

Avaliação de Parâmetros de Qualidade de Trigo por Espectroscopia no Infravermelho Próximo

Casiane Salete Tibola
Martha Zavariz de Miranda
Eliana Maria Guarienti

Introdução

O mercado de grãos diferenciados está em expansão, e as indústrias apresentam novas demandas para segregação e rastreabilidade de produtos, visando a atender ao consumidor cada vez mais exigente em qualidade. Entretanto, análises de qualidade tecnológica e de contaminantes, que orientem a segregação e a rastreabilidade, são limitadas pela disponibilidade de laboratórios, de analistas e de equipamentos, além do elevado custo de reagentes e de materiais de laboratório. Isto é especialmente relevante para trigo, que demanda análises de multiparâmetros para caracterizar a aptidão tecnológica e a inocuidade.

O trigo é a principal fonte de nutrientes para a população mundial. No Brasil, o consumo diário em 2013 foi de 56,3 kg/habitante/ano (De Mori, 2016). A definição do padrão oficial de classificação do trigo no Brasil foi estabelecida no Regulamento Técnico do Trigo (Brasil, 2010). Além de exigências de normativas oficiais, cada produto derivado de trigo necessita ter parâmetros físico-químicos e reológicos específicos, para que seja obtido o máximo de rendimento e o produto final tenha características de qualidade desejadas pelo consumidor.

Na pós-colheita de trigo, um dos fatores limitantes na escolha do método de análise é a duração do teste, pois quando esse é demorado (como a alveografia, a farinografia e o teor de glúten), dificulta a segregação por qualidade. Assim, uma das grandes demandas em pós-colheita de grãos é a seleção de método rápido e eficaz para segregação e rastreabilidade de lotes comerciais, que possa ser empregado na recepção em unidades armazenadoras. Atualmente, a segregação é feita em função da classificação comercial da cultivar. Entretanto, este indicativo de qualidade, muitas vezes, não se confirma, em função de fatores de cultivo como adubação, controle fitossanitário, manejo do solo, condições climáticas, manejos pré e pós-colheita, entre

outros. Portanto, somente após a adequada avaliação da qualidade na pós-colheita pode-se definir a segregação.

Neste contexto, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) tem sido utilizada como método para prever a qualidade de diferentes produtos agrícolas, por causa da rapidez de análise, da mínima preparação de amostra e do baixo custo. Esta metodologia fundamenta-se na absorção de luz infravermelha por compostos orgânicos, que apresentam características de absorção específicas, causando vibrações nas ligações de hidrogênio induzidas pelo calor. Essas reações permitem que os componentes sejam quantificados por meio de equações de calibração. Na região do infravermelho, com comprimento de onda (λ) entre 800 nm e 2.500 nm, radicais como -OH, -NH e -CH vibram fortemente. Como estes grupos são componentes típicos de alimentos (água, proteína, lipídios e carboidratos), o método NIRS é particularmente adequado para análises nestes produtos (Kersting; Zwinoelberg, 2006). Os métodos baseados em espectroscopia têm sido popularizados, especialmente por possibilitarem a análise simultânea de vários parâmetros, por constituírem-se em uma técnica não destrutiva (permitindo a reutilização da amostra), por possuírem rapidez de processamento das informações e de fornecimento de resultados quantitativos, por não consumirem reagentes químicos nocivos ao meio ambiente e por serem menos laboriosos e de custo relativamente baixo, quando comparados aos métodos tradicionais (Williams, 2007).

As indústrias de moagem e de panificação foram precursoras na adoção da tecnologia NIRS. A quantificação de proteína no trigo moído e na farinha é a aplicação mais antiga e mais bem estabelecida (Osborne, 2007). A tecnologia NIRS foi usada com sucesso para a classificação de trigo de acordo com o teor de proteínas (Delwiche; Norris, 1993), na predição da dureza do grão (Maghirang; Dowell, 2003), no acompanhamento da maturação pós-colheita de trigo e de cevada (Cassels et al., 2007) e no estudo das mudanças do pão durante o armazenamento (Xie et al., 2003). Dowell et al. (2006) avaliaram vários parâmetros de qualidade de trigo com o uso do NIRS e obtiveram valores de coeficiente de determinação (R^2) superiores ou iguais a 0,97, para umidade, proteína e parâmetro de cor de farinha b^* (coordenada de cromaticidade b^* , cor amarela). Estes coeficientes são considerados preditivos, sendo adequados para controle de processo (Dowell et al., 2006). Valores de $R^2 \geq 0,70$ de NIRS são considerados adequados para *screening*, ou seja, para triagem ou seleção de lotes de acordo com características de interesse. Estes coeficientes foram obtidos para peso do hectolitro, diâmetro de grão, parâmetro de cor a^* (coordenada de cromaticidade a^* , cor branca), absorção de água, farinografia, extensibilidade (L), índice de intumescimento (G) e força de glúten (W), alveografia, absorção de água na panificação e volume do pão (Dowell et al., 2006). Outras aplicações do NIRS na avaliação de parâmetros de

qualidade em trigo incluíram extração de farinha, sedimentação e teor de proteína, com alta precisão para quantificação de proteínas (Jirsa et al., 2008).

