam diretamente no espectro de cada amostra na absorção ou reflexão do comprimento de onda específico. Isso depende da quantidade de compostos complexos como carbono e nitrogênio presentes na proteína bruta, fibra e os demais componentes vegetais (Parrini et al., 2018; Saha et al., 2018; Smith et al., 2019).

Dessa forma, a espectroscopia NIR pode ser considerada como potencial alternativa às análises químicas convencionais que demandam mais tempo na execução, necessidade do uso e descarte de reagentes, além de serem mais onerosas (Baath et al., 2020). Há também um maior intervalo desde a coleta de amostras até o recebimento dos resultados pelo técnico ou produtor solicitante, atrasando assim a tomada de decisão sobre a alimentação dos animais, intervalos de

pastejo, ponto de corte da forragem, entre outros. A NIRS pode ser considerada um recurso importante na nutrição animal de precisão, que é uma prática ecologicamente correta e precisa – buscando melhor desempenho a partir de informações sobre necessidades e fornecimento dos nutrientes aos animais (Silva et al., 2022).

O uso rotineiro da tecnologia NIRS para avaliação nutricional de forragens depende da calibração e validação dos modelos preditivos e sua subsequente classificação. Para tanto, utilizam-se técnicas estatísticas de regressão multivariada. Na calibração multivariada, o propósito é desenvolver a relação entre os resultados obtidos pela técnica de análise química de referência e a assinatura espectral de cada amostra.

Por possuir uma heterogeneidade significativa, calibrações desenvolvidas a partir de amostras de forragem possuem amplas variações (Andueza et al., 2011), sejam de modelos espécie-específicos ou multi-espécies. Com o emprego de calibrações válidas, novas amostras podem ser analisadas, sendo utilizadas para a avaliação e quantificação imediata de características simultaneamente (Catunda et al., 2022).

Estudos de avaliação de plantas forrageiras com a aplicação da NIRS reportam resultados de calibrações espécie-específicas (Abreu et al., 2022; Karayilanli et al., 2016; Saha et al., 2018; Serafim et al., 2021; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2021), com resultados considerados excelentes. Modelos de predição espécie-específicos são pertinentes para programas de melhoramento e para avaliação de espécies de uso constante na produção animal. Entretanto, calibrações de espécies únicas podem não ser viáveis e úteis para laboratórios comerciais ou quando há grande diversidade de espécies (Norman et al., 2020), principalmente pelo número de amostras necessário para um modelo preciso.

A utilização de modelos preditivos multi-espécies tem sido relatada como uma possibilidade de incremento na variabilidade dos bancos de dados utilizados com resultados capazes de serem implementados para avaliação de diversas plantas forrageiras (Parrini et al., 2018; Parrini et al., 2019; Baath et al., 2020b; Norman et al., 2020; Hernandez et al., 2021; Hernández et al., 2021; Parrini et al., 2022). Esses modelos permitem a análise de espécies e cultivares manejadas de forma individual ou consorciada, de difícil identificação, até mesmo em diferentes condições de manejo, ambiente,

estádios de maturidade e outros (Baath et al., 2020). Uma calibração multi-espécies com grande abrangência pode ser um diferencial a nível comercial e até mesmo de pesquisa.

No entanto, essa abordagem de desenvolvimento de modelos preditivos multi-espécies deve ser extremamente cuidadosa, considerando possíveis superestimativas ou subestimativas e os fatores que podem acarretá-las. Ao avaliar os modelos de predição desenvolvidos, deve-se considerar o número amostral de cada espécie, o sistema de manejo a que cada uma é submetida, a morfologia da planta e a caracterização particular dos constituintes nutricionais pela NIRS.

Modelos multi-espécies podem ser compostos por diferentes números de amostras por espécie nele inseridos, desde que sejam representativas de cada uma. Nesse contexto, um questionamento pode ser útil: se as características das amostras presentes em menor número são realmente preditas, ou se essas são camufladas pelas que estão presentes em maior proporção. Esse fato levaria a uma utilização errônea dos modelos, por não predizerem o real valor esperado para determinada forrageira.

Ao considerar essa hipótese, a discussão sobre o desenvolvimento de modelos multi-espécies ou espécie-específicos recai na confecção de um banco de dados que seria considerado ‘ideal’, que possa ser utilizado com confiabilidade de informações, ou seja, um banco de calibração mais representativo possível.

Este estudo teve como objetivo desenvolver modelos de predições multi-espécies de gramíneas tropicais *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*, e avaliar a validação espécie-específica e multi-espécies.

## **Material e métodos**

### ***Caracterização do banco amostral***

O banco amostral total utilizado neste estudo foi composto de 1120 amostras de forrageiras tropicais oriundas de diferentes propriedades do estado do Paraná – Brasil, coletadas entre os anos de 2013 e 2017. A proporção de cada espécie que compõe o banco de dados foi diferente devido as especificidades dos experimentos originais.

Foram utilizadas 712 amostras de *Urochloa brizantha* cultivares Marandu e Piatã obtidas em três propriedades diferentes, com bovinos em pastejo com lotação contínua. Esse conjunto amostral foi composto de amostras de lâmina foliar (LF) e colmo+bainha (CB), sendo que para a cultivar Marandu foram realizadas coletas em duas localidades diferentes: em Cruzmaltina/PR, uma coleta em junho/2015 e outra em novembro/2015; e Uniflor/PR, uma única coleta em novembro/2015. As amostras da cultivar Piatã foram obtidas em Londrina/PR, em uma única coleta, em junho/2015.

Para *Megathyrus maximus* cultivar Tanzânia, foram coletadas 345 amostras em uma área de pastejo com lotação contínua em Cidade Gaúcha/PR, compostas por LF, CB e planta inteira (PI) oriundas de cinco coletas intervaladas a cada 28 dias, compreendendo o período de dezembro/2013 até maio/2014.

O conjunto de 63 amostras de *Cynodon* spp. cultivar Tifton 85 compostas de LF, CB e PI foram coletadas de parcelas em uma área destinada a fenação, originadas de uma coleta singular em Arapongas/PR em junho/2017. O detalhamento sobre o banco amostral está apresentado na Tabela 1, com informações sobre estação do ano das coletas, proporção de amostras de cada espécie, cultivar e estrutura morfológica.

As amostras foram coletadas de forma padronizada com altura de resíduo de 5 cm do solo, com auxílio de um quadrado de metal de 0,25 m<sup>2</sup>.

**Tabela 1.** Banco amostral utilizado para o desenvolvimento de modelos de predição da qualidade de *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrus maximus*.

Grupos Kennard-Stone	n total/espécie	C	V	Caracterização das amostras					
				Espécie	Cultivar	Estrutura morfológica	Estação do ano	Local	
1	60	40	20			LF	Outono/	Cruzmaltina/PR	
2	60	40	20			CB	inverno		
3	60	40	20	<i>Urochloa brizantha</i>	Marandu	LF	Primavera/	Cruzmaltina/PR	
4	60	40	20			CB	verão		
5	115	76	39		LF		Primavera/	Uniflor/PR	
6	115	76	39		CB		verão		
7	121	80	41		Piatã	LF	Outono/	Londrina/PR	
8	121	80	41			CB	inverno		
9	21	14	7	<i>Cynodon</i> spp.	Tifton 85	LF	Outono/	Arapongas/PR	
10	21	14	7			CB			Inverno
11	21	14	7			PI			

12	115	76	39			LF		
13	115	76	39	<i>Megathyrsus</i>	Tanzânia	CB	Verão/ outono	Cidade Gaúcha/PR
14	115	76	39	<i>maximus</i>		PI		
Total	1120	742	378	-	-	-	-	-

n: número de amostras, C: grupo de calibração, V: grupo de validação, LF: lâmina foliar, CB: colmo+bainha, PI: planta inteira, PR: Paraná. É possível visualizar como foi realizada a composição do banco amostral, a origem das amostras e estações do ano de coleta.

A análise descritiva das variáveis foi realizada de forma individual para cada espécie e também de todo o conjunto multi-espécies.

Após cada coleta as amostras foram encaminhadas para o laboratório e pré-secas em estufa de circulação forçada a 60 °C durante 72 horas, para atingir peso constante, na sequência, moídas a 1 mm em moinho do tipo *Willey*. Após a moagem, uma parte do material foi utilizado para aquisição dos espectros NIRS e outra parte para as análises químicas de referência.

#### ***Análises laboratoriais de referência e pela espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS)***

Pelas metodologias laboratoriais de referência, foram determinados os teores de matéria seca definitiva a 105 °C (MS, método 930.15) e proteína bruta pelo princípio de Kjeldahl (PB, método 990.03) segundo AOAC *International* (2000). A digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) foi executada segundo a técnica de dois estágios de incubação com líquido ruminal e pepsina, proposta por Tilley e Terry (1963). A análise das frações fibrosas, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), foram realizadas de acordo com Van Soest et al. (1991), de forma sequencial. Para cada amostra do conjunto de dados, o procedimento de análise química de referência foi realizado em duplicata, e dessa maneira, foi utilizada a média de cada uma ao final. Os resultados adquiridos foram expressos com base na MS.

Os espectros das amostras secas e moídas das forrageiras estudadas foram coletados a partir do escaneamento em espectrômetro VIS-NIR (*Foss NIRSystems XDS*; Silver Spring, MD, USA), após serem homogêneas e acondicionadas em cubetas de quartzo. Utilizou-se a banda de refletância na faixa de 400 a 2500 nanômetros (nm), e os dados espectrais foram obtidos por refletância (R) – posteriormente convertidos em absorvância (A):  $A = \log(1/R)$ . A faixa espectral considerada para desenvolvimento dos modelos preditivos foi de 1100 a 2500 nm.

### *Análises quimiométricas*

Antes da análise estatística, o algoritmo de Kennard-Stone (KS) foi aplicado ao conjunto de dados para a separação uniforme dos bancos de calibração e validação (Tabela 1). O objetivo do uso desse algoritmo é estipular um número de amostras que caracterize a variação espectral da sua totalidade (Yang et al., 2017). O algoritmo de KS considera a distância entre as amostras representantes da matriz **X** (espectros NIRS) e seleciona as que possuem maior representatividade (Kennard e Stone, 1969).

Foi utilizada a transformação espectral de correção do espalhamento multiplicativo (*Multiplicative scatter correction* – MSC) para correção de linha de base de todo o espectro antes de proceder o KS propriamente dito. A MSC remove a influência de efeitos físicos indesejáveis como tamanho de partícula, opacidade e brilho da extensão de comprimentos de onda do espectro, os quais não emitem informações químicas (Souza e Poppi, 2012; Parrini et al., 2018).

Ao aplicar o algoritmo de KS foi definido que dois terços do total de cada grupo amostral (Tabela 1) fossem utilizados para a calibração dos modelos preditivos, considerando-se 472 amostras de *U. brizantha*, 228 amostras de *M. maximus* e 42 amostras de *Cynodon* spp., totalizando 742 amostras multi-espécies. O terço remanescente de amostras foi usado para a validação geral dos modelos, utilizando-se 240 amostras de *U. brizantha*, 117 amostras de *M. maximus* e 21 amostras de *Cynodon* spp., resultando em uma validação multi-espécies com 378 amostras.

Após esse procedimento padrão, com o intuito de avaliar o efeito de cada espécie em relação ao modelo de calibração e possíveis subestimativas ou superestimativas, foram realizadas validações espécies-específicas e cada grupo amostral designado para a etapa teste dos modelos foi explorado separadamente. Dessa forma os grupos testados foram: *Urochloa brizantha* – 240 amostras, *Megathyrsus maximus* – 117 amostras e *Cynodon* spp. – 21 amostras.

O gráfico de espectros médios foi elaborado a partir dos dados espectrais brutos, agrupados de acordo com as estruturas morfológicas de cada espécie estudada, utilizando a média de cada grupo amostral.

Técnicas de análise multivariada foram empregadas para o estudo do banco de dados e para o desenvolvimento dos modelos preditivos da qualidade nutricional de forrageiras tropicais. A Análise de componentes principais (*Principal component analysis* – PCA) e a Regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial least squares regression* – PLS) foram executadas pelo *software The Unscrambler X* (Camo Software ASA, Oslo, Norway).

A PCA é uma metodologia que reduz a dimensionalidade de dados projetando-os em um novo espaço dimensional, mantendo as relações originais entre as amostras (M. M. C. Ferreira, 2015), originando os gráficos de *scores* (permite visualização das associações de semelhanças entre as amostras) e *loadings* (ilustra quais variáveis mais favorecem o posicionamento dos grupos do gráfico de scores) (Souza e Poppi, 2012).

Antes de executar a PCA, os pré-processamentos de dados foram utilizados para correção de possíveis interferências. Para análise dos dados espectrais previamente corrigidos para linha de base com a transformação de 1ª derivada de Savitzky-Golay (SG), foi realizada a centragem na média – procedimento que subtrai o valor médio de cada coluna da matriz de dados de cada um dos valores da respectiva coluna. A centragem na média é calculada pela equação  $\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ij}$ , na qual amostra  $i$ , uma medida  $j$  realizada para todas  $i$  amostras e  $\bar{x}_j$  representa a média da coluna. Os dados de análises bromatológicas foram submetidos ao auto escalamento pelo desvio-padrão, no qual todas as variáveis são divididas pelo seu desvio-padrão após a centragem na média das mesmas e  $\frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$  é empregado naquelas variáveis apresentadas com diferentes grandezas ou com grandes variações (Bro e Smilde, 2003; Van den Berg et al., 2006). O cálculo de autoescalamento é realizado pela equação  $\frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$ , na qual amostra  $i$ , uma medida  $j$  realizada para todas  $i$  amostras e  $\bar{x}_j$  representa a média da coluna, e  $s_j$  o desvio padrão da coluna.

A calibração dos modelos de predição multi-espécies para a avaliação das forrageiras tropicais foi realizada por intermédio da Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), relacionando os dados espectrais (matriz  $\mathbf{X}$ ) com os resultados das análises químicas de referência (vetor  $\mathbf{y}$ ). Para cada parâmetro estudado, um modelo foi calibrado, e como uma das formas de testar a acurácia e precisão desses modelos foi realizada a validação cruzada (*Cross validation* – CV) empregando-se o método *leave-one-out*. A CV *leave-one-out* consiste em retirar aleatoriamente uma única amostra do modelo

desenvolvido e refazer o procedimento sem essa amostra, até que todas tenham sido incluídas pelo menos uma vez no conjunto da validação (Parrini et al., 2019; Simoni et al., 2021).

Para execução da PLS de cada atributo nutricional, utilizou-se a transformação de dados para correção de linha de base com o uso da 1ª derivada de Savitzky-Golay (SG), com a combinação de SG 129, no qual o primeiro dígito corresponde a 1ª derivada, o segundo dígito indica o grau polinomial e o terceiro dígito, o intervalo de alisamento (Savitzky e Golay, 1964), juntamente com a centragem na média desses dados. O método de SG corrige possíveis problemas como inclinação ou deslocamento vertical do espectro, o que pode aprimorar a resolução do mesmo (Engel et al., 2013).

A classificação da qualidade dos modelos preditivos desenvolvidos foi realizada a partir do emprego de figuras de mérito, ou parâmetros estatísticos, particularmente a raiz quadrada do erro médio (*Root mean square error* – RMSE), número ótimo de variáveis latentes (VL), coeficiente de determinação ( $R^2$ ), razão de intervalo de erro (*Range error ratio* – RER), erro sistemático (*Bias*) e desvio preditivo residual (*Residual prediction deviation* – RPD). A interpretação desses resultados foi realizada de forma conjunta, levando em consideração a aplicação prática do modelo em relação a análise dos atributos nutricionais das gramíneas tropicais em questão.

É possível avaliar a veracidade, ou acurácia, dos modelos preditivos, a partir da raiz quadrada do erro médio da calibração (*Root mean square error of calibration* – RMSEC), validação cruzada (*Root mean square error of cross-validation* – RMSECV) e do conjunto de validação externa (*Root mean square error of prediction* – RMSEP) (Botelho et al., 2017). A RMSEC indica o nível de ajuste do modelo aos dados de calibração (Parrini et al., 2019). A RMSECV foi utilizada para determinar o número ótimo de variáveis latentes (VL) da PLS, o que determina a efetividade de um modelo evitando subajuste ou superajuste e o alto erro de previsão (M. M. C. Ferreira, 2015; Buonaiuto et al., 2021). A RMSEP é um importante parâmetro ao considerar as amostras do banco externo àquelas usadas para o desenvolvimento do modelo em questão, considerado assim o parâmetro mais robusto desse grupo (M. H. Ferreira et al., 2013; M. M. C. Ferreira, 2015a). É preferível que exista uma diferença pequena entre os valores de RMSEC e RMSEP (Parrini et al., 2022). A RMSE é uma das formas de erro padrão sugerida para avaliar a dispersão dos valores médios de uma característica

estipulada sobre a linha de regressão, ou seja, quanto menor o valor desse erro, mais aproximada estará a estimativa do valor observado na variável dependente (Millmier et al., 2000). Os parâmetros de RMSE citados acima são calculados pelas seguintes equações:

Nas equações,  $e$  são os valores de referência e os valores preditos da amostra  $i$  no conjunto de calibração e predição,  $1$  é o número de graus de liberdade e  $n_c$  e  $n_p$  é o número de amostras do banco de calibração e predição, respectivamente.

