



Efeito da temperatura da amostra na análise de fezes por infravermelho próximo (NIR) com tecnologia de transmissão por arranjo de diodo¹

Stephen Prince², Marco Aurélio Delmondes Bomfim³, Jay Angerer⁴, Luis Orlando Tedeschi⁵

¹ Projeto colaborativo Embrapa/Texas A&M University

² Pesquisador, Texas A&M Agrilife/Blackland Research and Extension Center. e-mail: sprince@brc.tamus.edu

³ Pesquisador, Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. mabomfim@cnpc.embrapa.br

⁴ Pesquisador, Texas A&M Agrilife/Blackland Research and Extension Center. e-mail: jangerer@brc.tamus.edu

⁵ Pesquisador, Texas A&M University. e-mail: luis.tedeschi@tamu.edu

Resumo: A tecnologia NIR com transmissão por arranjo diodo permite que espectros sejam obtidos em amostras fecais frescas reduzindo do tempo de análise. Entretanto, o alto teor de umidade associado à temperatura no momento da coleta dos espectros, pode afetar a precisão e acurácia das estimativas. O objetivo com este trabalho foi avaliar o efeito de quatro temperaturas (5, 10, 15 e 21°C) das amostras fecais no momento da coleta dos espectros em equipamentos NIR com tecnologia de transmissão por arranjo de diodo. As amostras experimentais foram scaneadas e seu conteúdo em matéria pré-seca fecal (MPSF) estimado usando uma equação calibrada com espectros coletados em temperatura ambiente (21°C). Foram avaliadas a precisão e a acurácia, a distância de Mahalanobis e as diferenças espectrais. Somente nas amostras à 21°C o modelo conseguiu prever adequadamente os valores de MPSF. Houve dissimilaridade espectral entre amostras a 5 e 10°C em relação ao conjunto utilizado no desenvolvimento da equação. A subtração espectral demonstrou que as principais alterações na absorção de radiação infravermelha foram nas regiões entre 1.100-1.300nm, 1.300-1.500 e logo após 1.500nm. Conclui-se que a redução na temperatura da amostra afeta o espectro e reduz a acurácia e precisão das estimativas quando a equação é desenvolvida a partir do scaneamento de amostras em temperatura ambiente.

Palavras-chave: água, fnirs, matéria seca fecal, nirs, espectros

Effect of sample temperature on fecal analysis using diode array NIR technology

Abstract: The collection of fecal spectra for analysis in near infrared has been conducted using dry and ground samples. The NIR technology with diode array transmission allows to collect spectra in samples as received in the laboratory reducing the analyses time. However, the high moisture content associated to temperature in the time of sample scanning may affect the precision and accuracy of prediction. This work was carried out to evaluate the effect of three temperatures (5, 10, 15 and 20°C) in the time of spectra collection in diode array transmission NIR equipment on the precision and accuracy of field DM content (60°C). Equation for field DM was calibrated using spectra collected at room temperature (21°C) in the same equipment and used to predict field DM of experimental samples. We evaluated the precision and accuracy, spectral distance (Mahalanobis) and the spectral differences. The prediction was suitable only on samples scanned at 21°C. Samples scanned at 5 and 10°C showed high spectral differences than those collected at 15 or 20°C when compared with the calibration spectra. The spectral subtraction showed that temperature affected the absorption of NIR in regions 1,100-1,300nm, 1,300-1,500 and around the upper level of 1,500nm. Reducing the temperature affect the spectra and reduce the precision and accuracy of prediction when the equation is calibrated by room temperature samples.

Keywords: water, fnirs, fecal dry matter, nirs, spectra

Introdução

O aumento do uso de computadores pessoais e o concomitante desenvolvimento de procedimentos de estatística multivariada no campo da quimiometria resultaram em um aumento do uso da espectroscopia da reflectância do infravermelho próximo (NIRS) aplicada à produção animal. Uma das aplicações mais interessantes do NIRS na nutrição de ruminantes é o monitoramento nutricional de animais de pastejo através da análise do espectro das fezes (Lyons e Stuth, 1992). Apesar da coleta de espectros ser realizadas em poucos segundos, equipamentos que usam a tecnologia de transmissão monocromática exigem preparação da amostra (secagem e moagem) implicando em tempo e custo.

A mais recente tecnologia de NIR, com transmissão por arranjo diodo, permite que espectros sejam obtidos em amostras sem processamento prévio, contribuindo para a redução do tempo de análise e de envio de resultados aos clientes. Entretanto, as amostras fecais frescas de grandes ruminantes podem conter mais de 80% de umidade, situação em que o espectro é consistentemente influenciado pela água, que absorve fortemente a radiação infravermelha (Büning-Pfaue, 2003). Ademais, tem sido demonstrado na literatura que espectros de amostras com



alta umidade podem ser alterados em função da temperatura, bem como influenciar outras moléculas com as quais a água estabelece ligações químicas. Uma vez que as amostras fecais chegam ao laboratório resfriadas ou congeladas, o estabelecimento de protocolo para coleta de espectros depende da determinação dos efeitos da temperatura no momento da coleta do espectros sobre a precisão e acurácia das estimativas.