As principais aplicações analíticas do NIRS em cereais e derivados foram descritas por Jespersen e Munck (2009). Pojić e Mastilović (2013) apresentaram revisão detalhada quanto às aplicações do NIRS para avaliar a composição e as propriedades funcionais de trigo, para ser utilizado em melhoramento genético, processamento e comercialização. Mais recentemente, Porep et al. (2015) revisaram as aplicações *on line* do NIRS na produção de alimentos, destacando o uso de NIRS conectado à colhedora para avaliar níveis de proteína durante a colheita de trigo. A correlação da predição de proteína na colhedora (*in line*) com os resultados obtidos no método de referência foi alta ($R^2=0,94$), demonstrando a viabilidade de emprego da espectroscopia sob condições de campo (Long et al., 2008). Ziegler et al. (2016) utilizaram NIRS para a rápida discriminação de grãos e de farinhas de diferentes espécies de trigo, demonstrando a aplicabilidade da técnica para identificar a autenticidade de produtos.

Avanços na capacidade de predição de parâmetros de qualidade tecnológica de trigo e de derivados com uso do NIRS possibilitarão novas oportunidades de segregação na cadeia produtiva. O objetivo deste capítulo foi descrever as funcionalidades da espectroscopia NIR para avaliar parâmetros de qualidade tecnológica no trigo. Os parâmetros analisados através dos espectros do trigo moído foram peso do hectolitro, teor de umidade e de proteínas totais, índice de dureza do grão, número de queda, força de glúten (alveografia), estabilidade (farinografia) e glúten úmido.

Material e métodos

Seleção de amostras, equipamento e obtenção de espectros no NIRS

Amostras de trigo de diferentes cultivares foram obtidas de experimentos e de lavouras comerciais, no período de 2009 a 2016, das principais regiões produtoras de trigo, especialmente do Paraná e do Rio Grande do Sul. No presente estudo, somente a avaliação de safra 2015 foi realizada em duplicata. Todas as amostras foram moídas com moinho de laboratório (Modelo 3100® Perten, Suíça), obtendo-se partículas menores que 0,8 mm de diâmetro. Após a homogeneização, alíquotas de, aproximadamente 4,5 g, acondicionadas em cubeta cilíndrica com 3,8 cm de diâmetro, com janela de quartzo, foram escaneadas no NIR para a coleta de espectros, em modo estacionário. O modelo utilizado foi XDS RCA (*Rapid Content Analyzer*), da

FOSS NIRsystems, Hillerød, Dinamarca. Os dados espectrais foram registrados no modo reflectância, a cada 2 nm, para compor espectro com 1.050 pontos, na faixa de 400 nm – 2.500 nm, com o software ISIScan™ (Infrasoft International LLC, 2008). Os dados espectrais foram armazenados como log 1/R.

A metodologia NIRS demanda o desenvolvimento de equações de calibração, utilizando-se os resultados obtidos nos métodos de referência, a partir da mesma amostra. Assim, utilizou-se a Quimiometria, técnica que aplica a estatística e a matemática com o objetivo de encontrar relações quantitativas ou qualitativas entre os espectros obtidos no NIRS e os resultados obtidos no método de referência.

Análises de referência

Foram realizadas as seguintes análises, com os respectivos métodos:

Peso do hectolitro (PH) - é a massa de 100 litros de trigo, expressa em quilograma por hectolitro (kg/hL). Os resultados são influenciados por uniformidade, forma, densidade, tamanho e presença de matérias estranhas e grãos quebrados na amostra (Guarienti, 1996). De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 38 (Brasil, 2010), além de outros atributos, o peso do hectolitro faz parte das análises para tipificação de trigo: Tipo 1 (PH \geq 78), Tipo 2 (PH \geq 75 e $<$ 78), Tipo 3 (PH \geq 72 e $<$ 75) e Fora de Tipo (PH $<$ 72). O PH foi obtido em balança Dalle Molle, pelo método 55-10.01(AACC International, 1999c).

Umidade do grão (UG) - de acordo com a IN 38 (Brasil, 2010), a umidade é o percentual de água encontrado na amostra. O teor de umidade tecnicamente recomendável para trigo, no Brasil, é de 13%, valor máximo permitido em razão do clima. A umidade foi obtida pelo método AACC 44-15.02 (AACC International, 2010), com secagem em estufa a 130 °C, por 1 hora, em duplicata.

Proteínas totais do grão (PTG) - as proteínas do trigo estão divididas em proteínas não formadoras de glúten (globulinas e albuminas) e em formadoras de glúten (gliadinas e gluteninas). No Brasil, foram estabelecidos teores mínimos de proteínas totais para diversos usos da farinha: panificação artesanal e panificação industrial (12%), farinha doméstica (10%), massas (14%), massas frescas/instantâneas (12%), biscoitos fermentados (9% a 12%), biscoitos moldados doces e biscoitos laminados doces (8% a 9%) e bolos (8%) (Tabela 21 ..., 2016). O teor de proteínas foi quantificado pelo método 46-13.01, da AACC International (1999a), em duplicata.

Índice de dureza do grão (IDG) - definido como a dificuldade de desintegração dos grãos quando sobre eles é exercida uma pressão (Simmonds, 1974): Extraduro (acima de 91); Muito duro (81 a 90); Duro (65 a 80); Semiduro (45 a 64); Semimole (35 a 44); Mole (25 a 34); Muito mole (10 a 24), e Extramole (abaixo de 10). Foi determinado em equipamento SKCS – Single Kernel Characterization system, marca Perten, pelo método de análise 55-31.01, da AACC International (1999d).