O coeficiente de determinação da calibração ( $R^2c$ ), da validação cruzada ( $R^2cv$ ) e da validação ( $R^2v$ ) foi considerado para verificar a proporção da variância explicada dos dados contidos na equação de regressão apresentada (Parrini et al., 2022; Tran et al., 2010). Essa figura de mérito é calculada a partir da equação a seguir:

Na equação,  $e$  são os valores medidos e preditos da amostra  $i$  no conjunto de calibração ou predição,  $n$  é o número amostral e  $\bar{e}$  é a média do método de referência para todas as amostras nos conjuntos de calibração e validação.

Estatisticamente, modelos preditivos com  $R^2v$  acima de 0,90-0,91 podem ser considerados como excelentes (Tran et al., 2010; P. Williams et al., 2019) e utilizados para qualquer aplicação.

A RER foi calculada na etapa de calibração ( $RERc$ ), na validação cruzada ( $RERcv$ ) e na validação ( $RERv$ ) pela razão da amplitude dos valores medidos do conjunto amostral e o valor de RMSEC ou RMSEP, visto como um indicador da utilidade prática de modelos preditivos (Williams e Sobering, 1996). Ao se obter uma RER acima de 8, considera-se que o modelo prediz dados quantitativos na sua utilização (Millmier et al., 2000). Para o cálculo de RER é utilizada a seguinte equação:  $RER = \frac{\max(e_i) - \min(e_i)}{RMSE}$ , sendo  $\max(e_i)$  que representa o valor máximo do conjunto amostral de calibração ou predição e  $\min(e_i)$  o valor mínimo do mesmo banco – sendo considerados os valores obtidos pelos métodos de referência.

A capacidade preditiva e a veracidade do modelo desenvolvido foram avaliadas pelo seu RPD na etapa de validação (Botelho et al., 2017), sinalizando sua aplicabilidade em bancos de dados diferentes daqueles utilizados na calibração. O RPD é obtido a partir da razão do desvio-padrão amostral e o RMSEC ou RMSEP (Williams and Sobering, 1993; Agelet and Hurburgh, 2010; Ferreira et al., 2013; Williams, 2014; Parrini et al., 2018), definido pela equação , sendo o  $DP_{pred}$  o desvio-padrão amostral dos valores obtidos pelo método de referência, do conjunto de predição.

Para a avaliação de forragens, P. Williams (2014) relataram que um valor de RPD maior que 4,1 pode ser considerado como excelente para aplicação prática do modelo de predição desenvolvido pela NIRS, e Goldshleger et al. (2013) sugeriram que valores entre 2,0-2,5 descrevem modelos com boa predição quantitativa.

O erro sistemático, ou *Bias*, de um modelo preditivo caracteriza sua acurácia, e é determinado pela diferença entre o valor medido e o valor predito, dividido pelo número de amostras do banco de validação (Botelho et al., 2017), com emprego da equação , na qual representa os valores determinados pelos métodos de referência e representa os valores preditos, ambos do conjunto amostral de predição; e o  $n_p$  é o número de amostras do mesmo conjunto. Valores positivos ou negativos podem significar estimativas superestimadas e subestimadas, respectivamente (Tran et al., 2010; Heil e Schmidhalter, 2021). Para esse parâmetro, quando são usadas amostras de validação externa no teste dos modelos de calibração, espera-se que os resultados obtidos sejam diferentes de zero (Wiedemair et al., 2019).

A identificação e retirada de *outliers* da PLS foi efetuada a partir da análise de *leverage* ( $h_i$ ). O procedimento de identificação e retirada das amostras com alta *leverage* consideradas como *outliers* foi realizado duas vezes em cada PLS, para cada parâmetro nutricional estudado. O valor limite de *leverage* a ser considerado é de  $h_i$ , no qual  $VL$  é o número de variáveis latentes do modelo e  $n$  é o número de amostras do banco de calibração – amostras com  $h_i$  maiores que esse limiar devem ser excluídas (Ferreira et al., 2013).

## **Resultados e discussão**

### *Análises químicas de referência, análise descritiva e análise de componentes principais*

Os valores de média, mínimo, máximo, desvio-padrão e coeficiente de variação das análises de referência de proteína bruta, digestibilidade *in vitro* e fibra em detergente neutro e ácido são apresentados na Tabela 2. Foi possível observar uma ampla variação na composição química das diferentes espécies forrageiras, principalmente nos valores de PB. Para todos os grupos avaliados, os valores de CV foram acima de 20%, seguido pelos de FDA de *U. brizantha* (20,76%), e conseqüentemente, do grupo geral avaliado (18,32%). Os valores máximo e mínimo apresentados no banco geral de amostras (Tabela 2) são os mesmos apresentados para as amostras de *Urochloa brizantha*, exceto para o parâmetro FDA, cujo valor mínimo foi o obtido para as amostras de *Cynodon* spp. Esse fato demonstrou que todos os resultados obtidos para *U. brizantha* englobaram aqueles de *M. maximus* e *Cynodon* spp., atenuando a divergência entre espécies.

**Tabela 2.** Análise descritiva dos capins *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus* e seus atributos químicos e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados pelos métodos de referência (em porcentagem da matéria seca).

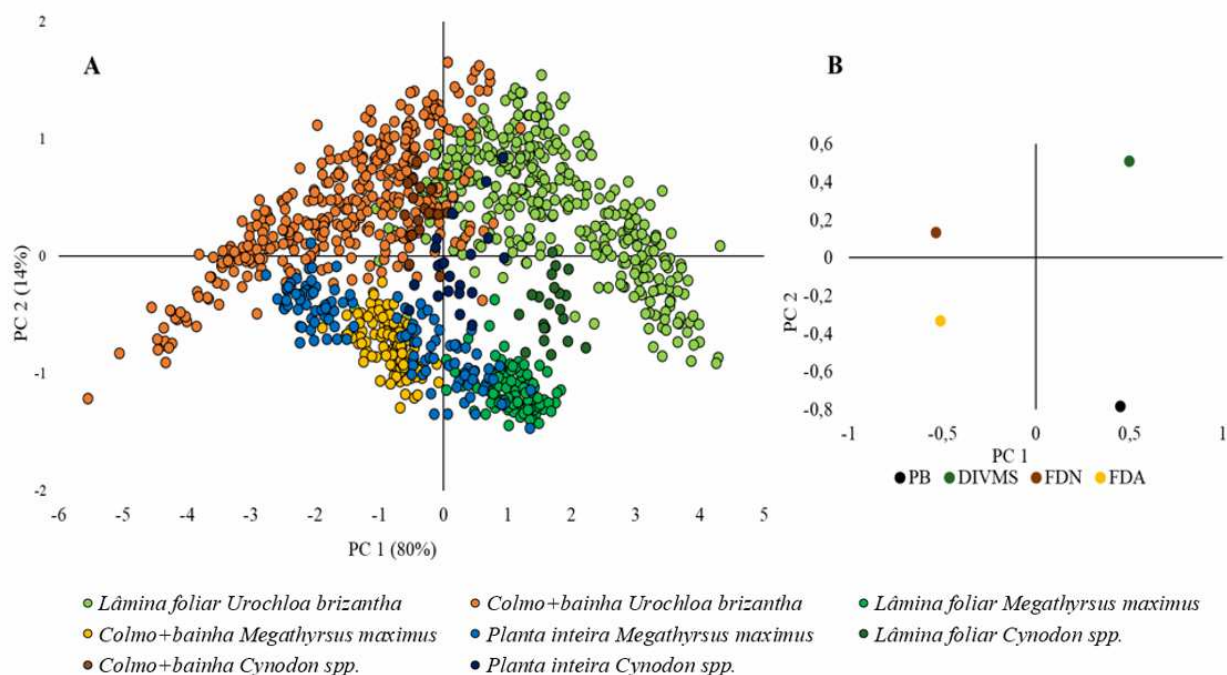
Conjunto amostral	Parâmetros (%)	Mínimo (%)	Média (%)	Máximo (%)	DP (%)	CV (%)
<i>Urochloa brizantha</i>	PB	1,70	7,73	19,13	4,01	51
	DIVMS	32,15	72,49	91,09	11,23	15
	FDN	51,65	70,01	86,89	7,68	10
	FDA	24,11	37,13	60,83	7,71	20
<i>Cynodon</i> spp.	PB	5,25	10,38	17,29	3,58	34
	DIVMS	61,26	69,44	80,83	4,61	6
	FDN	64,92	70,06	73,63	1,91	2
	FDA	23,93	32,91	41,65	4,69	14
<i>Megathyrsus maximus</i>	PB	4,25	11,24	16,58	3,22	28
	DIVMS	51,23	64,95	73,74	4,76	7
	FDN	62,11	70,01	80,46	3,95	5
	FDA	34,82	41,46	51,87	3,83	9
Banco geral	PB	1,70	8,96	19,13	4,09	45
	DIVMS	32,15	70,00	91,09	10,00	14
	FDN	51,65	70,01	86,89	6,52	9
	FDA	23,93	38,22	60,83	7,00	18

DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação, PB: proteína bruta, DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido.

As condições de manejo, espécie cultivada, ciclo vegetativo, estágio de maturidade e local são desejáveis de serem incorporadas às características que um modelo preditivo representa para a avaliação de plantas forrageiras (Andueza et al., 2011; Parrini et al., 2022). A caracterização de um banco amostral amplo e variado pode ser indicada pela sua amplitude, e dessa forma, comprovando que as amostras utilizadas no presente estudo representam diversas circunstâncias de cultivo das plantas forrageiras estudadas – sendo que essas foram coletas em diferentes estações do ano e diferentes localidades.

O teor de proteína bruta de dietas para ruminantes deve possuir no mínimo 7% de PB para evitar diminuição da atividade microbiana ruminal, o que pode culminar em deficiência proteica para o metabolismo animal (Pinheiro et al., 2014). Em relação a fração fibrosa, sua importância se dá pelo fato de estar ligada com a saúde e funcionamento ruminal, desde a manutenção do pH em uma faixa que evite problemas como na acidose, na fermentação, na produção de saliva, e nos movimentos peristálticos (Van Soest, 1994; Weiss et al., 2017; Goulart et al., 2020). Devido a esses fatores, é indispensável conhecer a qualidade da fibra disponível em determinado alimento.

A análise de componentes principais (PCA) dos resultados bromatológicos de referência possibilitou a visualização de cada grupo amostral, com as variações de espécie e componente morfológico, e são ilustrados na Figura 1A, associada com influência de cada atributo nutricional estudado (Figura 1B).



**Figura 1.** A) Representação gráfica dos resultados das análises químicas de referência do banco amostral multi-espécies (*Scores*), a partir da análise de componentes principais. B) *Loadings* das características nutricionais de *Urochloa brizantha*, *Cynodon spp.* e *Megathyrsus maximus*. A distribuição dos *scores* demonstra os grupos amostrais por espécie e componente morfológico, e juntamente com os *loadings* é possível perceber a influência dos atributos nutricionais em cada grupo.

A distribuição espacial nos eixos da PCA e a formação de grupos (Figura 1A) ocorreu conforme os componentes morfológicos estudados e a característica química predominante de cada um deles. Os *loadings* (Figura 1B) demonstram a influência de cada uma das variáveis de acordo com sua composição estrutural: no eixo da PC1 no sentido negativo (Figura 1B), os conteúdos dos resíduos de FDN e FDA foram representativos e ligados às amostras de colmo+bainha de *U. brizantha*, *Cynodon spp.* e de *M. maximus*. Uma parte das amostras de planta inteira de *M. maximus* também foi relacionada à maior presença de conteúdo fibroso, o que provavelmente está ligado ao fato de que para essa espécie, foram realizadas cinco coletas em experimento de pastejo com lotação contínua, com amostras em diferentes fases de maturidade fenológica. O conteúdo de parede celular representado pelas frações avaliadas neste estudo está relacionado à presença de celulose, hemicelulose e lignina (FDN) e celulose e lignina (FDA) (Van Soest et al., 1991), corroborando com a

proximidade entre os *loadings* representativos (Figura 1B). No eixo negativo da PC1, a relação entre os conteúdos de PB e DIVMS demonstraram estreita associação com as amostras de lâmina foliar das espécies forrageiras avaliadas e com parte das amostras de planta inteira de *Cynodon* spp. e de *M. maximus*, podendo assim serem relacionadas a uma melhor qualidade nutricional.

### ***Análises espectroscópicas***

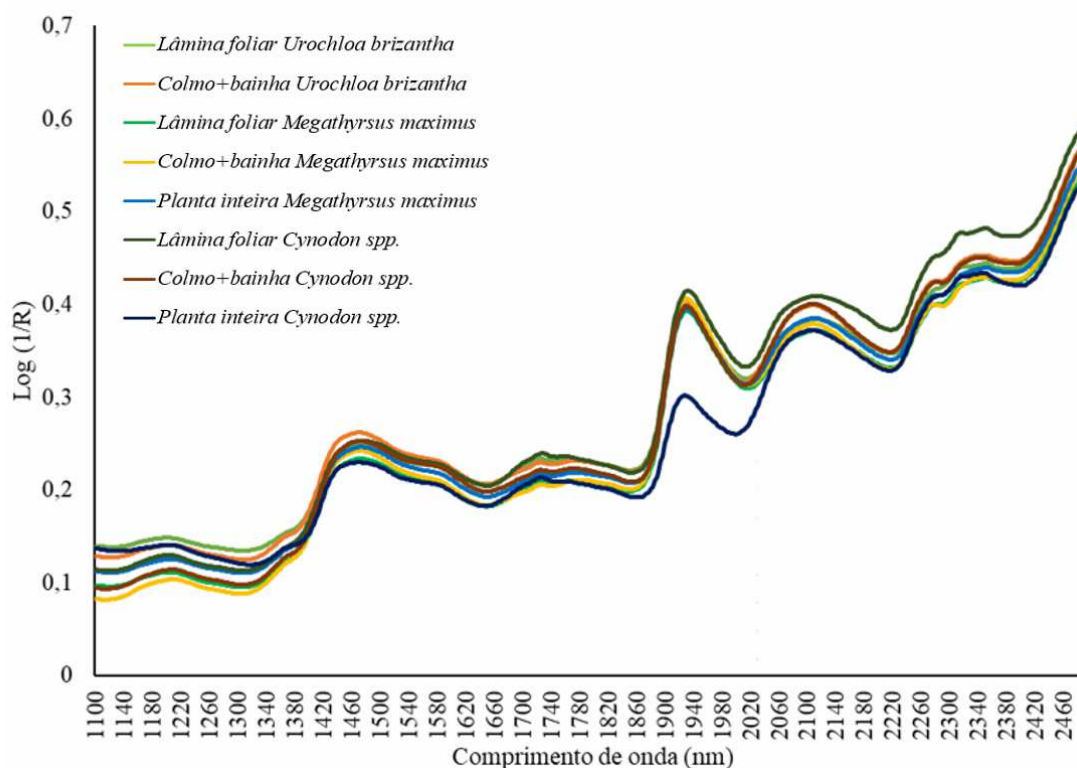
Os espectros médios brutos dos grupos amostrais estudados são exibidos na Figura 2. Foram identificadas bandas de absorvância habituais na avaliação de plantas forrageiras pela espectroscopia NIR, referindo-se aquelas regiões que apresentam ligações moleculares de O-H, N-H e C-H (Williams, 2020), caracterizando moléculas de carboidratos, proteína e até mesmo água.

A linha de espectros representante das amostras de planta inteira de *Cynodon* spp. foi a que mais se diferenciou dos outros grupos amostrais em relação a absorvância, principalmente por volta de 1900-1980 nm (Figura 2). Nessa faixa citada, as amostras apresentaram menor intensidade de absorção da luz em relação às outras, enquanto no restante do gráfico a dinâmica espectral foi similar, inclusive com alguns pontos de sobreposição. Apesar da diferença do grupo de amostras de *Cynodon* spp., todas as espécies estudadas e seus respectivos componentes morfológicos apresentaram bandas de absorvância equivalentes nas regiões espectrais mais marcantes, com diferença apenas no nível de absorvância, o que pode estar ligado a uma considerável homogeneidade de estrutura espectral (morfologia) do banco de dados em relação ao tipo de amostra estudada.

As faixas do espectro infravermelho mais marcantes foram de 1100-1260, 1420-1620, 1700-1860, 1900-2020, 2060-2220, 2260-2380 e a partir de 2420 nanômetros. Com base nesses pontos identificados foi possível correlacionar os comprimentos de onda com a presença de compostos orgânicos das células vegetais das plantas forrageiras estudadas.

Altos valores de absorvância em regiões distintas, perto de 1700, 2270 e a partir de 2440 nm, podem denotar a presença de bandas de combinação de C-H+O-H atribuídas a moléculas de celulose, hemicelulose, lignina e açúcares, assim como o segmento final do espectro NIR em 2488 nm

(Schwanninger et al., 2011; Lugassi et al., 2015; Yang et al., 2017; Saha et al., 2018), sendo essas bandas relacionadas as frações de FDN e FDA.