O objetivo com este trabalho foi avaliar o efeito de quatro temperaturas da amostra no momento da coleta dos espectros de fezes frescas em equipamentos NIR com tecnologia de transmissão por arranjo diodo.

Material e Métodos

Amostras fecais de bovinos adultos alimentados com dietas completas compostas de feno e concentrado foram coletadas nas instalações da fazenda experimental da Texas A&M University, em College Station, Texas, USA, compostas e congeladas a -20°C. A amostra composta foi descongelada e espectros de dez replicatas foram coletados em duplicata a 5, 10, 15 e 21°C em equipamento NIR com transmissão por arranjo diodo, Perten DA7200 (Perten Instruments, Hägersten, Sweden). Após a última coleta, as amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada por 48 horas a 60°C para obtenção da matéria pré-seca fecal (MPSF).

Espectros de 149 amostras fecais obtidos de bovinos oriundos de diferentes sistemas de produção foram coletados em temperatura ambiente (21°C), no mesmo equipamento, e uma equação para predição da MPSF foi desenvolvida utilizando o algoritmo dos mínimos quadrados parciais (PLS1) por meio do software GRAMS® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Aos dados foi aplicado como pre-tratamento a correção multiplicativa de sinal (MSC). A validação do modelo foi realizada por meio do procedimento de validação cruzada (CV). Os parâmetros da equação calibrada foram: $R^2 = 0,95$, $RMSD = 0,67$, $SECV = 0,66$, $Bias = -0,007$.

Para avaliação do efeito da temperatura foram comparados os valores preditos e observados por meio do teste T e correlação de Pearson. O viés e o quadrado médio do erro de predição (MSEP) foram determinados utilizando o software *Models Evaluation System* (Tedeschi, 2006). As avaliações de espectros foram feitas por meio da subtração e da determinação da distância de Mahalanobis entre as amostras experimentais e as da calibração obtida por meio do software GRAMS® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Resultados e Discussão

Os valores observados e preditos de MPSF em cada temperatura de coleta dos espectros, com suas respectivas avaliações de acurácia e precisão, estão apresentados na Tabela 1. Como as amostras experimentais são replicatas de uma amostra composta, os valores observados e seus desvio-padrões são os mesmos para todos os tratamentos (média de dez determinações). A comparação das médias preditas e observadas pelo teste T e pela análise de correlação de Pearson demonstraram que somente nas amostras a 21°C o modelo conseguiu predizer adequadamente o valor de MPSF (Tabela 1). As estimativas de viés e de MSEP confirmam a redução na acurácia e precisão do modelo com a diminuição da temperatura das amostras.

Tabela 1. Avaliação de acurácia e da precisão das estimativas de matéria pré-seca fecal (MPSF) em função da temperatura com seus respectivos valores de viés, quadrado médio do erro da predição (MSEP), Teste T e coeficiente de correlação (r) entre valores observados e preditos.

Temperatura	Observado	Predito	Viés	MSEP	Teste T [§]	r [§]
05°C	15,34 ± 0,13	14,27 ± 0,23	1,2642	1,6644	-14,742**	-0,0370 ^{NS}
10°C	15,34 ± 0,13	14,67 ± 0,17	0,8596	0,7750	-16,703**	0,1148 ^{NS}
15°C	15,34 ± 0,13	15,10 ± 0,17	0,4358	0,2663	-3,003**	0,5710*
21°C	15,34 ± 0,13	15,81 ± 0,49	-0,2710	0,2288	2,062 ^{NS}	0,6582**

[§]NS- não significativo (P>0,05), *P<0,01, **P<0,001

Embora as amostras tenham sido as mesmas, diferenças espectrais significativas foram observadas em função da temperatura de análise. A avaliação de similaridade espectral por meio da distância de Mahalanobis demonstrou significativa diferença entre os espectros utilizados na calibração da equação e aqueles das amostras escaneadas a 5 e 10°C. Por outro lado, a média foi menor que 3,0 para as amostras com espectros coletados a 15 e 21 °C (Figura 1 (a)), demonstrando similaridade com os espectros da equação.

A subtração entre os espectros das amostras em temperatura ambiente (21°C) e os outros coletados nas diferentes temperaturas demonstrou que as diferenças estão concentradas nas regiões 1.100-1.300nm, 1.300-1.500 e logo após 1.500nm (Figura 1 (b)). Nas duas primeiras regiões houve uma redução na absorção de radiação e na última um aumento com a redução da temperatura em relação às amostras coletadas a 21°C.

Mitsumoto et al. (2000) avaliando amostras de carne bovina nas mesmas temperaturas do presente trabalho, também observaram grandes diferenças espectrais nas amostras escaneadas a 5 e 10°C. Alterações espectrais na região entre 1.300-1.700nm também foram identificadas por Iwamoto et al. (1995). Segundo estes



autores estas mudanças ocorreram em três distintos picos de absorção de NIR pela água. Estes picos correspondem a diferentes estados: água livre, moléculas com um grupo ligado em uma ponte de hidrogênio e moléculas com dois grupos OH participando na ligação de hidrogênio. O pico devido à água livre reduziu enquanto que os outros dois decresceram com a redução da temperatura.