Número de queda (NQ) - conhecido como *Falling Number*, mede a intensidade da atividade da enzima alfa-amilase no grão, expresso em segundos. Baixos valores indicam elevada atividade de alfa-amilase, situação que comumente é resultado do processo de germinação pré-colheita. A IN 38 (Brasil, 2010) utiliza o número de queda como um dos parâmetros para a classificação do trigo por Classe: Melhorador (≥ 250 s), Pão (≥ 220 s), Doméstico (≥ 220 s), Básico (≥ 200 s) e Outros usos (qualquer valor). Foi determinado em equipamento Falling number marca Perten, segundo o método 56-81.03, da AACC International (1999e).

Força de glúten (W) - representa o trabalho de deformação da massa e indica a qualidade panificativa da farinha (força da farinha). O teste simula o comportamento da massa na fermentação, imitando a formação de alvéolos originados na massa pelo gás carbônico. A IN 38 (Brasil, 2010) utiliza a força de glúten (expressa em $\times 10^{-4}$ J), além de outros parâmetros, para classificar os trigos por Classes: Melhorador (≥ 300), Pão (≥ 220 e < 300), Doméstico (≥ 160 e < 220), Básico (≥ 100 e < 160) e Outros usos (< 100). Obtida em alveoconsistógrafo marca Chopin, modelo NG, pelo método 54-30.02, da AACC International (1999b).

Estabilidade (EST) - fornece a medida de tolerância da massa ao amassamento. A IN 38 (Brasil, 2010) utiliza a estabilidade (em minutos), além de outros parâmetros, para classificar o trigo por Classes: Melhorador (≥ 14), Pão (≥ 10 e < 14), Doméstico (≥ 6 e < 10), Básico (≥ 3 e < 6) e Outros usos (< 3). Obtida em farinógrafo/resistógrafo marca Brabender, modelo 821000, com cuba/masseira de 50 g, pelo método 54-60.01 da AACC International (2011).

Glúten úmido - o glúten é uma rede formada pelas proteínas insolúveis do trigo (gliadinas e gluteninas) quando se adiciona água à farinha. O teste de glúten úmido fornece a medida quantitativa dessas proteínas, sendo superior a 28% ideal para panificação. Determinado pelo Sistema Glutomatic, marca Perten, modelo 2200, pelo método 38-12.02, da AACC International (2000).

Na Tabela 1 são apresentados os números de amostras avaliadas, eliminadas e utilizadas para elaboração dos modelos de calibração, além dos valores mínimos e máximos obtidos em cada parâmetro de qualidade tecnológica de trigo analisado.

Tabela 1. Caracterização do conjunto de amostras utilizadas para construção dos modelos de calibração no NIRS, de parâmetros de qualidade tecnológica de trigo, de acordo com resultados obtidos nos métodos de referência. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2018.

Parâmetro	Amostra avaliada (n ^o)	Amostra eliminada (n ^o)	Amostra usada na calibração (n ^o)	Valor mínimo da variável	Valor máximo da variável
Peso do hectolitro (kg/hL) ¹	6.878	293	6.585	59,2	84,3
Teor de umidade (%) ²	568	30	538	10,0	17,1
Teor de proteínas totais (%) ²	588	28	560	8,3	17,7
Índice de dureza dos grãos ²	6.845	340	6.505	7	100
Número de queda (s) ²	6.891	291	6.600	62	800
Força de glúten (x 10 ⁻⁴ J) ²	6.701	214	6.487	13	601
Estabilidade (min) ²	1.708	158	1.550	0,6	45,9
Glúten úmido (%) ²	6.580	365	6.215	12,0	69,5

¹Amostras obtidas nos anos 2012 a 2016. ²Amostras obtidas nos anos 2009 a 2015.

Pré-processamento de dados

Os modelos de calibração e de validação foram desenvolvidos utilizando-se o software WinISITM 4 (Infrasoft International LLC, 2007).

O pré-processamento antes da calibração foi utilizado para eliminar ruídos, interferentes e fontes indesejadas de variação dos espectros originais (difusão de luz e reflexão especular), visando a obter modelos acurados, robustos e estáveis. O principal objetivo do pré-processamento é transformar os dados (sinais multivariados/múltiplos) para aderir à Lei de Beer, que determina que a absorvância e a concentração do constituinte de interesse (analito) apresentem correlação linear (Rinnan et al., 2009).

Dois métodos de pré-processamento espectrais, variação padrão normal – Detrend (SNV-D) ou correção de difusão multiplicativa (MSC), foram utilizados para caracterizar a qualidade tecnológica do trigo. SNV-D compõe-se de dois algoritmos usualmente aplicados juntos, sendo que o primeiro corrige tamanho de partícula e efeito de interferentes na difusão, e o segundo remove tendência linear e curvilínea de cada espectro (Haba et al., 2006). O conceito básico de MSC é remover as não linearidades nos dados causadas pela dispersão de partículas nas amostras (Rinnan et al., 2009).

Duas a três derivações matemáticas foram aplicadas aos dados para reduzir a variação de base e potencializar as variações ao longo do espectro. Dentre as derivadas testadas, foram selecionadas: 1.4.4.1; 2.8.4.1 e 2.8.6.1, significando que o primeiro dígito é a ordem da derivada, o segundo é o intervalo sobre o qual a derivada é calculada, o terceiro é o número de pontos de dados considerados no cálculo da média, ou alisamento, e o quarto é o segundo alisamento (Fernández-Ibañez et al., 2009).