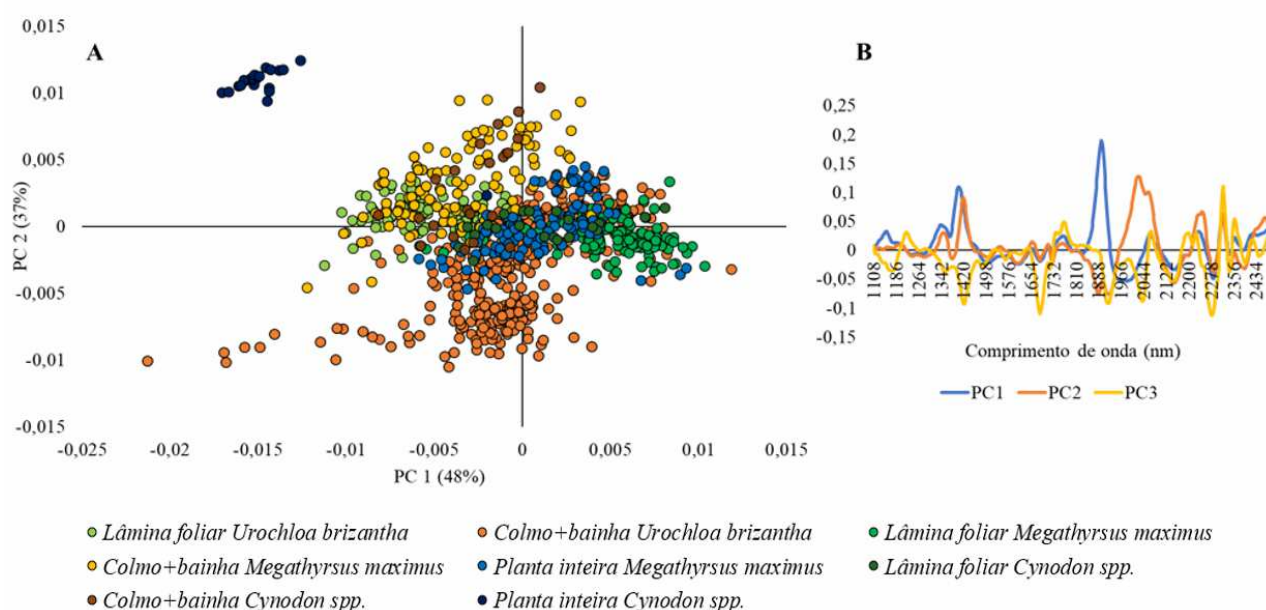


**Figura 2.** Gráfico de espectros médios brutos do conjunto amostral multi-espécies. Foi possível visualizar a diferença de absorbância das amostras de planta inteira de *Cynodon* spp., bem como as faixas do espectro infravermelho mais marcantes em 1100-1260, 1420-1620, 1700-1860, 1900-2020, 2060-2220, 2260-2380 e a partir de 2420 nanômetros.

A identificação de proteína em plantas é facilitada pela existência de moléculas com estrutura química bem delimitadas, sendo essas as ligações de primeiro e segundo *overtone*s de N-H em amidas e proteínas, com combinação de estiramentos de C-H e C-O, nos comprimentos de onda de aproximadamente 1400, 2054, 2148, 2186, 2200 e 2300 nm (Manley, 2014; Rushing et al., 2016; Saha et al., 2018; P. C. Williams, 2020). A identificação de bandas de absorbância relacionadas a fibra e proteína são importantes também na descrição da determinação da digestibilidade, sendo essa característica dependente dos dois componentes nutricionais citados.

A sobreposição de bandas pode ocorrer em regiões de 1400 e 1900 devido a ligações de estiramento de primeiro *overtone* de água (Saha et al., 2018) em espectros brutos. Ressalta-se aqui a importância de correção espectral como a de linha de base e derivadas, para uma melhor relação entre o sinal obtido pela radiação infravermelha e a caracterização do espectro, com presença de moléculas químicas específicas de componentes nutricionais estudados e presentes em células vegetais.

A análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais e seus respectivos *loadings* foram apresentados na Figura 3. Constatou-se que a componente principal 1 (PC1) e a componente principal 2 (PC2) explicaram 85% da variância do conjunto multi-espécies estudado, sendo 48% da PC1 e 37% para PC2. A PC3 representou os 15% restantes da variabilidade. Ao interpretar o gráfico de *scores* (Figura 3A) no sentido da PC1, evidenciou-se a homogeneidade na estrutura espectral do grupo de amostras a partir da análise dos seus espectros, demonstrando a viabilidade do estudo multi-espécies, exceto pelo grupo representado pelas amostras de planta inteira de *Cynodon* spp. Assim como no gráfico de espectros médios (Figura 2), essa diferença pode ser atribuída a menor intensidade de absorção da luz infravermelha, modificando assim a caracterização espectral desse grupo a partir da sua leitura pela NIRS.



**Figura 3.** A) Representação gráfica dos dados espectrais (*Scores*) do banco amostral multi-espécies, a

partir da análise de componentes principais. **B) Loadings** dos componentes principais 1, 2 e 3 do banco amostral estudado.

Na PC2, no quadrante inferior esquerdo, observou-se uma dispersão das amostras de colmo+bainha de *U. brizantha* e a predisposição para formação de grupos relativos aos componentes morfológicos das espécies estudadas, bem como a separação marcante do grupo de amostras de planta inteira de *Cynodon* spp. Os *loadings* da PCA apresentados na Figura 3B demonstraram informações complementares uns aos outros e permitiram o reconhecimento dos comprimentos de onda mais relevantes, explicitando uma maior contribuição de PC1 e PC2 nos comprimentos de onda de 1342-1498 nm, de PC1 em 1888 nm, de PC2 no intervalo de 1966-2122 nm e de PC3 em 2280 nm. Essas regiões encontradas de maior influência das PCs são caracterizadas principalmente pela existência de moléculas proteicas facilmente identificadas pela NIRS, devido à natureza das ligações químicas presentes.

#### ***Regressão multivariada dos dados – calibração e validação multi-espécies***

Os resultados da etapa de calibração, validação cruzada e validação externa multi-espécies são apresentados na Tabela 3. Foram obtidos os seguintes resultados: valores de  $R^2$  maiores que 0,80; número ótimo de variáveis latentes da PLS variando entre seis e oito; RERc, RERcv e RERv com resultados acima de 11; valores de RPD iguais ou maiores que 2,5; *Bias* próximos de zero; RMSE considerada satisfatória em cada etapa executada para o desenvolvimento e obtenção dos testes dos modelos preditivos, com valores aproximados entre esses.

O banco de dados utilizado no presente estudo proporcionou modelos confiáveis na calibração sobretudo pelo número de amostras utilizado, com ampla variedade de resultados e representando diferentes condições de cultivo das plantas forrageiras em questão. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a possibilidade de uso dos modelos de calibração multi-espécies para caracterizar quimicamente as amostras de *U. brizantha*, *Cynodon* spp. e *M. maximus* de forma conjunta, a partir do banco de dados explorado.

**Tabela 3.** Resultados da calibração, validação cruzada e validação externa de modelos multi-espécies desenvolvidos para proteína bruta, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de amostras de *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*.

Atributo nutricional	Calibração					Validação cruzada				Validação multi-espécies				
	VL	n	RMSEC (%)	R <sup>2</sup> c	RERc	RMSECV (%)	R <sup>2</sup> cv	RERcv	n	RMSEP (%)	R <sup>2</sup> v	RERv	RPD	Bias
PB (%)	8	730	1,3	0,89	13,1	1,4	0,88	12,7	378	1,4	0,89	12,4	3,0	0,0
DIVMS (%)	6	728	4,1	0,83	12,7	4,1	0,83	12,4	378	3,7	0,86	12,3	2,6	-0,2
FDN (%)	8	727	2,4	0,86	14,0	2,5	0,85	13,6	378	2,3	0,88	15,1	2,9	0,0
FDA (%)	7	730	2,7	0,84	12,4	2,8	0,83	12,1	376	2,8	0,84	11,8	2,5	-0,1

PB: proteína bruta, DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, VL: variável latentes n: número de amostras, RMSEC: raiz quadrada do erro médio de calibração, RMSECV: raiz quadrada do erro médio de validação cruzada, RMSEP: raiz quadrada do erro médio de predição, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação da calibração (R<sup>2</sup>c) e da validação (R<sup>2</sup>v), RER: razão de intervalo de erro da calibração (RERc) e da validação (RERv), RPD: desvio preditivo residual, Bias: erro sistemático.

As circunstâncias apresentadas corroboraram com o fato de que a calibração multivariada possibilita a análise simultânea de características nutricionais de plantas forrageiras com condições de aplicabilidade e reprodutibilidade. Após a calibração é importante que seja efetuada a validação cruzada, como uma etapa necessária para a determinação do número ótimo de variáveis latentes da regressão PLS, para que se evite a possibilidade de *overfitting* dos dados, ou seja, um ajuste excessivo desses (Shenk e Westerhaus, 1991), originando modelos confiáveis como os relatados na Tabela 3.

Um modelo pode apresentar um ajuste excelente, mas não uma boa previsão (M. M. C. Ferreira, 2015), portanto, é importante a etapa de validação. Essa etapa é imprescindível para a avaliação e comprovação da provável acurácia e da previsibilidade dos modelos desenvolvidos na calibração (Yang et al., 2017; Saha et al., 2018).

Os valores de RMSEC obtidos indicaram um bom ajuste dos modelos se aproximando dos valores de RMSEP (Tabela 3). Dessa forma, foram utilizados para avaliar o desempenho dos mesmos em relação aos dados de calibração ao considerar as diferenças entre valores medidos e preditos (Parrini et al., 2019, 2022), enquanto RMSEP considerou as amostras externas ao banco de desenvolvimento dos modelos. A RMSEC e a RMSEP foram ferramentas utilizadas para avaliar a veracidade (Botelho et al., 2017) dos modelos relatados no presente estudo.

É importante salientar que quanto menor o erro obtido, mais próximo provavelmente é a estimativa obtida pela NIRS daquele valor real medido na variável independente (Millmier et al., 2000), ou seja, da característica nutricional observada. A partir da interpretação dos valores dos erros quadráticos médios obtidos no presente estudo (RMSEC e RMSEP), notou-se que pode ser significativo considerar também os valores de erros dos métodos convencionais previamente conhecidos. Esse fato deve corroborar com a informação de que um modelo NIRS pode ser considerado para uso quando há um erro de ordem semelhante ao obtido na análise química de referência (Landau et al., 2006).

A escolha do número ótimo de VLs da regressão PLS para cada característica nutricional estudada variou de seis a oito (Tabela 3), e foi determinada pelo menor valor de RMSECV, fornecendo uma modelagem adequada dos dados. No momento da calibração dos modelos preditivos é importante evitar um superajuste, com o uso excessivo de VLs e consequente presença de ruído, bem como, de um subajuste, com poucas VLs e informações relevantes desconsideradas (M. M. C. Ferreira, 2015). O emprego adequado do número de variáveis latentes das PLS no presente estudo proporcionou a comprovação da eficácia dos modelos desenvolvidos para seu uso posterior e uma checagem da estabilidade dos mesmos (Agelet e Hurburgh, 2010; Simoni et al., 2021), considerando-os para avaliação nutricional de forrageiras tropicais pela NIRS.

A faixa de  $R^2c$  observada nos modelos variou de 0,83 a 0,89, e de 0,83 a 0,88 para  $R^2cv$  (Tabela 3). Esses resultados foram enquadrados na classificação de Tran et al. (2010) para modelos de boa qualidade e permitiu verificar a proporção da variância explicada das variáveis resposta na equação de regressão (Parrini et al., 2022). Ao testar os modelos multi-espécies na validação geral, o maior valor de  $R^2v$  obtido foi de 0,89 para a predição de PB, seguido de valores de  $R^2v$  de 0,88 para FDN,  $R^2v$  de 0,86 para DIVMS e  $R^2v$  de 0,84 para FDA (Tabela 3).

Esses modelos preditivos foram considerados como moderadamente bem-sucedidos e utilizáveis para aplicações práticas, inclusive com fins de pesquisa, segundo a categorização proposta por Williams et al. (2019), com valores entre 0,83 e 0,90. Além dessa faixa, os autores propuseram outros intervalos de variação:  $R^2 > 0,98$  como um modelo excelente e utilizável para qualquer

aplicação;  $R^2v$  entre 0,92-0,96 como um modelo utilizável na maioria das aplicações e como garantia de qualidade. O  $R^2$  também foi utilizado para ilustrar a resposta linear exibida nos gráficos de dispersão da etapa de validação (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Os valores de RERc e RERcv maiores que 12 apresentados permitiram a classificação como modelos de boa previsibilidade, enquanto os valores de RERv foram considerados utilizáveis para possíveis predições de dados quantitativos ao obter-se resultados acima de 11 (Tabela 3), conforme sugerido por Millmier et al. (2000). A escala proposta por esses pesquisadores considerou valores de RER entre 4-8 como modelos de distinção de valores altos e baixos; RER entre 8-12 como um modelo capaz de prever dados quantitativos e  $RER > 12$ , indicando um modelo com boa predição. A obtenção de uma RER com valor expressivo pode indicar predições precisas em modelos originados com bancos amostrais grandes, sendo que esses possuem uma significativa amplitude de variação.

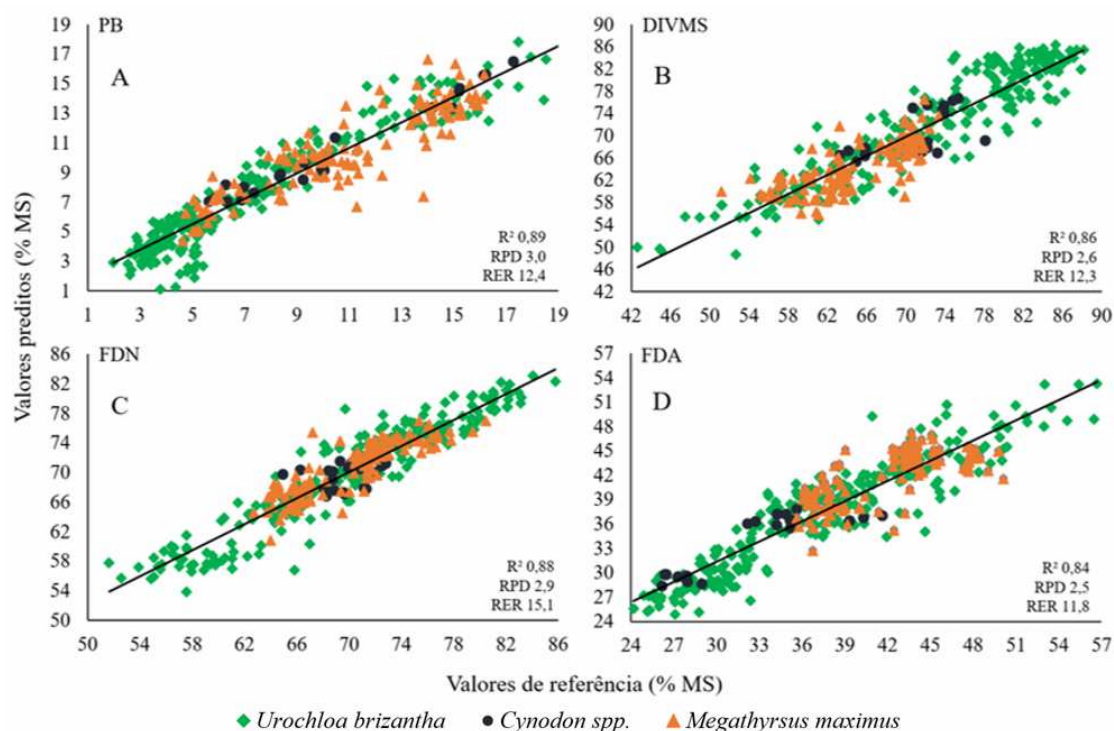
Ao considerar parâmetros relacionados apenas na etapa de validação externa, foram utilizados os indicadores RPD e *Bias* para a classificação dos modelos, sendo esses complementares um ao outro por representar a amplitude e a direção do erro, respectivamente.

A faixa de RPD obtida para a validação do modelos multi-espécies variou de 2,5 a 3,0 (Tabela 3), sendo considerados para predição quantitativa (Goldshleger et al., 2013). O RPD de um modelo de predição é o parâmetro mais robusto e adequado para a sua qualificação em termos absolutos, avaliando a sua veracidade (Ferreira et al., 2013; Botelho et al., 2017). Williams (2014) salientou que a utilização de modelos preditivos pela NIRS para a descrição do valor nutricional de plantas forrageiras, sementes e rações são amplamente utilizados com confiabilidade para o trabalho analítico científico e industrial. Porém, alguns fatores como preparação de amostra, problemas com as técnicas de referência e uma baixa variância intrínseca do conjunto amostral, podem dificultar a obtenção de RPD maiores que 3. Em consequência, o pesquisador sugeriu faixas de classificação adequadas e mais realistas para valores dessa figura de mérito, a partir da espectroscopia de infravermelho próximo na avaliação de forragens, rações e solos, considerando características como natureza física das amostras e fatores de funcionalidade. Os modelos obtidos no presente estudo para DIVMS (RPD 2,6), FDN (RPD 2,9) e FDA (RPD 2,5) se enquadraram nas faixas de utilização para triagem de amostras,

enquanto aquele apresentado para PB (RPD 3,0) foi considerado como bom, na faixa de controle de qualidade do material avaliado.

O erro sistemático ou *Bias* não foi constatado nos resultados da validação multi-espécies do presente estudo (Tabela 3), com valores entre -0,2 e 0,0. Essa faixa de variação não implica na presença de erro sistemático que possa acarretar subestimativa ou superestimativa de um modelo (Tran et al., 2010; Heil e Schmidhalter, 2021). A utilização de amostras externas à calibração no teste dos modelos desenvolvidos, ou seja, na etapa de validação, pode originar valores de *Bias* diferentes de zero (Wiedemair et al., 2019), o que também foi encontrado no presente estudo, reforçando que os modelos obtidos podem ser considerados acurados.