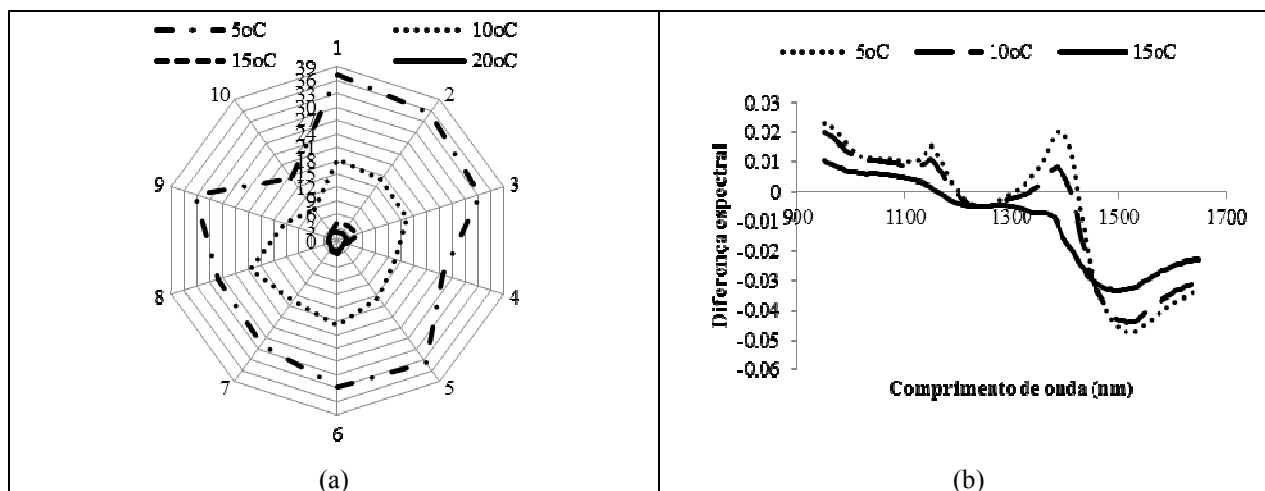


Figura 1. (a) Distância Mahalanobis entre espectros em função da temperatura e (b) diferenças espectrais entre as amostras escaneadas em diferentes temperaturas e aquelas em temperatura ambiente

Portanto, a exemplo do que ocorreu nos trabalhos de Iwamoto et al. (1995) e Maeda et al. (1995), com a diminuição na temperatura da amostra houve uma mudança nos picos de absorção de água, reduzindo na região da água livre (1100-1.500nm) e aumentando na região logo após 1.500nm. Estas mudanças parecem estar relacionadas às alterações no estado da água com a mudança de temperatura e suas relações com outras moléculas próximas, uma vez que a temperatura influencia as forças intermoleculares, modificando os espectros vibracionais. Segundo Büning-Pfaue, (2003) esta é a principal razão das alterações nos espectros de NIR em resposta à mudanças de temperatura. Como a espectroscopia usa a absorção pelas ligações O-H, C-H e S-H, e a água tem alta densidade de pontes de H, alterações que afetam a absorção de radiação pela água podem afetar todo o espectro. Isto explica a grande diferença espectral observada na Figura 1 (a) e a inadequação da equação calibrada a partir de espectros coletados em temperatura ambiente para prever os valores de MPSF de amostras com diferentes temperaturas.

Conclusões

A redução na temperatura da amostra afeta o espectro e reduz a acurácia e precisão das estimativas, quando a equação é desenvolvida a partir de amostras escaneadas em temperatura ambiente. Portanto, a temperatura deve ser levada em consideração na análise de amostras fecais frescas em NIR.

Literatura citada

- BÜNING-PFAUE, HANS. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy, **Food Chemistry**, v.82, p.107-115, 2003.
- IWAMOTO, M.; KAWANO, S.; OZAKI, J. An overview of research and development of near infrared spectroscopy in Japan. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.3, p.179-189, 1995.
- LYONS, R.K.; STUTH, J.W. Fecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle. **Journal of Range Management**, v.45, p.238-244, 1992.
- MAEDA, H.; OZAKI, Y.; TANAKA, M. et al. Near Infrared spectroscopy and chemometrics studies of temperature-dependent spectral variations of water: relationship between spectral changes and hydrogen bonds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.3, p.191-201, 1995.
- MITSUMOTO, M.; OZAWA, S.; MITSUHASHI, T. The influence of sample temperature on the determination of moisture and fat content in beef longissimus by near infrared spectroscopy. In: INTERNATIONAL CONFERENCE, NEAR INFRARED SPECTROSCOPY, 9., 2000, Chichester, UK. **Proceedings...** Chichester: UK: NIR Publications, 2000. p.805-807.
- TEDESCHI, L. O. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agricultural Systems**, v.89, p.225-247, 2006.