Modelos de calibração e de validação

A construção de modelos de calibração envolve as etapas de seleção de amostras representativas de cada parâmetro a ser analisado, de quantificação do parâmetro de interesse em método de referência (padrão), de obtenção/coleta do espectro no NIRS, de construção do modelo de calibração e de validação do modelo desenvolvido para a predição do parâmetro em amostras desconhecidas (novas). Esses procedimentos foram adotados para todos os parâmetros de qualidade tecnológica avaliados nos métodos baseados em espectroscopia.

Na validação cruzada, o conjunto de amostras foi dividido em quatro grupos; cada grupo é então validado usando calibração desenvolvida com as amostras restantes (Infrasoft International, 2007). Este procedimento foi utilizado para selecionar o número ótimo de termos para quadrados mínimos parciais (PLS). Para a validação externa foram separadas, aleatoriamente, 20 amostras por ano, durante cinco anos para compor o conjunto de validação, mantendo a representatividade e as faixas de concentração dos parâmetros analisados.

As principais técnicas de calibração foram descritas em Porep et al. (2015). As regressões de componentes principais (PCR) e (PLS) são frequentemente aplicadas na compactação de dados para avaliar novas variáveis. A regressão PLS contém todas as informações espectrais e está mais diretamente relacionada com a variabilidade espectral do que quando se consideram somente os componentes principais (regressão PCR). As combinações lineares resultantes das variáveis utilizadas na calibração são nominadas como variáveis latentes, fatores ou componentes. O objetivo é assegurar que as primeiras variáveis latentes contenham tanta informação quanto possível do valor preditivo (Blanco Romía; Alcalá Bernárdez, 2009). Na avaliação de parâmetros de qualidade tecnológica de trigo, a regressão por quadrados mínimos parciais modificada (MPLS) foi utilizada, para correlacionar os resultados obtidos no método de referência com os dados espectrais do conjunto de calibração no NIRS. A regressão MPLS implementada no programa WinISI trata-se de uma versão melhora-

da do PLS, por causa da eficácia na identificação de interferentes alheios ao analito de interesse. A regressão MPLS foi detalhada em Zhang e Littlejohn (1996).

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada no conjunto de amostras para calcular a distância de Mahalanobis (H) de cada espectro, em comparação com a média, para avaliar presença de valores atípicos (*outliers*) (Waes et al., 2005). De acordo com Shenk e Westerhaus (1991), as amostras com valor de H superior a 3 foram consideradas *outliers* e eliminadas do conjunto de calibração (Tabela 1).

O número ideal de fatores e a acurácia do modelo de calibração foram testados pela validação cruzada, selecionando-se o menor erro padrão de validação cruzada (SECV) e o maior coeficiente de determinação na validação cruzada (1-VR).

O desempenho do modelo de calibração foi mensurado em termos de precisão e acurácia, de acordo com as seguintes estatísticas: desvio padrão (SD), erro padrão de calibração (SEC), coeficiente de determinação da calibração (R^2), erro padrão da validação cruzada (SECV) e coeficiente de determinação da validação cruzada (1-VR).

A melhor curva de calibração foi validada utilizando-se um conjunto independente (externo) de amostras de trigo, do qual foram calculados o erro padrão de predição (SEP), o teste para detecção de erros sistemáticos (*bias*) e o coeficiente de determinação (R^2).

A utilidade prática dos modelos de calibração foi ainda avaliada utilizando-se relação de desempenho do desvio (RPD), que é definido como a razão entre o desvio padrão (SD) e o erro padrão de predição (SEP) (Shi; Yu, 2017). Chang et al. (2001) classificaram os modelos de calibração obtidos no NIRS em três categorias, utilizando RPD e R^2 : categoria A ($RPD > 2,0$; $R^2 > 0,80$) - satisfatório; categoria B ($1,4 < RPD < 2,0$; $0,50 < R^2 < 0,80$) - modelo poderá discriminar baixo e altos valores da variável de resposta *screening*; e categoria C ($RPD < 1,4$; $R^2 < 0,50$) - sem habilidade de predição.

Resultados e discussão

Os dados estatísticos obtidos na calibração, como médias, desvio padrão, erro padrão de calibração e coeficientes de determinação da calibração e da validação cruzada para os parâmetros de qualidade tecnológica de trigo, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de calibração obtidos no NIRS para peso do hectolitro, teores de umidade e de proteínas totais, índice de dureza, número de queda, força de glúten, estabilidade e glúten úmido em trigo moído. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2018.

Parâmetro	Modelo de regressão	Pré-processamento	Amostra $n^{(1)}$	Média do parâmetro	SD ⁽²⁾	SEC ⁽³⁾	R ²⁽⁴⁾	SECY ⁽⁵⁾	1-VR ⁽⁶⁾	Termos (n) ⁽⁷⁾	Bias ⁽⁸⁾
Peso do hectolitro (kg/hL)	MPLS	SNV-D	6.585	79,6	3,32	1,82	0,70	1,84	0,69	12	-1,10
Teor de umidade (%)	MPLS	MSC	538	12,8	0,95	0,11	0,99	0,12	0,98	10	-0,07
Teor de proteínas totais (%)	MPLS	MSC	560	12,4	1,70	0,17	0,99	0,18	0,99	10	-0,11
Índice de dureza do grão	MPLS	MSC	6.505	72	15,03	4,78	0,90	4,84	0,90	14	-2,91
Número de queda do grão (s)	MPLS	Nenhum	6.600	342	109,25	68,10	0,61	68,62	0,61	14	-41,17
Força de glúten (x 10 ⁻⁴ J)	MPLS	SNV-D	6.487	220	76,85	54,31	0,50	54,78	0,49	13	-32,9
Estabilidade (min)	MPLS	SNV-D	1.550	7,2	4,58	3,30	0,48	3,43	0,44	12	-2,05
Glúten úmido (%)	MPLS	MSC	6.215	32,0	5,90	2,55	0,81	2,57	0,81	11	-1,54

⁽¹⁾ Número de amostras; ⁽²⁾ Desvio padrão; ⁽³⁾ Erro padrão de calibração; ⁽⁴⁾ Coeficiente de determinação da calibração; ⁽⁵⁾ Erro padrão da validação cruzada;

⁽⁶⁾ Coeficiente de determinação da validação cruzada; ⁽⁷⁾ Número de termos; ⁽⁸⁾ Erro sistemático.