Para complementar a avaliação da etapa de validação externa, foram utilizados os gráficos de dispersão dos modelos de predições de PB, DIVMS, FDN e FDA, apresentados nas Figuras 4A, B, C e D respectivamente. Esses gráficos ilustraram as validações multi-espécies obtidas pelos valores medidos pelas análises de referência versus valores preditos pela NIRS, que demonstraram a relação linear e preenchimento da linha de regressão, corroborando com os bons valores de  $R^2$ . Na validação multi-espécies para PB (Figura 4A) foi possível verificar a melhor performance de predição ( $R^2$  0,89; RPD 3,0), com os pontos apresentados próximos a linha 1:1.



**Figura 4.** Gráficos de dispersão da etapa de validação externa multi-espécies para proteína bruta (A), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C), fibra em detergente ácido (D). Foi possível observar a distribuição dos dados em relação a linha de tendência, de forma satisfatória, corroborando com os valores de R<sup>2</sup> apresentados.

Ao interpretar os gráficos de dispersão em conjunto com as figuras de mérito previamente citadas na avaliação das validações multi-espécies, pôde-se verificar a possibilidade de uso dos modelos obtidos para a caracterização nutricional das forrageiras tropicais utilizadas e sua relação com as moléculas químicas identificadas pela espectroscopia de infravermelho próximo, discutidas a seguir.

A identificação e quantificação do teor de PB de uma planta forrageira pela NIRS (Figura 4A) tem relação com a constituição das moléculas proteicas, ou seja, com os compostos nitrogenados que possuem uma estrutura química marcante, bem definida (Brognia et al., 2018). No presente estudo, os melhores modelos de predições obtidos foram para esse componente nutricional (multi-espécies e espécie-específicas), concordando com os resultados de diversos pesquisadores ao avaliarem plantas forrageiras tropicais e temperadas, desde leguminosas a gramíneas de ciclo anual e perenes pela

espectroscopia NIR (Andueza et al., 2011; Lobos et al., 2013; Rushing et al., 2016; Yang et al., 2017; Saha et al., 2018; Baath et al., 2020c; Mazabel et al., 2020; Hernandez et al., 2021; Serafim et al., 2021; Parrini et al., 2022)). A facilidade de absorção da luz infravermelha e a posterior identificação de moléculas nitrogenadas se dá principalmente pelas ligações assimétricas de primeiro *overtone* de N-H e de segundo *overtone* em ligações N=H das proteínas em comprimentos de ondas na região de 1436-1464 nm, de C=O ligadas ao N-H da  $\alpha$ -hélice de moléculas proteicas em 2302-2344 nm ((Ferner et al., 2015; Rushing et al., 2016; Saha et al., 2018; Jin e Wang, 2019).

O sucesso da predição pela NIRS para a avaliação da DIVMS (Figura 4B) em forrageiras tropicais tem grande dependência das predições de proteína e fibra, uma vez que esses componentes nutricionais influenciam diretamente na digestibilidade da planta, da mesma forma que a identificação das moléculas químicas que os caracterizam. A predição de propriedades complexas de materiais vegetais, como a DIVMS, pode estar associada ao fato de que o espectro pode recuperar sinais das ligações químicas das moléculas existentes que fazem parte dessas propriedades (Alomar et al., 2009), como as de N-H das proteínas e de C, H e O das fibras. À vista disso, é possível fazer a correlação de que a maior presença de material digestível na matéria seca, ocorra maior absorbância nas regiões de comprimentos de onda que caracterizam as moléculas proteicas, por exemplo. Roberts et al. (2004) enfatizaram que apesar de não haver correlação direta da energia vibracional das moléculas reconhecidas no espectro infravermelho, a ligação com a composição química da planta no geral possibilita a predição de atributos como a DIVMS.

A fração fibrosa (Figuras 4C e 4D) de uma planta forrageira pode ser avaliada pela NIRS de forma conjunta nos comprimentos de onda perto da faixa de 1600-1800, e próximo de 2300 nm (Saha et al., 2018; Parrini et al., 2022). A presença de moléculas de celulose e hemicelulose (próximos de 1700 nm) dessa porção é identificada devido as características de ligações de estiramento de C-O-O, alongamento de C-H e combinações de C-C (Lugassi et al., 2015; Saha et al., 2018), enquanto a identificação da lignina (próximo de 1200 nm) pode ser devido às ligações fenólicas de primeiro *overtone* do alongamento O-H (Li et al., 2015). A análise da fração fibrosa é importante porque pode estar relacionada com a limitação do consumo e da saúde ruminal, sendo determinada com sucesso

em gramíneas, leguminosas e em dietas totais para ruminantes com a metodologia NIRS ((Yang et al., 2017; Parrini et al., 2018; Norman et al., 2020; Simoni et al., 2021; Parrini et al., 2022).

Fundamentado nos pontos discutidos anteriormente foi possível indicar a possibilidade de uso dos modelos multi-espécies desenvolvidos para a análise e triagem de amostras dos gêneros *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*, como indicado pelas figuras de mérito abordadas.

O sucesso de predições amplas com presença de várias espécies foi obtido no presente estudo e também relatados por alguns pesquisadores avaliando forragens frescas ou secas ((Andueza et al., 2011; Lobos et al., 2013; Baath et al., 2020c; Norman et al., 2020; Parrini et al., 2022). Foram encontrados resultados discutidos a seguir que podem servir de base para um melhor entendimento da dinâmica dos modelos preditivos em relação a cada espécie, a partir das validações espécie-específicas.

#### ***Regressão multivariada dos dados – validações espécie-específicas***

As validações espécie-específicas foram executadas a partir do modelo de calibração multi-espécies e os resultados são apresentados na Tabela 4. Ao fragmentar a validação externa multi-espécies, foi possível observar diferentes comportamentos em relação aos modelos obtidos e a espécie estudada, constatando que alguns deles não podem ser utilizados para a predição de determinada característica nutricional.

Os gráficos de dispersão representantes da etapa de validação externa espécie-específica dos conjuntos amostrais de *U. brizantha*, *Cynodon* spp. e *M. maximus* para cada atributo nutricional avaliado são apresentados nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

Foi possível verificar a diferença entre as validações também na interpretação dos gráficos, desde a distribuição dos pontos sobre a linha de tendência 1:1, o gap amostral e a alteração de comportamento linear das amostras. Ao interpretar um gráfico de dispersão obtido a partir da comparação entre os valores medidos nas análises químicas de referência versus os valores preditos pela NIRS, é desejável que haja um arranjo uniforme dos dados representados em relação a linha de

tendência, sendo que esses devem estar dentro dos limites de confiança dos parâmetros descritos (Fekadu et al., 2010).

**Tabela 4.** Estatística multivariada para as validações espécie-específicas dos modelos multi-espécies desenvolvidos para predição de proteína bruta, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de *Urochloa brizantha*, *Cynodon spp.* e *Megathyrus maximus*.

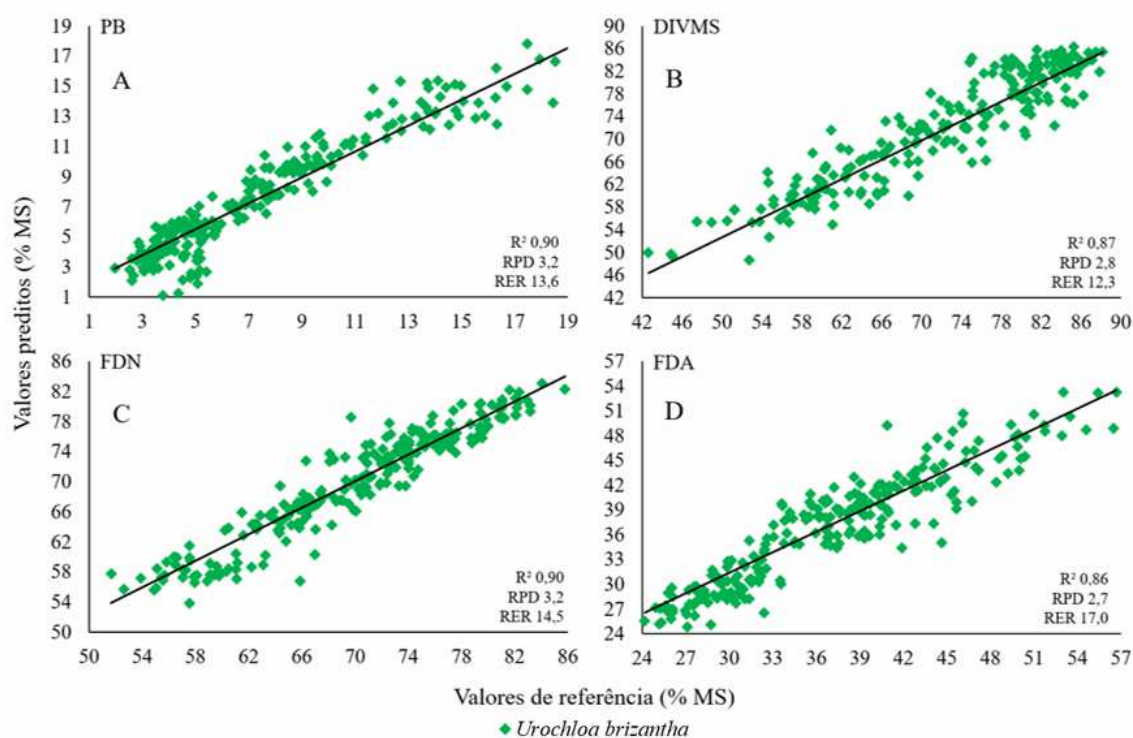
Conjunto amostral	Atributo nutricional (%)	Validações espécie-específicas					
		n	RMSEP (%)	R <sup>2</sup>	RER	RPD	Bias
<i>Urochloa brizantha</i>	PB	240	1,3	0,90	13,6	3,2	0,2
	DIVMS		3,9	0,87	12,3	2,8	0,0
	FDN	238	2,4	0,90	14,5	3,2	-0,1
	FDA		2,8	0,86	17,2	2,7	-0,2
<i>Cynodon spp.</i>	PB	21	0,9	0,94	12,7	4,3	0,3
	DIVMS		3,4	0,38	4,4	1,3	-0,3
	FDN		2,2	NS	3,7	0,9	-0,2
	FDA		2,6	0,70	6,0	1,9	1,1
<i>Megathyrus maximus</i>	PB	117	1,7	0,76	7,0	2,4	0,0
	DIVMS		3,4	0,54	6,6	1,5	-0,5
	FDN		2,1	0,75	8,7	2,0	0,4
	FDA		2,8	0,51	5,2	1,4	0,0

PB: proteína bruta, DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, n: número de amostras, RMSEP: raiz quadrada do erro médio de predição, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação, RER: razão de intervalo de erro, RPD: desvio preditivo residual, Bias: erro sistemático, NS: não significativo.

Os modelos obtidos na validação espécie-específica de *U. brizantha* apresentaram resultados que comprovam o seu emprego na análise nutricional alternativa dessa espécie forrageira, com valores de R<sup>2</sup>v maiores ou iguais a 0,86; RPD maiores que 2,7; RER maiores que 12 e Bias próximos de zero (Tabela 4). Os valores robustos alcançados corroboraram com as categorizações propostas por P. Williams et al. (2019) para R<sup>2</sup>, de P. Williams (2014) para RPD e de Millmier et al. (2000) para RER. O efeito da interação da radiação na região do infravermelho próximo com as moléculas químicas presentes nas amostras analisadas permitiu a aquisição dos modelos preditivos de qualidade.

A partir desses resultados apresentados, um melhor aproveitamento dos modelos preditivos originados de bancos amostrais grandes foi sugerido, indicando um número representativo de

amostras. Para *U. brizantha* esse ponto se destacou ao serem utilizadas cerca de 700 amostras para calibração multi-espécies e mais de 200 amostras para validação externa espécie-específica. Isto marcou a variabilidade e representatividade do banco, resultando em modelos confiáveis em ambas as estratégias de validação apresentadas. Dessa forma, não houve influência de fatores como manejo da pastagem em questão ou sistema de cultivo, o que divergia entre as espécies estudadas, pois as amostras de *U. brizantha* foram coletadas em fazendas de criação de bovinos em sistema de pastejo com lotação contínua, em diferentes localidades e estações do ano. Essas fontes de variação citadas contribuem para modelos mais robustos (Parrini et al., 2022). Os gráficos de dispersão da validação externa espécie-específica de *U. brizantha* são apresentados nas Figuras 5A, B, C e D e explicitaram os bons resultados obtidos para PB, DIVMS, FDN e FDA, respectivamente. Os dados amostrais foram dispostos na linha de tendência 1:1 de maneira uniforme, com essa sendo bem preenchida, representando a possibilidade de abrangência de valores para análise de amostras desconhecidas ao modelo.



**Figura 5.** Representação gráfica da etapa de validação externa espécie-específica de *Urochloa brizantha* para proteína bruta (A), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C) fibra

em detergente ácido (**D**). Foi possível observar a distribuição dos dados em relação a linha de tendência, de forma satisfatória, corroborando com os valores de  $R^2$  apresentados.

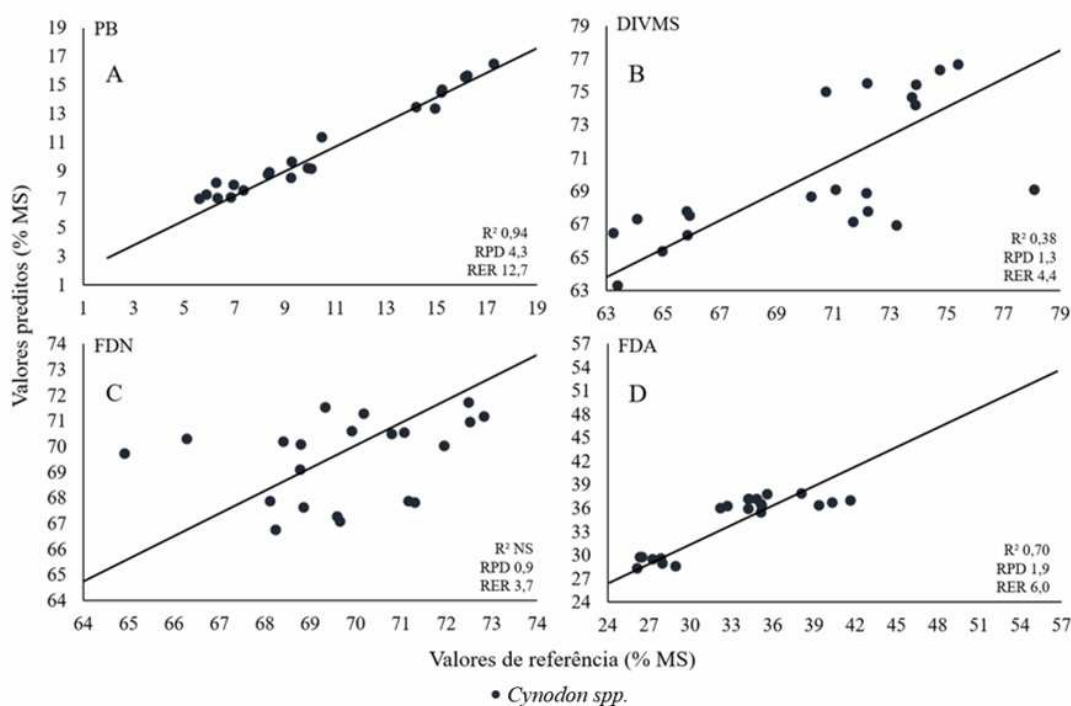
O modelo preditivo para a determinação de PB de *Cynodon* spp. pela NIRS foi considerado como utilizável para controle de qualidade ao apresentar resultados de  $R^2$  de 0,94; RPD de 3,0 e RER de 12,7. O modelo obtido para FDA foi classificado como suficiente para triagem de amostras, com valores de  $R^2$  de 0,70; RPD de 1,9 e RER de 6,0. Em contrapartida, os modelos desenvolvidos para DIVMS e FDN foram categorizados como inutilizáveis para a predição dessas características nutricionais da espécie em questão, com resultados de  $R^2$  0,38; RPD 1,3; RER 4,4 e  $R^2$  não significativo; RPD 0,9; RER 3,7 respectivamente (Tabela 4). A abordagem classificatória dos modelos foi realizada segundo as classificações de Williams et al. (2019), Williams (2014) e Millmier et al. (2000) para essas figuras de mérito.

A interpretação dos modelos de validação espécie-específicas obtidos para a avaliação nutricional de *Cynodon* sugeriu que esse grupo amostral perdeu representatividade ao ser validado individualmente, dentro de um conjunto com maior número de amostras de outras espécies. Isto pode estar ligada às características da espécie em si e suas peculiaridades e até ao pequeno banco de dados de *Cynodon* avaliado. O número amostral presente na calibração multi-espécies para esse grupo foi pequeno (aproximadamente 40 amostras), e ao validar de forma individual foram utilizadas apenas 21 amostras. É sabido que grandes conjuntos amostrais devem ser utilizados quando se visa o desenvolvimento de modelos preditivos para materiais que possuem alta complexidade e heterogeneidade de composição, como por exemplo forragens e grãos (Agelet e Hurburgh, 2010). É recomendado que modelos desenvolvidos com cinco ou menos VLs sejam validados com um conjunto externo de no mínimo 20 amostras, senão, é necessário utilizar um conjunto quatro vezes maior que o número de VLs do modelo (ASTM E 1655-00, 2000).