Na Tabela 3 são apresentados os dados estatísticos obtidos na validação externa: erro padrão de predição, erro sistemático, coeficiente de determinação e erro de desvio de desempenho.

Tabela 3. Dados de validação externa obtidos no NIRS para peso do hectolitro, teores de umidade e de proteínas totais, índice de dureza dos grãos, número de queda, força de glúten, estabilidade e glúten úmido em trigo moído. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2018.

Parâmetro	Amostra (n°)	SEP ⁽¹⁾	Bias ⁽²⁾	R ² ⁽³⁾	RPD ⁽⁴⁾
Peso do hectolitro (kg/hL)	100	2,10	-0,21	0,73	1,58
Teor de umidade (%)	58	0,15	0,02	0,92	6,33
Teor de proteínas totais (%)	60	0,25	0,06	0,97	6,80
Índice de dureza do grão	100	5,35	-1,62	0,91	2,81
Número de queda do grão (s)	100	78,60	-26,16	0,72	1,39
Força de glúten (x 10 ⁻⁴ J)	100	54,05	-1,58	0,67	1,42
Estabilidade (min)	100	3,40	-0,47	0,31	1,35
Glúten úmido (%)	100	2,69	0,054	0,81	2,19

⁽¹⁾ Erro padrão da predição; ⁽²⁾ Erro sistemático; ⁽³⁾ Coeficiente de determinação; ⁽⁴⁾ Erro de desvio de desempenho (RPD = SD/SEP).

Na análise do peso do hectolitro, foi utilizado o modelo MPLS 2.8.6.1 com pré-processamento SNV-D, resultando no coeficiente de determinação da calibração (R²) de 0,70 (Tabela 2). Na validação externa (Tabela 3), o coeficiente de determinação obtido foi de 0,73. De acordo com Dowell et al. (2006), esse resultado qualificou a equação de calibração para ser utilizada em *screening* de novas amostras.

O coeficiente de determinação da calibração (R²) para os teores de umidade e de proteínas totais foi de 0,99 (Tabela 2), indicando alta correlação linear entre resultados obtidos no NIRS e nos métodos de referência. Valores similares foram obtidos nos coeficientes de determinação na validação externa, com 0,92 e 0,97 (Tabela 3) para os teores de umidade e de proteínas totais, respectivamente. Nestas aplicações, o NIRS pode ser utilizado em análises de rotina, substituindo os métodos químicos de referência. Os baixos valores de SEC, SEP e alto R² (tabelas 2 e 3), além da pouca diferença entre estes parâmetros, indicam que a predição de proteína e de umidade em trigo moído é estável e acurada (Jha, 2010). Shi e Yu (2017) reportaram que modelo de calibração desenvolvido no NIRS (comprimento de onda 1.400 nm – 2.500 nm) para proteína bruta em trigo apresentou excelente desempenho de predição (R² =

0,97); em relação à umidade, o melhor modelo obtido no NIRS (comprimento de onda 1.100 nm – 2.500 nm) apresentou menor desempenho de predição ($R^2 = 0,86$).

O NIRS mostrou adequada capacidade de predição para o parâmetro “índice de dureza”. Na calibração e na validação externa, os coeficientes de determinação R^2 obtidos foram de 0,90 e 0,91, respectivamente. Os erros registrados na calibração SEC (4,78) e na validação cruzada SECV (4,84) são considerados baixos, do ponto de vista prático na determinação de dureza. Maghirang e Dowell (2003) utilizaram NIRS (550 nm - 1.690 nm) para avaliar índice de dureza em grãos de trigo e obtiveram coeficiente de determinação de 0,91 e erro na validação cruzada de 7,70. De acordo com os autores, na validação, o NIRS apresentou desempenho similar ao método de referência ($R^2 = 0,88$), confirmando o potencial de aplicação na avaliação rápida e não destrutiva da dureza em trigo moído (Maghirang; Dowell, 2003).

Para o parâmetro “número de queda”, os coeficientes de determinação R^2 obtidos na calibração e validação foram 0,61 e 0,72, respectivamente, indicando adequada correlação entre dados espectrais e químicos na construção do modelo, com possibilidade de viabilizar o uso para *screening* de lotes de trigo. Similar aos resultados obtidos neste trabalho, Risius et al. (2015) analisaram número de queda por meio de NIR *in line*, acoplado em colhedora, e obtiveram coeficiente de determinação de $R^2 = 0,70$ e erro padrão da predição de 37 s. Os autores indicaram a viabilidade desta informação para otimizar a comercialização de trigo. Os resultados obtidos na validação externa para número de queda apresentaram discrepâncias quando comparados com a equação de calibração (que obteve menor R^2). Assim, novas estratégias matemáticas e estatísticas serão aplicadas na avaliação do número de queda no NIRS. Com esta alternativa pretende-se, também, reduzir o erro padrão de predição (78,6 s) (Tabela 3), que foi elevado quando comparado com outros trabalhos.