Outro fator que pode ter contribuído para o insucesso dos modelos preditivos de *Cynodon* spp. pode ter sido a caracterização espectral do grupo de amostras de planta inteira, sendo que essas apresentaram menor intensidade de absorção da luz infravermelha como constatado no gráfico de

espectros médios (Figura 2). A menor absorbância pode ter dificultado a recuperação dos sinais das ligações de moléculas orgânicas existentes, principalmente ao se analisar DIVMS e os teores de FDN e FDA. A digestibilidade é uma característica complexa, que para ser identificada pela NIRS depende do sucesso de modelos como os de PB e FDN (Roberts et al., 2004; Alomar et al., 2009). Além disso, a fração fibrosa representada pela FDN e FDA, pode ser de difícil detecção pelo infravermelho devido a sua complexidade bioquímica, e no presente estudo, isso pode ter sido intensificado para esse conjunto de dados ao se ter poucas amostras representativas de suas características. A identificação das moléculas proteicas, dados os resultados satisfatórios do modelo obtido para *Cynodon*, ressaltou a facilidade da determinação de PB em forragens pela NIRS. A marcante presença de ligações N-H colaborou para esse resultado, mesmo diante de um pequeno grupo amostral.

Os gráficos de dispersão da validação externa espécie-específica de *Cynodon* ssp. são apresentados nas Figuras 6A, B, C e D. Foi possível identificar um comportamento linear das amostras nos gráficos de DIVMS e FDN, corroborando com os valores baixos de  $R^2$ . Para os atributos nutricionais de PB e FDA, mesmo com os pontos amostrais próximos da linha 1:1, é necessário atentar ao gap entre esses. Os pontos vazios da linha de regressão representam valores que não foram representados pelas poucas amostras utilizadas na modelagem, dessa forma, pode acarretar falhas na análise de amostras futuras, tornando o modelo inutilizável e não representativo para novas avaliações.



**Figura 6.** Representação gráfica da etapa de validação externa espécie-específica de *Cynodon spp.* para proteína bruta (A), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C) fibra em detergente ácido (D). Foi possível observar a distribuição dos dados em relação a linha de tendência, corroborando com os valores de  $R^2$  apresentados, demonstrando a inutilidade dos modelos para DIVMS e FDN.

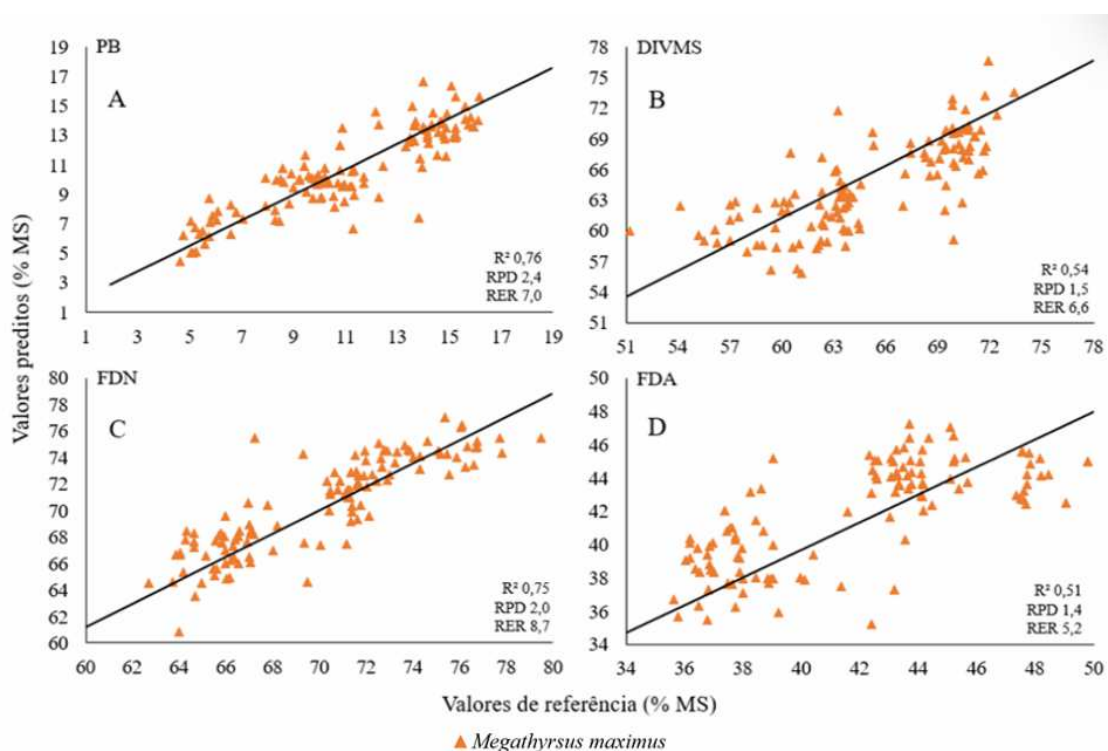
Os modelos obtidos para a predição dos teores de PB ( $R^2$  0,76; RPD 2,4; RER 7,0) e FDN ( $R^2$  0,75; RPD 2,0; RER 8,7) de *M. maximus* (Tabela 4) foram classificados como para triagem de amostras com  $R^2$  na faixa de 0,60-0,81 (aceitável para triagem e calibrações aproximadas) (Williams et al., 2019); RPD de 2,0 a 2,4 (triagem grosseira) (Williams, 2014); RER entre 7,0 (útil para distinção de valores altos e baixos) e 8,7 (predição de dados quantitativos) (Millmier et al., 2000). Essa triagem pode ser entendida como uma avaliação qualitativa entre valores altos e baixos. Em contrapartida, os modelos desenvolvidos para DIVMS ( $R^2$  0,54; RPD 1,5; RER 6,6) e FDA ( $R^2$  0,51; RPD 1,4; RER 5,2) foram desconsiderados para uso segundo critérios dos pesquisadores citados anteriormente.

Apesar do uso de um número intermediário de amostras de *M. maximus* em relação aos outros dois grupos de forrageiras, os resultados apresentados indicaram que pode ter ocorrido uma descaracterização das amostras. Os valores máximo e mínimo de cada atributo nutricional estudado

foram retratados pelos de *U. brizantha* (Tabela 2), diminuindo assim a sua representatividade. A partir disso, sugere-se estudos com um número semelhante de amostras entre espécies em modelos de natureza multi-espécies e seu posterior teste.

Em relação a caracterização pela NIRS, o número intermediário de amostras pode ter facilitado a correlação com os dados espectrais (comparado com o grupo de *Cynodon*) com identificação de moléculas proteicas pelas ligações de N-H e de carboidratos pelas de C-H+O-H (Saha et al., 2018), e dessa forma, obtiveram-se modelos satisfatórios para triagem dos componentes nutricionais PB e FDN de *M. maximus*. Os modelos de DIVMS e FDN apresentaram o mesmo problema citado para o grupo amostral de *Cynodon*, no qual a recuperação de sinais das ligações das moléculas necessárias para a modelagem pode ter sido afetada por fatores como dependência entre os resultados de PB e complexidade da parede celular.

Os gráficos da etapa de validação externa espécie-específica e os atributos nutricionais de *M. maximus* são apresentados nas Figuras 7A, B, C e D. Observou-se maior dispersão dos dados em relação a linha 1:1, o que concorda com os valores de  $R^2$  ilustrando um comportamento linear, e a necessidade de ajuste desses modelos.



**Figura 7.** Representação gráfica da etapa de validação externa espécie-específica de *Megathyrsus maximus* para proteína bruta (A), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (B), fibra em detergente neutro (C) fibra em detergente ácido (D). Foi possível observar a distribuição dos dados em relação a linha de tendência, corroborando com os valores de R<sup>2</sup> apresentados, demonstrando a inutilidade dos modelos para DIVMS e FDA.

Fatores como a inclusão de amostras de predição extremamente divergentes ao banco de calibração, seja por diferenças de manejo, área de cultivo, manipulação amostral, espécie e variações ambientais e de genética, podem trazer problemas ao uso da NIRS na avaliação de forragens, por não haver confiabilidade nos modelos preditivos desenvolvidos (Rushing et al., 2016). Sendo assim, é imprescindível investigar a melhor maneira de compor bancos de dados para a utilização da NIRS, e a inclusão das amostras mais divergentes no modelo pode ser uma alternativa para torná-lo mais representativo.

Foi expresso no presente estudo a importância de se avaliar de diferentes formas os modelos desenvolvidos na etapa de validação externa multi-espécies, com a intenção de se evitar predições, ou até mesmo a triagem, errôneas de quaisquer características nutricionais desejadas, pois algumas amostras podem não serem caracterizadas pelos modelos. De forma geral, no presente estudo, uma das principais evidências foi que ao utilizar um número grande de amostras de *U. brizantha*, em contraste com o banco intermediário de *M. maximus* e outro restrito de *Cynodon* spp., a maior tipificação descritiva e pela NIRS foi obtida para o primeiro grupo. Portanto, confirmando a importância do grande número de amostras.

Nas condições de desenvolvimento dos modelos apresentados sugerem-se duas maneiras da utilização da NIRS na rotina laboratorial na análise de gramíneas tropicais: 1) em modelos multi-espécies, para que esses apresentem confiabilidade, deve-se ter uma proporção equivalente ou aproximada entre o número de amostras de cada espécie inserida para abranger condições de cultivo, manejo, características intrínsecas, para que haja representatividade dentro do banco amostral e consequentemente, melhor qualidade de predição; 2) a partir do primeiro ponto citado, pode ser interessante o desenvolvimento de modelos de predição espécie-específicos, uma vez que o material

vegetal estudado possui alta variação de qualidade conforme a espécie cultivada, localidade de produção, manejo, entre outros fatores. Esses devem ser respeitados e tratados como características importantes a serem consideradas no momento da calibração e validação dos modelos preditivos.

## **Conclusão**

Os modelos desenvolvidos e validados com a abordagem multi-espécies permitem a avaliação nutricional de gramíneas tropicais *Urochloa brizantha*, *Cynodon* spp. e *Megathyrsus maximus*, para serem utilizados na análise de proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e digestibilidade *in vitro*, bem como, uma avaliação qualitativa entre valores altos e baixos. Entretanto, é de fundamental importância que a validação espécie-específica seja realizada para evitar que resultados superestimados ocorram, e que predições errôneas sejam levadas em consideração, uma vez que a precisão e utilidade dos modelos podem diminuir com a segmentação das validações em espécie-específicas. Para evitar essa queda do desempenho dos modelos, deve-se levar em consideração fatores como número amostral na calibração e validação e o tipo de atributo analisado. Consequentemente aos pontos citados, sugere-se que modelos individuais por espécies sejam mais interessantes e bem-sucedidos nas condições do presente estudo para a utilização da Espectroscopia de infravermelho próximo como alternativa rápida e acurada na nutrição de ruminantes.

## **Referências**

Abreu, J. G., V. M. Fernández-Cabanás, J. A. Rodrigues, M. Abreu, E. A. Ferreira, and W. M. Peixoto. 2022. Estimation of *in vitro* digestibility and fermentation of elephant grass by near infrared spectroscopy. *Grassl Sci.* doi:10.1111/grs.12383.

Agelet, L. E., and C. R. Hurburgh. 2010. A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Crit Rev Anal Chem.* 40:246–260. doi:10.1080/10408347.2010.515468.

Alomar, D., R. Fuchslocher, J. Cuevas, R. Mardones, and E. Cuevas. 2009. Prediction of the composition of fresh pastures by near infrared reflectance or interactance-reflectance spectroscopy. *Chil J Agric Res.* 69:198–206.

Andueza, D., F. Picard, M. Jestin, J. Andrieu, and R. Baumont. 2011. NIRS prediction of the feed value of temperate forages: Efficacy of four calibration strategies. *Animal*. 5:1002–1013. doi:10.1017/S1751731110002697.

AOAC International. 2000. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. (W. Horwitz and G. W. Latimer, editors.). AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg.

ASTM E 1655-00. 2000. *Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis*.

Baath, G. S., H. K. Baath, P. H. Gowda, J. P. Thomas, B. K. Northup, S. C. Rao, and H. Singh. 2020c. Predicting forage quality of warm-season legumes by near infrared spectroscopy coupled with machine learning techniques. *Sensors*. 20:1–15. doi:10.3390/s20030867.

Botelho, B. G., K. C. F. Dantas, and M. M. Sena. 2017. Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 167:44–49. doi:10.1016/j.chemolab.2017.05.004.

Bro, R., and A. K. Smilde. 2003. Centering and scaling in component analysis. *J Chemom*. 17:16–33. doi:10.1002/cem.773.

Brogna, N., A. Palmonari, G. Canestrari, L. Mammi, A. Dal Prà, and A. Formigoni. 2018. Technical note: Near infrared reflectance spectroscopy to predict fecal indigestible neutral detergent fiber for dairy cows. *J Dairy Sci*. 101:1234–1239. doi:10.3168/jds.2017-13319.

Buonaiuto, G., D. Cavallini, L. M. E. Mammi, F. Ghiaccio, A. Palmonari, A. Formigoni, and G. Visentin. 2021. The accuracy of NIRS in predicting chemical composition and fibre digestibility of hay-based total mixed rations. *Ital J Anim Sci*. 20:1730–1739. doi:10.1080/1828051X.2021.1990804.

Castro, J. J., J. K. Bernard, N. A. Mullis, and R. B. Eggleston. 2010. Brown midrib corn silage and Tifton 85 bermudagrass in rations for early-lactation cows. *J Dairy Sci*. 93:2143–2152. doi:10.3168/jds.2009-2891.

Catunda, K. L., A. C. Churchill, S. A. Power, and B. D. Moore. 2022. Near infrared spectroscopy calibration strategies to predict multiple nutritional parameters of pasture species from different functional groups. *J Near Infrared Spectrosc*. 096703352211147.

doi:10.1177/09670335221114746.

Available

from:

<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/09670335221114746>

Chen, J., R. Zhu, R. Xu, W. Zhang, Y. Shen, and Y. Zhang. 2015. Evaluation of *Leymus chinensis* quality using near-infrared reflectance spectroscopy with three different statistical analyses. PeerJ. 2015. doi:10.7717/peerj.1416.

Engel, J., J. Gerretzen, E. Szymańska, J. J. Jansen, G. Downey, L. Blanchet, and L. M. C. Buydens. 2013. Breaking with trends in pre-processing? TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 50:96–106. doi:10.1016/j.trac.2013.04.015.

Fekadu, D., S. Bediye, A. Kehaliw, T. Daba, G. Kitaw, and G. Assefa. 2010. Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for determination of chemical entities of natural pasture from Ethiopia. Agriculture and Biology Journal of North America. 1:919–922. doi:10.5251/abjna.2010.1.5.919.922.

Ferner, J., A. Linstädter, K. H. Südekum, and S. Schmidtleina. 2015. Spectral indicators of forage quality in West Africa's tropical savannas. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation. 41:99–106. doi:10.1016/j.jag.2015.04.019.

Ferreira, M. H., J. W. B. Braga, and M. M. Sena. 2013. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. Microchemical Journal. 109:158–164. doi:10.1016/j.microc.2012.03.008.

Ferreira, M. M. C. 2015. Análise exploratória dos dados. In: M. M. C. Ferreira, editor. Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações. Editora Unicamp, Campinas. p. 107–250.

Ferreira, M. M. C. 2015. Calibração – Métodos de Regressão. In: M. M. C. Ferreira, editor. Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações. Editora Unicamp, Campinas, SP. p. 251–358.

Goldshleger, N., A. Chudnovsky, and R. Ben-Binyamin. 2013. Predicting salinity in tomato using soil reflectance spectra. Int J Remote Sens. 34:6079–6093. doi:10.1080/01431161.2013.793859.

Goulart, R. S., R. A. M. Vieira, J. L. P. Daniel, R. C. Amaral, V. P. Santos, S. G. Toledo Filho, E. H. Cabezas-Garcia, L. O. Tedeschi, and L. G. Nussio. 2020. Effects of source and concentration of

neutral detergent fiber from roughage in beef cattle diets on feed intake, ingestive behavior, and ruminal kinetics. *J Anim Sci.* 98. doi:10.1093/jas/skaa107.

Heil, K., and U. Schmidhalter. 2021. An evaluation of different nir-spectral pre-treatments to derive the soil parameters C and N of a humus-clay-rich soil. *Sensors.* 21:1–24. doi:10.3390/s21041423.

Hernández, E. A., F. I. Juárez -Lagunes, M. Montero-Lagunes, J. F. Enríquez-Quiróz, R. Loeza-Limón, and J. M. Pinos-Rodríguez. 2021. Calibraciones de espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano para carbohidratos en pasto *Urochloa*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 8. doi:10.19136/era.a8nii.2874.

Hernandez, E. A., M. Montero-Lagunes, J. F. Enríquez-Quiróz, F. I. Juárez-Lagunes, R. Basurto-Gutierrez, and E. Ramírez-Rodríguez. 2021. Espectroscopia de reflectancia en el Infrarojo Cercano (NIRS) para estimar fracciones protéicas en pasto *Urochloa*. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 44:781–787. doi:10.35196/rfm.2021.4-a.781.

Jin, J., and Q. Wang. 2019. Evaluation of informative bands used in different PLS regressions for estimating leaf biochemical contents from hyperspectral reflectance. *Remote Sens (Basel).* 11:1–15. doi:10.3390/rs11020197.

Karayilanli, E., J. H. Cherney, P. Sirois, D. Kubinec, and D. J. R. Cherney. 2016. Botanical composition prediction of alfalfa–grass mixtures using NIRS: Developing a robust calibration. *Crop Sci.* 56:3361–3366. doi:10.2135/cropsci2016.04.0232.