Para os parâmetros “força de glúten” (W) e “estabilidade”, os valores de R^2 na calibração foram 0,50 e 0,48, respectivamente (Tabela 2), indicando que o modelo de calibração não apresentou habilidade de predição destes parâmetros em trigo. A avaliação destes parâmetros qualitativos depende da formação de rede de glúten, limitando a análise acurada através do NIRS. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos no presente estudo, para força de glúten (W), foram similares aos reportados por Arazuri et al. (2012). Na validação externa, os autores propuseram um indicador de erro menor que 15% na predição pelo NIRS, definindo assim a correta classificação das amostras. No presente estudo, os erros padrão de validação cruzada e de predição foram maiores. Assim, a redução do erro inerente ao método de referência e outras técnicas de estatísticas multivariada deverão ser testadas para aprimorar o desempenho de predição de força de glúten e estabilidade no NIRS.

Neste estudo, foram incluídas amostras comerciais e de experimentos com várias procedências, diversas cultivares de trigo, diferentes condições de armazenamento e com grande amplitude de resultados para “força de glúten” e “estabilidade” (Tabela 1). A redução na precisão é influenciada pela heterogeneidade das amostras (Williams, 2007). Outra dificuldade na predição de “força de glúten” e “estabilidade” são os métodos de referência, que não são suficientemente acurados para permitir a construção de modelos de calibração robustos (Osborne, 2007). Uma das principais limitações do NIRS está relacionada com o fato de ser um método secundário. A modelagem dos dados espectrais no NIRS depende da acurácia e da reprodutibilidade dos resultados obtidos no método de referência (Pasquini, 2003). A seleção de amostras, o tamanho da amostragem, a acurácia do método de referência e o tratamento estatístico são fatores decisivos na construção de modelos baseado em NIRS (Hell et al., 2016).

O NIRS forneceu adequada estimativa quanto aos teores de glúten úmido. O coeficiente de determinação R^2 obtido na calibração e na validação foi de 0,81 e o erro padrão de predição foi de 2,69 (tabelas 2 e 3). Chen et al. (2017) utilizaram quimiometria, pré-tratamento dos espectros e intervalos de sinergia para melhorar o desempenho de predição do NIRS para os parâmetros glúten úmido e proteína total em trigo, obtendo coeficiente de determinação para glúten úmido de 0,85.

O erro de desvio de desempenho (RPD) é comumente utilizado para interpretar as calibrações, sendo que valores altos indicam melhor habilidade de predição (Porep et al., 2015). Com base neste indicador, as equações de calibração desenvolvidas poderão ser utilizadas para análise de novas amostras de trigo quanto ao teor de umidade (6,33), de proteína total (6,80), de índice de dureza dos grãos (2,81) e de glúten úmido (2,19). Os valores de RPD obtidos para os parâmetros peso do hectolitro (1,58) e número de queda (1,39) habilitam a equação de calibração para *screening* de novas amostras. Finalmente, de acordo com RPD, os parâmetros força de glúten e estabilidade não podem ser preditos pelo NIRS (Tabela 3).

Outra estatística útil é o coeficiente de determinação (R^2). Representa, essencialmente, a proporção da variância explicada da variável de resposta no conjunto de calibração ou de validação (Cozzolino et al., 2011). Na proposta de Chang et al. (2001) classificaram-se os modelos de calibração em três categorias (satisfatório, moderado e sem habilidade de predição), de acordo com RPD e R^2 . Assim, podem ser considerados satisfatórios os resultados preditos no NIRS para os parâmetros teor de umidade, de proteína total, de índice de dureza dos grãos e de glúten úmido. Os parâmetros peso do hectolitro, número de queda e força de glúten são classificados como moderados, adequados para *screening*. E, no caso da estabilidade, o NIRS não apresenta habilidade de predição (Tabela 3).

Tendências

A espectroscopia NIR apresenta potencial para ser explorada na análise de qualidade de trigo, especialmente para os parâmetros teor de umidade, teor de proteínas, índice de dureza e glúten úmido, podendo ser utilizada em análises de rotina, substituindo os métodos químicos de referência. O NIRS pode, também, ser utilizado para *screening* em novas amostras, no caso de parâmetros peso do hectolitro e número de queda. Entretanto, apresenta limitações na predição de alguns parâmetros, como força de glúten e estabilidade, que são qualitativos (precisam que a rede de glúten seja formada antes de serem avaliados). As moléculas devem absorver radiação e apresentar vibrações características da sua composição, para serem identificadas por técnicas de infravermelho. Os parâmetros reológicos não são representados diretamente no espectro NIRS, pois resultam da composição proteica da amostra (Shiroma; Rodriguez-Saona, 2009; Arazuri et al., 2012). Quanto ao método de referência, uma prática fundamental na calibração do NIRS é a quantificação do erro intrínseco (Williams, 2007). O método de referência deve ser o mais acurado e preciso possível. Entretanto, em muitas análises de qualidade tecnológica de trigo, o erro associado ao método de referência não é conhecido. Os erros intrínsecos aos métodos de referência interferem diretamente no desempenho do NIRS. Para minimizar este efeito, poderão ser incluídos resultados de amostras analisadas em duplicata/triplicata, além de realizar a validação intralaboratorial e interlaboratorial para verificação dos resultados.

Adicionalmente, Williams (2007) identificou mais de 50 fatores que afetam as aplicações do NIRS em grãos, especialmente em trigo e derivados. Dentre os principais fatores que influenciam o espectro NIRS e limitam a utilização do modelo de calibração, destacam-se: região produtora, ano de produção, cultivar, composição e técnicas quimiométricas empregadas. Assim, refinamentos na prática de calibração deverão ser constantemente testados. De acordo com Shi e Yu (2017), tanto o pré-processamento dos espectros como a seleção do comprimento de onda afetam o desempenho dos modelos de calibração no NIRS. Desta forma, os modelos propostos poderão ser melhorados utilizando-se diferentes ferramentas estatísticas, ampliando as possibilidades de utilização do NIRS.

Outra tendência é o uso do equipamento NIR hiperespectral, que associa as funcionalidades do infravermelho próximo com imagens obtidas em número superior a 100 canais ou comprimentos de onda, gerando a definição de imagens hiperespectrais. Estas imagens representam a composição química a partir de informações espectrais. Com o conjunto de informações distribuídas em uma matriz tridimensional (imagem em x e y; comprimento de onda em z), é possível avaliar parâmetros físicos e químicos, considerando a distribuição espacial global ou por pixel de uma espécie ou

propriedade em diferentes produtos, em nível qualitativo, como coloração, formato, dimensão e impurezas, além de quantitativo em função da concentração ou teor dos analitos (Barbedo et al., 2015). Verdú et al. (2015) utilizaram NIR hiperespectral e evidenciaram que a quantidade de glúten e de suas frações proteicas influenciaram a resposta espectral, podendo ser diferenciada por meio de análise multivariada (PCA). O NIR associado a imagens hiperspectrais pode viabilizar análises *on line* do comportamento da farinha de trigo durante a elaboração de produtos finais. Outras informações podem ser obtidas nos Capítulos 7 e 8 desta publicação.

A disponibilidade de equipamentos NIRS portáteis também representa avanço na aplicação da técnica na avaliação de parâmetros de qualidade. Estas funcionalidades são exploradas no Capítulo 9 desta publicação. Um espectrômetro de fibra óptica em miniatura, associado com análise multivariada, foi eficiente no monitoramento, *in situ* e em tempo real, do processo enzimático de glúten em trigo (Zhang et al., 2017).

Outra aplicação da espectroscopia combinada com quimiometria é na classificação de lotes de grãos visando à rastreabilidade. O perfil espectral (*fingerprint*) de amostras é diferenciado de acordo com a região produtora, a genética, o ano de produção e os parâmetros de qualidade. Quando estes resultados são associados a um sistema de rastreabilidade, pode diferenciar a produção de acordo com diferentes características de interesse.

Conclusões

Nesse capítulo, foi apresentada a aplicação da espectroscopia NIR como método rápido e não invasivo, para avaliação de parâmetros de qualidade tecnológica em trigo. A espectroscopia NIR apresenta potencial para ser utilizada em seleção de genótipos de trigo em programas de melhoramento genético e para orientar a segregação de trigo no recebimento de unidades armazenadoras, de acordo com os resultados dos principais componentes de qualidade tecnológica. Níveis de umidade, teores de proteína, índice de dureza e glúten úmido foram avaliados com adequada acurácia pela espectroscopia NIR. Para os parâmetros peso do hectolitro e número de queda, o NIRS pode ser utilizado para *screening*. O NIRS não apresentou habilidade de predição para os parâmetros força de glúten e estabilidade.

Agradecimentos

Agradecemos a Rogério Delanora, empregado da Embrapa Trigo, pela condução de análises no NIRS e pela colaboração nas análises estatísticas (calibração e validação). Também agradecemos a contribuição de Antônio Sergio Brisola de Oliveira, Helena de Araújo Andrade, Ellen Rogoski, Paulo Rocha Albuquerque e Pihetra Oliveira Tatsch, empregados da Embrapa Trigo, nas análises de referência de qualidade tecnológica.

Referências

AACC INTERNATIONAL. **Method 38-12.02**: wet gluten, dry gluten, water-binding capacity, and gluten index. 11th ed. St. Paul, 2000. Approved methods of analysis, Nov. 8, 2000.

AACC INTERNATIONAL. **Method 44-15.02**: moisture-air-oven methods. 11th ed. St. Paul, 2010. Approved methods of analysis, May 28, 2010.

AACC INTERNATIONAL. **Method 46-13.01**: crude protein-Kjeldahl method, boric acid modification. 11th ed. St. Paul, 1999a. Approved methods of analysis, Nov. 3, 1999.

AACC INTERNATIONAL. **Method 54-30.02**: alveograph method for soft and hard wheat flour. 11th ed. St. Paul, 1999b. Approved methods of analysis, Nov. 3, 1999.

AACC INTERNATIONAL. **Method 54-60.01**: rheological behavior of flour by farinograph: constant flour weight procedure. 11th ed. St. Paul, 2011. Approved methods of analysis, Jan. 6, 2011.

AACC INTERNATIONAL. **Method 55-10.01**: test weight per bushel. 11th ed. St. Paul, 1999c. Approved methods of analysis, Nov. 3, 1999.

AACC INTERNATIONAL. **Method 55-31.01**: single-kernel characterization system for wheat kernel texture. 11th ed. St. Paul, 1999d. Approved methods of analysis, Nov. 3, 1999.

AACC INTERNATIONAL. **Method 56-81.03**: determination of falling number. 11th ed. St. Paul, 1999e. Approved methods of analysis, Nov 3, 1999.