Kennard, R. W., and L. A. Stone. 1969. Computer Aided Design of Experiments. *Technometrics.* 11:137–148. doi:10.1080/00401706.1969.10490666.

Landau, S., T. Glasser, and L. Dvash. 2006. Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: A review. *Small Ruminant Research.* 61:1–11. doi:10.1016/j.smallrumres.2004.12.012.

Li, X., C. Sun, B. Zhou, and Y. He. 2015. Determination of Hemicellulose, Cellulose and Lignin in Moso Bamboo by Near Infrared Spectroscopy. *Sci Rep.* 5. doi:10.1038/srep17210.

Lobos, I., P. Gou, S. Hube, R. Saldaña, and M. Alfaro. 2013. Evaluation of potential NIRS to predict pastures nutritive value. *J Soil Sci Plant Nutr.* 13:463–468.

Lugassi, R., A. Chudnovsky, E. Zaady, L. Dvash, and N. Goldshleger. 2015. Spectral slope as an indicator of pasture quality. *Remote Sens (Basel).* 7:256–274. doi:10.3390/rs70100256.

Manley, M. 2014. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials. *Chem Soc Rev.* 43:8200–8214. doi:10.1039/c4cs00062e.

Mazabel, J., M. Worthington, V. Castiblanco, M. Peters, and J. Arango. 2020. Using near infrared reflectance spectroscopy for estimating nutritional quality of *Brachiaria humidicola* in breeding selections. *Agrosystems, Geosciences and Environment.* 3. doi:10.1002/agg2.20070.

Millmier, A., J. Lorimor, J. Hurburgh C., C. Fulhage, J. Hattey, and H. Zhang. 2000. Near-infrared sensing of manure nutrients. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers.* 43:903–908. doi:10.13031/2013.2986.

Norman, H. C., E. Hulm, A. W. Humphries, S. J. Hughes, and P. E. Vercoe. 2020. Broad near-infrared spectroscopy calibrations can predict the nutritional value of >100 forage species within the Australian feedbase. *Anim Prod Sci.* 60:1111–1122. doi:10.1071/AN19310.

Paciullo, D. S. C., C. A. M. Gomide, C. R. T. Castro, R. M. Maurício, P. B. Fernandes, and M. J. F. Morenz. 2017. Morphogenesis, biomass and nutritive value of *Panicum maximum* under different shade levels and fertilizer nitrogen rates. *Grass and Forage Science.* 72:590–600. doi:10.1111/gfs.12264.

Parrini, S., A. Acciaioli, A. Crovetto, and R. Bozzi. 2018. Use of FT-NIRS for determination of chemical components and nutritional value of natural pasture. *Ital J Anim Sci.* 17:87–91. doi:10.1080/1828051X.2017.1345659.

Parrini, S., A. Acciaioli, O. Franci, C. Pugliese, and R. Bozzi. 2019. Near Infrared Spectroscopy technology for prediction of chemical composition of natural fresh pastures. *J Appl Anim Res.* 47:514–520. doi:10.1080/09712119.2019.1675669.

Parrini, S., N. Staglianò, R. Bozzi, and G. Argenti. 2022. Can grassland chemical quality be quantified using transform near-infrared spectroscopy? *Animals.* 12:1–12. doi:10.3390/ani12010086.

Paternostre, L., V. Baeten, B. Ampe, S. Millet, and J. de Boever. 2021. The usefulness of NIRS calibrations based on feed and feces spectra to predict nutrient content, digestibility and net energy of pig feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 281. doi:10.1016/j.anifeedsci.2021.115091.

Pinheiro, A. A., U. Cecato, T. O. J. D. A. Lins, T. Beloni, V. C. Piotto, and O. L. Ribeiro. 2014. Produção e valor nutritivo da forragem, e desempenho de bovinos Nelore em pastagem de capim-Tanzânia adubado com nitrogênio ou consorciado com estilosantes Campo Grande. *Semina: Ciências Agrárias.* 35:2147–2158. doi:10.5433/1679-0359.2014v35n4p2147.

Reddersen, B., T. Fricke, and M. Wachendorf. 2013. Effects of sample preparation and measurement standardization on the NIRS calibration quality of nitrogen, ash and NDFom content in extensive experimental grassland biomass. *Anim Feed Sci Technol.* 183:77–85. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.016.

Roberts, Craig A, J. Stuth, and P. Flinn. 2004. Analysis of Forages and Feedstuffs. In: C A Roberts, J. Workman Jr, and J. B. Reeves III, editors. *Near-infrared spectroscopy in agriculture.* p. 231–267.

Rushing, J. B., U. K. Saha, R. Lemus, L. Sonon, and B. S. Baldwin. 2016. Analysis of Some Important Forage Quality Attributes of Southeastern Wildrye (*Elymus glabriflorus*) Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Am J Analyt Chem.* 07:642–662. doi:10.4236/ajac.2016.79060.

Saha, U., R. A. Vann, S. Chris Reberg-Horton, M. S. Castillo, S. B. Mirsky, R. J. McGee, and L. Sonon. 2018. Near-infrared spectroscopic models for analysis of winter pea (*Pisum sativum* L.) quality constituents. *J Sci Food Agric.* 98:4253–4267. doi:10.1002/jsfa.8947.

Santos, G. O., R. T. de Faria, G. A. Rodriguês, G. de F. Dantas, A. B. Dalri, and L. F. Palaretti. 2017. Rendimento e qualidade de forragem de capim-marandu fertirrigado com água residuária de esgoto tratado e adubo mineral. *Acta Sci Agron.* 39:515–523. doi:10.4025/actasciagron.v39i4.32828.

Savitzky, A., and M. J. E. Golay. 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem.* 36:1627–1639. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

Schwanninger, M., J. C. Rodrigues, and K. Fackler. 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *J Near Infrared Spectrosc.* 19:287–308. doi:10.1255/jnirs.955.

Serafim, C. C., G. L. Guerra, I. Y. Mizubuti, F. A. B. de Castro, O. P. Prado-Calixto, S. Galbeiro, A. R. P. Parra, V. H. Bumbieris, S. F. N. Pértile, and F. C. de Almeida Rego. 2021. Use of near-infrared spectroscopy for prediction of chemical composition of Tifton 85 grass. *Semina:Ciencias Agrarias.* 42:1287–1302. doi:10.5433/1679-0359.2021v42n3p1287.

Shenk, J. S., and M. O. Westerhaus. 1991. Population Definition, Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Sci.* 31:469–474. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100020049x>.

Silva, J. G., S. P. Silva, L. A. Reis, D. H. A. M. Oliveira, D. H. Ribeiro, and R. C. O. Moura Júnior. 2022. Chemical composition of *Andropogon gayanus* cv. Planaltina predicted through NIRS and analyzed through wet chemistry. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 74:559–562. doi:10.1590/1678-4162-12478. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352022000300559&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352022000300559&tlng=en)

Simoni, M., A. Goi, M. de Marchi, and F. Righi. 2021. The use of visible/near-infrared spectroscopy to predict fibre fractions, fibre-bound nitrogen and total-tract apparent nutrients digestibility in beef cattle diets and faeces. *Ital J Anim Sci.* 20:814–825. doi:10.1080/1828051X.2021.1924884.

Smith, C., N. Cogan, P. Badenhorst, G. Spangenberg, and K. Smith. 2019. Field spectroscopy to determine nutritive value parameters of individual ryegrass plants. *Agronomy.* 9. doi:10.3390/agronomy9060293.

Souza, A. M., and R. J. Poppi. 2012. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Quim Nova.* 35:223–229. doi:<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039>.

Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. *Grass and Forage Science*. 18:104–111. doi:10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x.

Tran, H., P. Salgado, E. Tillard, P. Dardenne, X. T. Nguyen, and P. Lecomte. 2010. “Global” and “local” predictions of dairy diet nutritional quality using near infrared reflectance spectroscopy. *J Dairy Sci*. 93:4961–4975. doi:10.3168/jds.2008-1893.

Van den Berg, R. A., H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. Van der Werf. 2006. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 7:142. doi:10.1186/1471-2164-7-142.

Van Soest, P. J. 1994. Fiber and Physicochemical Properties of Feeds. In: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd edition. Cornell University Press. p. 140–155.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci*. 74:3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

Weiss, C. P., W. W. Gentry, C. M. Meredith, B. E. Meyer, N. A. Cole, L. O. Tedeschi, F. T. McCollum, and J. S. Jennings. 2017. Effects of roughage inclusion and particle size on digestion and ruminal fermentation characteristics of beef steers. *J Anim Sci*. 95:1707–1714. doi:10.2527/jas2016.1330.

Wiedemair, V., D. Langore, R. Garsleitner, K. Dillinger, and C. Huck. 2019. Investigations into the performance of a novel pocket-sized near-infrared spectrometer for cheese analysis. *Molecules*. 24:428. doi:10.3390/molecules24030428.

Williams, P. 2014. The RPD Statistic: A Tutorial Note. *NIR news*. 25:22–26. doi:10.1255/nirn.1419.

Williams, P., J. Antoniszyn, and M. Manley. 2019. Statistical terms for evaluation of accuracy and precision. In: *Near-infrared Technology: Getting the best out of light*. 1st ed. AFRICAN SUN MeDIA.

Williams, P. C. 2020. Application of chemometrics to prediction of some wheat quality factors by near-infrared spectroscopy. *Cereal Chem*. 97:958–966. doi:10.1002/cche.10318.

Williams, P. C., and D. C. Sobering. 1993. Comparison of Commercial near Infrared Transmittance and Reflectance Instruments for Analysis of Whole Grains and Seeds. *J Near Infrared Spectrosc.* 1:25–32. doi:<https://doi.org/10.1255/jnirs.3>.

Williams, P. C., and D. C. Sobering. 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near-infrared calibrations. In: A. M. C. Davies and Williams P. L., editors. *Near infrared spectroscopy: the future waves*. NIR Publications, Chichester. p. 185–188.

Yang, Z., G. Nie, L. Pan, Y. Zhang, L. Huang, X. Ma, and X. Zhang. 2017. Development and validation of near-infrared spectroscopy for the prediction of forage quality parameters in *Lolium multiflorum*. *PeerJ.* 5:3867. doi:[10.7717/peerj.3867](https://doi.org/10.7717/peerj.3867).

Zhang, G. J., Y. Wang, Y. H. Yan, M. H. Hall, D. J. Undersander, and D. K. Combs. 2021. Comparison of two *in situ* reference methods to estimate indigestible NDF by near infrared reflectance spectroscopy in alfalfa. *Heliyon.* 7. doi:[10.1016/j.heliyon.2021.e07313](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07313).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Técnicas de análise direta com pouca manipulação amostral são promissoras por serem mais rápidas e econômicas, e o emprego da espectroscopia de infravermelho próximo na avaliação de pastagens é uma alternativa interessante na nutrição animal, uma vez que pode ser uma ferramenta auxiliar em relação a análise bromatológica.

O monitoramento da qualidade nutricional de plantas forrageiras utilizadas na alimentação de ruminantes é imprescindível para o atender as suas exigências nutricionais. Nas condições do presente estudo, foi possível desenvolver e validar modelos de predição pela Espectroscopia NIR para avaliação de atributos nutricionais como proteína bruta, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido de *Cynodon* spp., *Megathyrsus maximus* e *Urochloa brizantha* de forma geral.

Nas condições apresentadas previamente, a caracterização da qualidade nutricional do capim Tanzânia em sistema de pastejo com lotação contínua, pode ser realizada de forma confiável utilizando os modelos preditivos desenvolvidos a partir da análise multivariada. Bancos amostrais espectralmente homogêneos permitem a exploração com maior acurácia, demonstrando a possibilidade de uso em diferentes componentes morfológicos da planta. Porém, pode ser interessante a inclusão de amostras de outras localidades aos modelos desenvolvidos para testar a robustez dos mesmos e aumentar a variabilidade espectral sem diminuição da precisão de calibração e validação.

Os modelos multi-espécies desenvolvidos a partir de um número amostral significativo, permitem a análise simultânea e triagem de amostras de muitas variedades de plantas com precisão. O emprego desses modelos mais amplos facilita a aplicação de tecnologia NIRS na análise de forragens, de várias espécies em conjunto. A utilização de poucas amostras de uma determinada espécie de gramínea para a predição de atributos mais complexos como a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, pode causar diminuição da acurácia de um modelo. Esse fato pode ocorrer, possivelmente, por uma descaracterização amostral, pela perda de representatividade daquele grupo.

Fatores de variabilidade como localidade, número amostral e manejo são de extrema importância e influenciam diretamente na calibração e validação de modelos preditivos pela NIRS. A associação de técnicas quimiométricas juntamente com o estudo detalhado desses fatores deve ser realizado constantemente para amenizar as influências negativas e tornar os modelos mais precisos. A utilização de técnicas quimiométricas permite a otimização do uso de modelos preditivos: ao fazer a análise de componentes principais,

pode-se aperfeiçoar a escolha do banco de dados, de forma a utilizar as amostras que melhor caracterizem esse para desenvolvimento do modelo de calibração propriamente dito.

No cenário exposto no presente estudo, para alcançar uma maior acurácia e precisão na avaliação nutricional de gramíneas pela espectroscopia NIR seriam recomendados modelos espécie-específicos, sendo que esses podem expressar da melhor forma possível as informações contidas e a variabilidade intrínseca de cada espécie estudada. Em contrapartida, modelos multi-espécies poderiam ser utilizados em laboratórios como um classificador de amostras com identificação falha, promovendo uma possível triagem dessas.

Dessa forma, a atualização dos bancos de dados com amostras externas e novas calibrações e validações devem ser realizadas continuamente com o objetivo de desenvolver modelos globais com a maior abrangência possível, sendo esses multi-espécies ou espécie-específicos.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Normas para preparação do artigo científico para submissão a publicação na revista Grassland Science

#### Author Guidelines

#### EDITORIAL REVIEW AND ACCEPTANCE

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are peer reviewed by a member of the Editorial Board and two anonymous referees. Final acceptance or rejection rests with the Editor-in-Chief, who reserves the right to refuse any material for publication.

Manuscripts should be written in a clear, concise, direct style. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of scientific content, the Editor-in-Chief and the Publisher reserve the right to modify typescripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader.

Further details are available [here](#).

#### SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

All articles submitted to the journal must comply with these instructions. Failure to do so will result in return of the manuscript and possible delay in publication.

A submission template in MS word is available from [here](#).

Manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/grssci>

For Authors unable to submit their manuscript online, please consult with the Managing Editor at the Editorial Office. Email: [grs-edit@grasslandscience.jp](mailto:grs-edit@grasslandscience.jp); Tel: 81 287 37 7684; Fax: 81 287 37 7684.

Manuscripts should be prepared as a Word (.doc or .docx) file, double-spaced on A4 paper with top, bottom and side margins of at least 30 mm. All pages should be numbered consecutively, beginning with the title page. Text pages should have numbered lines. Please use only standard fonts, such as Times, Times New Roman, or Arial for text; in particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Figures should be uploaded as separate files whereas tables should be included in the manuscript

file.

### **Covering Letter**

Papers are accepted for publication in the Journal on the understanding that the content has not been published or submitted for publication elsewhere. This must be stated in the covering letter.

The covering letter must also contain an acknowledgment that all authors have contributed significantly, and that all authors are in agreement with the content of the manuscript.

Authors must declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest.

If tables or figures have been reproduced from another source, a letter from the copyright holder (usually the Publisher), stating authorization to reproduce the material, must be attached to the covering letter.

### **ORCID**

As part of our commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. For **more information**.

### **Article Preparation Support**

**Wiley Editing Services** offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for **Preparing Your Article** for general guidance about writing and preparing your manuscript.

### **Author material archive policy**

Authors who require the return of any submitted material that is accepted for publication should inform the Editorial Office (at submission) or the Publisher (after acceptance). If no indication is given that author material should be returned, the Editorial Office and Wiley will dispose of all hardcopy and electronic material two months after publication.

### **ETHICAL CONSIDERATIONS**

In taxonomic papers, type specimens and type depositories must be clearly designated and indicated. Authors are required to deposit the name-bearing type material in internationally recognized institutions (not private collections).

When the research is carried out in areas for which research permits are required (e.g. nature reserves), or when it deals with organisms for which collection or import/export permits are required (e.g. protected species), the authors must clearly detail obtaining these permits in the Acknowledgments section.

## **PUBLICATION ETHICS GUIDELINES**

Grassland Science is committed to integrity in scientific research and recognizes the importance of maintaining the highest ethical standards. Please find attached the Best Practice Guidelines on Publication Ethics. Further information at COPE <http://publicationethics.org/>

English: <http://exchanges.wiley.com/ethicguidelines>

Chinese: [http://www.wiley.co.jp/journals/learning/  
PublicationEthic Simplified Chinese low.pdf](http://www.wiley.co.jp/journals/learning/PublicationEthicSimplifiedChineseLow.pdf)

Japanese: <http://www.wiley.co.jp/blog/pse/?p=29489>

## **STYLE OF THE MANUSCRIPT**

**Spelling:** The Journal uses US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the Merriam-Webster's Collegiate Dictionary.

**Units:** All measurements must be given in SI or SI-derived units.

**Abbreviations:** Abbreviations should be used sparingly – only where they ease the reader's task by reducing repetition of long, technical terms. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.

**Trade names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used.

**Scientific names:** Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. However, for well-known species, the scientific name may be omitted from the article title. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

## **PARTS OF THE MANUSCRIPT**

The length of an article (including references, tables and appendices) should not exceed 6 pages for research papers, 3 pages for short reports and 12 pages for review papers.

Manuscripts should be presented in the following order: (i) title page, (ii) abstract and key words, (iii) text, (iv) acknowledgments, (v) references, (vi) appendices, (vii) figure legends, (viii) tables (each table complete with title and footnotes) and (ix) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

A submission template in MS word is available from [here](#).

### **Title page**

The title page should contain (i) the title of the paper, (ii) the full names of the authors and (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with (iv) the full postal and email address, plus facsimile and telephone numbers, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent. The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote.

The title should be short and informative. Do not use abbreviations in the title.

See [Wiley's best practice SEO tips](#)

### **Abstract and key words**

All articles must have a brief unstructured abstract that states in 200-300 words (100-150 words for short report) or fewer the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. The abstract should not contain abbreviations or references.

Five or fewer key words (three or fewer for short report) should be supplied (for the purposes of indexing) below the abstract in alphabetical order.

### **Text**

Authors should use the following subheadings to divide the sections of their manuscript: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion.

### **Statistics**

Whenever possible, researchers should consult a statistician before designing an experiment and when analyzing results to avoid inappropriate descriptions. Describe statistical methods with enough detail to enable the reader to verify the reported results. Indicate the computer program used, if any.

### **Acknowledgments**

The source of financial grants and other funding must be acknowledged,

including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Personal thanks and thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

## References

References should be prepared according to the *Publication Manual of the American Psychological Association* (7<sup>th</sup> edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the **APA FAQ**. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

### Journal article

#### Example of reference with 2 to 7 authors

Beers, S. R. & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483-486.

https://doi: [10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

Ramus, F., Rosen, S., Dakin, S. C., Day, B. L., Castellote J. M., White, S., & Frith, U. (2003). Theories of developmental dyslexia: Insights from a multiple case study of dyslexic adults. *Brain*, 126(4), 841-865. https://doi: [10.1093/brain/awg076](https://doi.org/10.1093/brain/awg076)

#### Example of reference with more than 7 authors

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L. J., Goodman, R., Maughan, B., Carroll, J. (2004). Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association*, 291(16), 2007-2012. https://doi: [10.1001/jama.291.16.2007](https://doi.org/10.1001/jama.291.16.2007)

### Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

## Appendices

These should be placed at the end of the paper, numbered in Roman numerals and referred to in the text. If written by a person other than the author of the main text, the writer's name should be included below the title.

## Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Number tables consecutively in the text in Arabic numerals. Type tables on a separate sheet with the legend above. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

## Figure legends

Type figure legends on a separate sheet. Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

## Figures

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Each figure page should have name of author(s) and figure number in the bottom margin. Figures should be sized to fit within the column (80.5mm), intermediate (110mm) or the full text width (168mm).

Line figures should be supplied as sharp, black and white graphs or diagrams, drawn professionally or with a computer graphics package. Lettering must be included and should be sized to be no larger than the journal text. Individual photographs forming a composite figure should be of equal contrast, to facilitate printing, and should be accurately squared.

Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration.

If supplied electronically, graphics must be supplied as high resolution (at least 300 d.p.i.).

More advice on figures can be found at Wiley's guidelines for preparation of figures: [https://authorservices.wiley.com/asset/photos/electronic\\_artwork](https://authorservices.wiley.com/asset/photos/electronic_artwork)

## **guidelines.pdf**

### **Supporting Information**

Supporting Information may be attached to the manuscript at the submission stage. The material, the length of which is judged to be reasonable by the Editor-in-Chief, will be considered acceptable. It should be clearly referred to in other sections of the manuscript. Supporting Information will only be published with the online version of the article. Material will be posted online as is supplied by the author. There is no editing or proofreading during the production process. Wiley will not be responsible for the contents or functionality of any supporting materials supplied by the author.

### **MANUSCRIPTS FOR SHORT REPORTS**

Manuscripts for short papers should be organized basically in the same style as a research paper. However, the arrangement of the main text (introduction, materials and methods, results and discussion) need not necessarily follow that for a research paper, as long as the essence of the study or observation is properly described within the page allowance. The specific requirements for a short report are as follows:

- The abstract should be in 100-150 words or fewer.
- Three or fewer key words should be supplied.
- The length of an article (including references, tables and appendices) should not exceed 3 pages.

### **WORD PROCESSING**

- Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.
- Turn the hyphenation option off; include only those hyphens that are essential to the meaning.
- Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.
- Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for β (Greek beta).
- Use a tab, not spaces, to separate data points in tables. If you use a table editor function, ensure that each data point is contained within a unique cell (i.e. do not use carriage returns within cells).

### **PUBLICATION CHARGES**

All articles except invited articles are subject to the following publication charges. From 1 June 2022 publication charges will be collected in USD.

**JSGS members\***

A publication fee of USD500 is required for each review paper/original article/practical article and USD350 for each short report. Additional page charges will not be required.

**\*The corresponding author should be a JSGS member at the time of submission for their article to be entitled for the discounted amount. The discounted amount will not be applied if the corresponding author applies to be a JSGS member after his/her/their article is in production.**

**Non-JSGS members**

A publication fee of USD1,000 is required for each review paper/original article/practical article and USD700 for each short report. Additional page charges will not be required.

Authors will be requested to fill in the payment form at the time of the acceptance of their manuscript by the Publisher.

**Grassland Science Editorial Board members**

The first publication charge per year will be waived. Further publications will require a cost of USD500 for each review paper/original article/practical article and USD350 for each short report. Additional page charges will not be required.

**PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE****Wiley's Author Services**

Author Services enables authors to track their article through the production process to publication online. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The corresponding author will receive a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit **Author Services** (<https://authorservices.wiley.com/home.html>) for more details on online production tracking, and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

**Proofs**

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No

special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofscopyediting or must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed.

### **Early View**

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in an issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before allocation to an issue. After online publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at <http://www.doi.org/faq.html>.

### **Offprints**

Electronic PDF of your article will be available via **Author Services**. Article offprints are available for authors to purchase online. Please click on the following link and fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: <http://www.sheridan.com/wiley/eoc>.

### **Article Promotion Support**

**Wiley Editing Services** offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

### **Author Marketing Toolkit**

The **Wiley Author Marketing Toolkit** provides authors with support on how to use social media, publicity, conferences, multimedia, email and the web to promote their article.

## **COPYRIGHT, LICENSING AND OPEN ACCESS**

Accepted papers will be passed to Wiley's production team for publication. The author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Wiley's Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be asked to complete an electronic license agreement on behalf of all authors on the paper.

Japanese guidelines on how to use WALS are available [here](#).

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright transfer agreement (CTA), or under Open Access under the terms of a Creative Commons License. Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND Creative Commons License.

**Standard Copyright Transfer Agreement:** FAQs about the terms and conditions of the standard CTA in place for the journal, including standard terms regarding archiving of the accepted version of the paper, are available at: **Copyright Terms and Conditions FAQs**

Note that in signing the journal's licence agreement authors agree that consent to reproduce figures from another source has been obtained.

**Open Access Option:** You will have the option to choose to make your article open access after acceptance, which will be subject to an APC. You can [read more about APCs](#) and whether you may be eligible for waivers or discounts, through your institution, funder, or a country waiver.

**Self-Archiving Definitions and Policies:** Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions.

*Author Guidelines updated June 2022*

## **Anexo B**

### **Normas para preparação do artigo científico para submissão a publicação na revista Journal of Animal Science**

#### **Instructions to Authors**

*Journal of Animal Science (JAS)* publishes original research articles and invited review articles.

The mission of the American Society of Animal Science (ASAS) is to foster communication and collaboration among individuals and organizations associated with animal science research, education, industry, or administration "To discover, disseminate, and apply knowledge for sustainable use of animals for food and other human needs". The *Journal of Animal Science (JAS)*, which is published monthly by ASAS, accepts manuscripts presenting information for publication with this mission in mind. Its editorial policies are established by the editor-in-chief, managing editor, section editors, and editorial board, subject to review by the publications committee, board of directors, and the membership of ASAS. Views expressed in papers published in *JAS* represent the opinions of the author(s) and do not necessarily reflect the official policy of the institution with which the author is affiliated, ASAS, or the editor-in-chief.

The *JAS* is one of the most frequently cited peer-reviewed, agriculturally oriented research journals in the world, based on statistics published by ISI, Inc. (Philadelphia, PA). Its high impact factor attests to the quality standards maintained by the *JAS* editorial board and by authors who submit manuscripts for publication.

Authors retain the right to make an Author's Original Version (preprint) available through various channels, and this does not prevent submission to the journal, however, preprint servers where papers are formally reviewed and a decision is issued will be considered a previous publication and will not be accepted for review.

## **Manuscript Preparation (Style and Form)**

---

### **General**

All manuscripts submitted to the Journal must be double-spaced, 12-point Times New Roman font with 1 inch margin all around. Consecutive line and page numbers are required. Greek letters and special symbol are inserted using the symbol palette. Math equations are created with MathType or LaTeX.

The layout of the Journal is compatible with the OUP LaTeX template. More information can be found [here](#).

### **Title Page**

Required items on the page are,

1. Running title: short, succinct title no more than 45 keystrokes (characters plus spaces) in length with first and proper nouns capitalized
2. A title with the first word and proper nouns capitalized. Species of subject is encouraged. The title should be unique. The Journal does NOT support multipart series.
3. Full names (given name, middle initial, family name) of all authors
4. Institutions of the authors with location denoted with a symbol (\*, †, ‡, §, #, ||, and ¶) behind the author last name
5. Department, city, state, country, and postal code (Please note: the country must be listed for each affiliation)
6. Acknowledgements of consortia, grants, experiment station, or journal series number are given as a numerical footnote to the title

### **Lay Summary**

Authors are required to submit a Lay Summary as part of the article, in addition to the main text abstract. The Lay Summary should clearly summarize the focus and findings of the article for non-expert readers, and will be published as part of the article online and in PDF. The Lay Summary follows the Title Page in the main manuscript file and is limited to 200 words. Authors should avoid technical and discipline-specific abbreviations and language whenever possible to engage a larger non-scientific audience. Abbreviations are defined at first use.

### **Teaser Text**

Authors are required to provide 1-2 sentence(s) clearly describing the impact of the research described in the manuscript. Teaser text is used in the Journal table of contents to entice readers. It follows the Lay Summary in the main document file.

### **Abstract**

A single paragraph of no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces) that summarizes the results in an understandable form using statistical evidence (*P*-values). Abbreviations are defined at first use in the ABSTRACT and again in the body of the manuscript.

### **Key words**

List up to 6 words in alphabetical order and separated by a comma. Capitalize only proper nouns. Do NOT use abbreviations. Place at the end of the ABSTRACT.

### **List of Abbreviations**

A comprehensive list of all abbreviations used in the manuscript and their definition. An example format is MRF, myogenic regulatory factor. The List should not contain standard JAS Abbreviations, diets or treatment descriptions. Abbreviations must be defined at first use in the manuscript text but not in tables and figures unless unique.

Download an MS Excel spreadsheet of JAS standard abbreviations.

Plural abbreviations do not contain a final “s” because the context of an abbreviation implies whether it is singular or plural. Use of the standard 3-letter abbreviations for amino acids (e.g., Ala) is acceptable in JAS. Use of the internationally recognized chemical symbols for chemical elements (e.g., P and S) is acceptable in JAS. Except for N (not italicized), which is the recognized abbreviation for nitrogen and newton (unit of force), chemical symbols for elements are reserved for elements (e.g., C is for carbon and never for control).

### **Introduction**

A clear justification for conducting the research with a stated hypothesis and objective(s) is required. The rationale for the experiments should place the work into the context of existing literature. There is NO word limit on the section but brevity is encouraged.

### **Materials and Methods**

The American Society of Animal Science (ASAS) supports rigor, reproducibility and transparency in science and seeks to ensure that publications of the society reflect these values while also minimizing the burden on authors in preparation of scientific results for publication. There are many available resources describing principles and practices to enhance rigor, reproducibility, and transparency in science. Authors considering the Journal of Animal Science are encouraged to consult these resources when during preparation of their submissions.

The manuscript must include a statement of institutional animal care and use committee (IACUC), or country-specific equivalent, approval of all animal procedures. The *IACUC statement should appear as the first item in MATERIALS AND METHODS* and should specify which publicly available animal care and use standards were followed. A clear description of all biological, analytical and statistical procedures is required with each section denoted by a short descriptive title (i.e., Animals and sampling, Western blot, Immunocytochemistry, Experimental design and analysis, etc). Materials used must include the product name and vendor at first mention. When a commercial product is used as part of an experiment, the manufacturer name and location must be given parenthetically and the generic name should be used subsequently. No <sup>TM</sup>, ®, or © symbols should be used. Sex, breed, age, species are included in the animal descriptions. Provide evidence of assay validation, or suitable

published reference, as well as inter/intra-assay CV, as needed. Appropriate statistical methods should be used with experimental unit defined. Numbers of biological and experimental replicates should be stated. State the threshold for significance ( $P < 0.05$ ) and definition of tendency if used.

### **Results**

Experimental results are presented in tables and figures. The results should contain sufficient detail to allow the reader to interpret the data. Quantitative measures of significance ( $P$ -values) should be presented. Authors may use either absolute  $P$ -values or a defined significance level as long as usage is consistent.

### **Discussion**

The section contains the interpretation of the results. It should be clear and concise, address the biological mechanisms and their significance, and integrate the results into existing literature. The Discussion may offer an interpretation that is consistent with the data. Do NOT include any reference to tables and figures or include  $P$ -values in the Discussion. Authors have the option to create a single RESULTS AND DISCUSSION section.

### **Disclosures**

All JAS editors, ASAS staff, ASAS Board of Directors, and submitting authors must disclose any actual or potential conflicts of interest that may affect their ability to objectively present or review research or data. A succinct statement detailing any perceived conflict of interest is required. If none, please indicate as such.

### **Literature Cited**

Papers in the section must be published or 'in press'. All references must include the doi, if available. Authors are encouraged to use the most recent reference style for the Journal of Animal Science in the reference management software of their choice. The format for references are

#### **Journal articles**

Perez, V. G., A. M. Waguespark, T. D. Bidner, L. L. Southern, T. M. Fakler, T. L. Ward, M. Steidinger, and J. E. Pettigrew. 2011. Additivity of effects from dietary copper and zinc on growth performance and fecal microbiota of pigs after weaning. *J. Anim. Sci.* 89:414–425. doi:10.2527/jas.2010-2839.

#### **Abstracts**

Centon, J. R., G. E. Erickson, T. J. Klopfenstein, K. J. Vander Pol, and M. A. Greenquist. 2007. Effects of roughage source and level in finishing diets containing wet distillers grains on feedlot performance. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 2):76. (Abstr.) doi:10.2527/jas.2006-354.

#### **Books and chapters in books**

AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Robinson, P. H., E. K. Okine, and J. J. Kennelly. 1992. Measurement of protein digestion in ruminants. In: S. Nissen, editor, *Modern methods in protein nutrition and metabolism*. Academic Press, San Diego, CA. p. 121–127.

### **Conference proceedings**

Bailey, E. A., J. R. Jaeger, J. W. Waggoner, G. W. Preedy, L. A. Pacheco, and K. C. Olson. 2012. Effect of weaning method on welfare and performance of beef calves during receiving. *Proc. West. Sec. Amer. Soc. Anim. Sci.* 63:25–29.

### **Tables and Figures**

Tables and figures should be placed at the end of the manuscript, following the references. Tables and figures should be numbered consecutively, in the order in which they are cited in the manuscript. Tables and figures must be prepared so they can be understood without referring to information in the body of the manuscript.

#### **Tables**

1. Tables can be created in Word using the Table function.
2. All tables should be editable in the manuscript file.
3. Each table should be placed on a separate page. Tables should fit on a single 8.5 X 11-inch page in either landscape or portrait view.
4. Every column should include a heading.
5. Align column values to the decimal point whenever possible. Columns containing a mix of values, symbols and words may be aligned to the center of the heading. Columns using  $\pm$  should be aligned to the symbol.
6. Units (e.g., kg) are separated from descriptor by a comma.
7. Numerals are used to reference footnotes. Each footnote should begin on a new line immediately below the table.
8. Lowercase, superscript letters are used to indicate significant differences among means within a row or column and to reference footnotes explaining how to interpret the letters.
9. The order of footnotes below the table is numbers first followed by letters and special symbols.
10. If reporting significance, the column heading is P-value.

#### **Figures**

1. Figures should be submitted as JPEG, TIFF, or EPS files only.
2. Figures must be high-resolution with a minimum resolution of 300 dpi and a maximum resolution of 600 dpi.
3. All figures must have a title and legend. The legend should be a brief description that allows the reader to interpret the results.

4. Axes descriptors are separated from units (i.e., kg, mm, mL) by a comma. Do NOT place units within parentheses.
5. Use Times New Roman font no smaller than 8 point following figure reduction.

### **Supplemental Material**

Authors may include supplemental tables, figures, or other forms of supplemental material (e.g., detailed data sets, Excel files, videos). Supplemental materials should be included in a separate file.

Supplemental materials must undergo peer review and, thus, should be in a format that is easily accessible (i.e., does not require dedicated software or software that is not generally available) to most reviewers and readers.

### **Additional Usage Notes**

#### **Quantitative Trait Loci and DNA Markers, Microarray and RNA Sequencing Data**

Authors of papers that contain original quantitative trait loci (QTL) or DNA marker association results for livestock are strongly encouraged to make their data available in an electronic form to one of the publicly available livestock QTL databases after the manuscript appears on the JAS Advance Articles website (<https://academic.oup.com/jas/advance-articles>). Similarly, for microarray data and RNA sequencing data, authors are encouraged to submit a complete dataset to an appropriate database.

### **Commercial Products**

The use of names of commercial products should be minimized. When a commercial product is used as part of an experiment, the manufacturer name and location (city and state if in the US; city, administrative region or district [e.g., province], and country if outside the US) or a website address must be given parenthetically at first mention in text, tables, and figures. The generic name should be used subsequently. No <sup>TM</sup>, ®, or © symbols should be used.

### **Policies and Procedures of JAS**

---

The mission of the American Society of Animal Science (ASAS) is to “foster the discovery, sharing, and application of scientific knowledge concerning the responsible use of animals to enhance human life and wellbeing” (see ASAS’s History and Mission).

The *Journal of Animal Science*, which is published monthly by ASAS, accepts manuscripts presenting information for publication with this mission in mind.

The Editor-in-Chief, Managing Editor, and Section Editors establish the editorial policies of *JAS*, subject to review by the publications committee and ASAS Board of Directors. The views expressed in articles published in *JAS* represent the opinions of the author(s) and do not necessarily reflect the official policy of the institution with which an author is affiliated, the ASAS, or the *JAS* Editor-in-Chief. Authors are responsible for ensuring the accuracy of collection, analysis, and interpretation of data in manuscripts and ultimately for guaranteeing the veracity of the contents of articles published in *JAS*.

### **General Usage**

- For general style and form, authors should follow that recommended in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 7th ed. Council of Science Editors, Reston, VA.
- For American English spelling and usage, consult Merriam-Webster Online.
- For SI units, the National Institute of Standards and Technology provides a comprehensive guide.
- Abbreviations are not used to begin sentences. Words must be spelled out.
- “Sex” should be used, rather than “gender.” Gender is more appropriate for describing a role in society than for describing biological sex.
- The hierarchy for brackets and parentheses is [ ( ) ]. For example,  $[(2 + 3) \times (12 \div 2)] \times 2 = 60$ .
- Meat shear force should be expressed in kilograms (kg), although newtons (N) may also be acceptable.
- Report time using the 24-h system (e.g., 1410 h rather than 2:10 p.m.).
- Use italics to designate genus and species.
- Names of muscles are not italicized.
- Specify the basis (i.e., as-fed or dry matter) for dietary ingredient and chemical composition data listed in text or in tables. Similarly, specify the basis for tissue composition data (e.g., wet or dry basis).
- Calculations of efficiency should be expressed as output divided by input (i.e., gain:feed, not feed:gain).
- A diet is a feedstuff or a mixture of feedstuffs; a ration is the daily allotment of the diet.
- The word “Table” is capitalized and never abbreviated.
- Except to begin a sentence, the word “Figure” should be abbreviated to “Fig.”
- Except to begin a sentence, experiment and equation should be abbreviated to Exp. And Eq., respectively, when preceding a numeral (e.g., Exp. 1).
- Avoid jargon unfamiliar to scientists from other disciplines. Do not use the term “head” to refer to an animal or group of animals. Instead, use animal, sow, ewe, steer, heifer, cattle, etc.
- Avoid bi- as a prefix because of its ambiguity; biweekly means twice per week and once every 2 weeks.
- Breed and variety names should be capitalized (e.g., Landrace and Hereford).
- Trademarked or registered names should be capitalized, but no <sup>TM</sup> or ® symbols should be used.

### Contact Information

For information on the scientific content of the journal, contact the Editor-in-Chief, Dr. Elisabeth Huff Lonergan, American Society of Animal Science, P.O. Box 7410, Champaign, Illinois 61826-7410; e-mail: sealy@vt.edu.

For questions about submitting a manuscript and ScholarOne Manuscripts, contact Bailey Hanna; e-mail: jas.editorialoffice@jeditorial.com.

For assistance with author proofs, contact OUP Author Support; e-mail: jnls.author.support@oup.com.

### **Care and Use of Animals**

All authors submitting to *JAS* must complete the Care and Use of Animals form certifying that any research that involves animals has followed established standards for the humane care and use of animals and must specify which standards were used. Only investigations that have followed high standards for the humane care and use of animals in research will be reported in *JAS*. Also, the manuscript must include a statement of institutional animal care and use committee (IACUC), or country-specific equivalent, approval of all animal procedures. The IACUC statement should appear as the first item in MATERIALS AND METHODS and should specify which publically available animal care and use standards were followed (e.g., ADSA-ASAPSA Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching; Primary Industries Ministerial Council, Model code of practice for the welfare of animals: the sheep). The manuscript should describe anesthetics, analgesics, tranquilizers, and care taken to minimize pain and discomfort during preoperative, operative, and postoperative procedures. If research requires discomfort to the animals or stressful conditions, justification for these conditions must be evident in papers published in *JAS*.

### **Protection of Human Subjects**

In the United States, federally funded or regulated research involving human subjects must comply with Code of Federal Regulations (CFR), Title 45 Public Welfare, Part 46 Protection of Human Subjects. However, CFR 45 Part 46.101(b) exempts some research from these regulations. For all exempted research and other details, see this page. Exempted research includes that in which the only involvement of human subjects is for “taste and food quality evaluation and consumer acceptance if 1) wholesome foods without additives are consumed or 2) a food is consumed that contains a food ingredient at or below the level and for a use found to be safe, or agricultural chemical or environmental contaminant at or below the level found to be safe, by the Food and Drug Administration or approved by the Environmental Protection Agency or the Food Safety and Inspection Service of the U.S. Department of Agriculture.” If human subjects were used in exempted research and the research was in compliance with CFR 45 Part 46, or equivalent regulations where the research was conducted, authors must state in MATERIALS AND METHODS or acknowledgements that they were in full compliance. If human subjects were used in research that was not exempted in CFR 45 Part 46, or equivalent regulations where the research was conducted, authors must certify that the research received prior approval from an appropriate Institutional Review Board.

### **Types of Articles**

#### **Research Articles**

Results of research contained in manuscripts submitted to *JAS* must not have been published in or submitted to another peer reviewed scientific journal prior to receiving a decision from *JAS*. Previous presentation at a scientific meeting or the use of data in field-day reports or similar documents, including press publications or postings to personal or departmental websites, does not preclude the publication of such data in *JAS*.

Articles simultaneously posted to websites and submitted to *JAS* should carry a disclaimer on the website that this version of the paper has not undergone *JAS* peer review and is not to be considered the final published form of the article. If the article has been published in *JAS*, the author should include the complete *JAS* citation.

Because *JAS* holds the copyright to articles it publishes, posting altered *JAS* articles that are represented as exact duplicates of the published version constitutes copyright violation.

**Special Topics.** This Section includes Biographical or Historical Sketches and Contemporary Issues in the animal sciences. Contemporary Issues include topics such as environmental concerns, legislative proposals, systems analysis, and various “newsworthy” scientific issues. Even though Contemporary Issues manuscripts do not have to include original data, authors’ assertions should be substantiated with references to established information from credible published sources. Special Topics papers will be subject to peer review in a manner similar to other *JAS* submissions. Because of the nature of these manuscripts, their format may vary from that of standard scientific articles, although the ABSTRACT must be consistent with keystroke (characters and spaces) limitations defined earlier in this document. Teaching articles should be submitted to Translational Animal Science.

**Short Communications.** *JAS* will consider publication of short communications that are hypothesis-driven and report novel results. Submitted papers should follow *JAS* guidelines for headings and format, but are restricted to 2 figures or tables or a combination of 1 figure/1 table. The words “Short Communication:” should begin the title. The final published paper will be published Open Access using the current pricing structure.

**Technical Notes.** A technical note is used to report a new method, technique, or procedure of interest to *JAS* readers. When possible, a technical note should include a comparison of results from the new method with those from previous methods, using appropriate statistical tests. The advantages and disadvantages of the new procedure should be discussed. When typeset for publication, a technical note shall not exceed 10 pages (approximately 18 Microsoft Word document pages), including tables and figures. “Technical note:” shall be the first portion of the title of such manuscripts. The review process for a technical note will be the same as that for other manuscripts. Information that is more extensive or detailed than necessary for a Technical note may be presented in an e-supplement (see E-Supplements).

**Letters to the Editor.** A letter judged suitable for publication will be printed in a “Letters to the Editor” section of *JAS*. The purpose of this section is to provide a forum for scientific exchange relating to articles published in *JAS*. To be acceptable for publication, a letter must adhere to the following guidelines. 1) Only a letter that addresses matters of science and relates to information published in *JAS* will be considered. In general, a letter should not exceed 5,000 keystrokes and should contain no more than 5 citations. 2) A letter should provide supporting evidence based on published data for the points made or must develop logical scientific hypotheses. A letter based on conjecture or unsubstantiated claims will not normally be published. No new data may be presented in a letter. 3) The Editor-in-Chief will evaluate each letter and determine whether a letter is appropriate for publication. If a letter is considered appropriate, the author(s) of original *JAS* article(s) will be invited to write a letter of response. Normally both letters will be published together. 4) All letters will be subject to acceptance and editing by the Editor-in-Chief and editing by a technical editor.

### **Review Articles**

The journal publishes invited review articles only.

### **Submission of Manuscripts**

Manuscripts should be submitted electronically through ScholarOne Manuscripts. Authors with questions about using the electronic manuscript submission system or, for technological reasons, are unable to submit manuscripts electronically may contact [jas.editorialoffice@jgeditorial.com](mailto:jas.editorialoffice@jgeditorial.com).

### **Copyright and Permission to Publish**

Authors shall complete the Manuscript Submission form for each new manuscript submission. The form is completed during the submission process through ScholarOne Manuscripts. Authors, such as United States government employees, who are unable to grant copyright to ASAS for material that was produced as an official duty of a U.S. Government employee is considered public domain. Authors of *JAS* manuscripts who include material (usually tables or figures) taken from other copyrighted sources must secure permission from the copyright holders and provide evidence of this permission at the time the manuscript is submitted to *JAS* for review. Tables or figures reproduced from the work of others, or data extracted from the work of others and used to construct summary tables (or figures) or for meta-analyses, must include an acknowledgement of the original source in a footnote or legend and, when appropriate, a complete citation in LITERATURE CITED. The ASAS and the author(s) of *JAS* articles agree to publish under the Creative Commons CC BY-NC-ND license; the author agrees that ASAS will manage any requests for rights not granted under this license.

## **Review of Manuscripts**

### **General Procedures**

The Editor-in-Chief and Section Editors determine whether manuscripts are suitable for publication in *JAS*. All communications about a submitted manuscript should maintain confidentiality. Each manuscript will undergo closed scientific review. Manuscripts that are not written clearly, concisely, and coherently, or they are not consistent with guidelines in the current Instructions for Authors, *Journal of Animal Science* may be rejected without review. Authors whose first language is not English are urged to have an editing service review their manuscripts before they are submitted to *JAS*. For your convenience, JASEdits is available from ASAS.

Oxford University Press partners with Enago, a leading provider of author services. Prospective authors are entitled to a discount of 30% for editing services at Enago, via this link: <https://www.enago.com/pub/oup>. Enago is an independent service provider, who will handle all aspects of this service, including payment. As an author you are under no obligation to take up this offer. Language editing is optional and does not guarantee that your manuscript will be accepted. Edited manuscripts will still undergo peer review by the journal.

### **Appeals**

If a manuscript is rejected, the decision may be appealed to the Editor-in-Chief if the author(s) believe(s) that the judgment was erroneous or biased. A letter presenting the reasons for the appeal should be sent to the Editor-in-Chief within 30 days of the date on the rejection notification. The Editor-in-Chief will decide whether to accept or deny the appeal.

### **Revisions**

All revised manuscripts must be returned to Section Editors via *JAS* Scholar-One Manuscripts. Authors will be permitted 15 days to revise and return manuscripts classified as Minor Revision and permitted 35 days to revise and return manuscripts classified as Major Revision. In most cases manuscripts will not be allowed more than a single revision. Unsatisfactory or incomplete revisions will be a cause for rejection of the manuscript.

Manuscripts that exceed the revision-option deadline will be withdrawn. If withdrawn for lack of timely revision, they may be resubmitted for new review. Requests for extensions must

be communicated to the Section Editor responsible for the manuscript before the revision-option expires.

### **Peer Review Policy**

This journal operates single-anonymised peer review, meaning that the Author's identity is known to the Editor and to the Reviewers, but that the Reviewers' identities are known only to the Editor and are hidden from the Authors. For full details about the peer review process, see Fair editing and peer review.  
OUP author FAQs.

### **Papers in Press, Author Proofs, and Publication Charges**

#### **Advanced Papers**

To facilitate earlier disclosure of research results, accepted manuscripts will be assigned a digital object identifier (doi) and posted to the *JAS Advance Articles* site in the form in which they are accepted. The authors bear the primary responsibility for the content of manuscripts posted to the Papers in Press site. Articles posted to this site have not been professionally edited and typeset, and do not represent the final, published form of the manuscript. The date a complete monthly issue of *JAS* is posted online is the official publication date for *JAS* articles. However, the date on which a manuscript is posted to the *JAS-Advanced Papers* website may represent the official public disclosure date for the contents of the article. Authors concerned about intellectual property issues, such as patents and disclosure dates, should seek legal counsel before submitting manuscripts to a scientific journal.

#### **Author Proofs**

Proofs of all manuscripts will be provided to the corresponding author and should be read carefully and checked against the typed manuscript. Accuracy of the author proof is the sole responsibility of the author(s). Authors will receive a link to the PDF proof of their manuscript on our online system by email, and it is essential that a current email address is supplied with all manuscripts. Proofing instructions will accompany the PDF file but the proof should be checked immediately upon receipt and uploaded in accordance with covering instructions. Only essential corrections should be made at the proof stage. Excessive author changes made at the proof stage may result in a \$250 surcharge for additional typesetting, and they may be deemed so excessive that the manuscript will be returned to the Section Editor for additional scientific review.

#### **Publication Fees**

The journal has two options available for publication: open access (OA) and conventional page charges. For conventional publication, the charge is \$150 per printed page if at least one author is an ASAS member; the page charge is \$300 when no author is a member of ASAS.

#### **Open Access**

Journal of Animal Science offers the option of publishing under either a standard licence or an open access licence. Please note that some funders require open access publication as a condition of funding. If you are unsure whether you are required to publish open access, please do clarify any such requirements with your funder or institution. You will need to pay an open access charge to publish under an open access licence.

Should you wish to publish your article open access, you should select your choice of open access licence in our online system after your article has been accepted for publication.

Details of the open access licences and open access charges.

Please note that you may be eligible for a discount to the open access charge based on society membership. Authors may be asked to prove eligibility for the member discount.

### **Policies Regarding Number Usage for *Journal of Animal Science***

Number usage in *JAS* is consistent with the Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers.

### **Additional Resources**

JAS Professional Writing Service  
JAS Ethics Policy  
Revision Checklist for Authors  
Guidelines for Creating Tables in Microsoft Word  
Quality Guidelines for JAS Figures  
Biographical Sketches

If you have trouble viewing any of these PDF files please be sure you have the most current version of Adobe Reader.

### **Ethics**

Authors should observe high standards with respect to publication ethics as set out by the Commission on Publication Ethics (COPE). Falsification or fabrication of data, plagiarism, including duplicate publication of the authors' own work without proper citation, and misappropriation of the work are all unacceptable practices. Any cases of ethical misconduct are treated very seriously and will be dealt with in accordance with the COPE guidelines.

### **Third-party copyright**

In order to reproduce any third party material, including tables, figures, or images, in an article authors must obtain permission from the copyright holder and be compliant with any requirements the copyright holder may have pertaining to this reuse. When seeking to reproduce any kind of third party material authors should request the following:

- non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal;
- electronic rights, preferably for use in any form or medium;
- the right to use the material for the life of the work; and
- world-wide English-language rights.

It is particularly important to clear permission for use in the online version of the journal, and we are not able to accept permissions which carry a time limit because we retain journal articles as part of our online journal archive.

Further guidelines on clearing permissions.

### **Third-party content in Open Access papers**

If you will be publishing your paper under an Open Access license but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

*Title of content*

*Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]*

Permissions regarding reuse of OUP material

Self-archiving policy

### **Preprint Policy**

Authors retain the right to make an Author's Original Version (preprint) available through various channels, and this does not prevent submission to the journal. For further information see our Online Licensing, Copyright and Permissions policies. If accepted, the authors are required to update the status of any preprint, including your published paper's DOI, as described on our Author Self-Archiving policy page.

### **Availability of Data and Materials**

---

Where ethically feasible, *JAS* strongly encourages authors to make all data and software code on which the conclusions of the paper rely available to readers. We suggest that data be presented in the main manuscript or additional supporting files, or deposited in a public repository whenever possible. Information on general repositories for all data types, and a list of recommended repositories by subject area, is available [here](#).

### **Data and Software Citation**

---

*JAS* supports the Force 11 Data Citation Principles and requires that all publicly available datasets be fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a digital object identifier (DOI). Data citations should include the minimum information recommended by DataCite:

[dataset]\* Authors, Year, Title, Publisher (repository or archive name), Identifier

\*The inclusion of the [dataset] tag at the beginning of the citation helps us to correctly identify and tag the citation. This tag will be removed from the citation published in the reference list.

Software citations should include the minimum information recommended by the FORCE11 Software Citation Implementation Group:

Author/Developer, Release date, Title, Publisher (repository or archive name), Identifier

If there is an article describing the software, it is recommended to cite both the software and the article.