ARAZURI, S.; ARANA, J. I.; ARIAS, N.; ARREGUI, L. M.; GONZALEZ-TORRALBA, J.; JAREN, C. Rheological parameters determination using near infrared technology in whole wheat grain. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 115, 121, 2012.

BARBEDO, J. G. A.; TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C. Detecting Fusarium head blight in wheat kernels using hyperspectral imaging. **Biosystems Engineering**, v. 131, p. 65-76, Mar. 2015.

BLANCO ROMÍA, M.; ALCALÀ BERNARDEZ, M. Multivariate calibration for quantitative analysis. In: SUN, D.-W. (Ed.). **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Academic Press, 2009. p. 51-82.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. Regulamento técnico do trigo. **Diário Oficial da União**, 1 dez. 2010. Seção 1, p. 2.

CASSELS, J. A.; REUSS, R.; OSBORNE, B. G.; WESLEY, I. J. Near infrared spectroscopic studies of changes in stored grain. **Journal Near Infrared Spectroscopy**, v. 15, n. 3, p. 161-167, 2007.

CHANG, C.-W.; LAIRD, D. A.; MAUSBACH, M. J.; HURBURGH, C. R. Near-infrared reflectance spectroscopy—principal components regression analyses of soil properties. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, n. 2, p. 480-490, 2001.

CHEN, J.; ZHU, S.; ZHAO, G. Rapid determination of total protein and wet gluten in commercial wheat flour using siSVR-NIR. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1939-1946, Apr. 2017.

COZZOLINO, D.; CYNKAR, W. U.; SHAH, N.; SMITH, P. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1888-1896, 2011.

DE MORI, C. Aspectos comerciais e econômicos do trigo. In: DE MORI, C.; ANTUNES, J. M.; FAE, G. S.; ACOSTA, A. da S. (Ed.). **Trigo: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. cap. 16, p. 297-309. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas, n. 309).

DELWICHE, S. R.; NORRIS, K. H. Classification of hard red wheat by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 29-35, 1993.

DOWELL, F. E.; MAGHIRANG, E. B.; XIE, F.; LOOKHART, G. L.; PIERCE, R. O.; SEABOURN, B. W.; BEAN, S. R.; WILSON, J. D.; CHUNG, O. K. Predicting wheat quality characteristics and functionality using near-infrared spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 529-536, 2006.

FERNÁNDEZ-IBAÑEZ, V.; SOLDADO, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; DE LA ROZA-DELGADO, B. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in

maize and barley as analytical quality assessment. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 629-634, 2009.

GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial de trigo**. 2. ed. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPQ, 1996. 36.p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 27).

HABA, M. J. DE LA; GARRIDO-VARO, A.; GUERRERO-GINEL, J. E.; PEREZ-MARÍN, D. C. Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting amino acids content in intact processed animal proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 54, n. 20, p. 7703-7709, 2006.

HELL, J.; PRÜCKLER, M.; DANNER, L.; HENNIGES, U.; APPRICH, S.; ROSENAU, T.; BÖHMENDORFER, S. A comparison between near-infrared (NIR) and mid-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for the multivariate determination of compositional properties in wheat bran samples. **Food Control**, v. 60, p. 365-369, Feb. 2016.

INFRAISOFT INTERNATIONAL LLC. **ISIScan™**: routine analysis software for FOSS near infrared instruments. Version 3.10. State College, PA, USA, 2008.

INFRAISOFT INTERNATIONAL LLC. **WinISI™ 4**: routine calibration software for FOSS near infrared instruments. Version 4.0. State College, PA, USA, 2007.

JESPERSEN, B. M.; MUNCK, L. Cereals and cereal products. In: SUN, D.-W. (Ed.). **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control**. Burlington: Academic Press, 2009. p. 275-319.

JHA, S. N. Near infrared spectroscopy. In: JHA, S. (Ed.). **Nondestructive evaluation of food quality: theory and practice**. New York: Springer, 2010. p. 141-212.

JIRSA, O.; HRUŠKOVÁ, M.; ŠVEC, I. Near-infrared prediction of milling and baking parameters of wheat varieties. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 1, p. 21-25, 2008.

KERSTING, H. J.; ZWINOELBERG, H. Spectroscopy: electromagnetic radiation for identifying and measuring the ingredients of food. In: POPPER, L.; SCHAFER, W.; FREUD, W. (Ed.). **Future of flour: a compendium of flour improvement**. Bergen-Dumme: Agrimedia, 2006. p. 160-168.

LONG, D. S.; ENGEL, R. E.; SIEMENS, M. C. Measuring grain protein concentration with in-line near infrared reflectance spectroscopy. **Agronomy Journal**, v. 100, n. 2, p. 247-252, 2008.

MAGHIRANG, E. B.; DOWELL, F. E. Hardness measurement of bulk wheat by single-kernel visible and near-infrared reflectance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 316-322, 2003.

OSBORNE, B. G. Flours and breads. In: OZAKI, Y.; MCCLURE, W. F.; CHRISTY, A. A. (Ed.). **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2007. p. 281-296.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

POJIĆ, M. M.; MASTILOVIĆ, J. S. Near infrared spectroscopy-advanced analytical tool in wheat breeding, trade, and processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 2, p. 330-352, 2013.

POREP, J. U.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 211-230, 2015.

RINNAN, A.; NORGAARD, L.; VAN DEN BERG, F.; THYGESEN, J.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Data pre-processing. In: SUN, D.-W. (Ed.). **Infrared spectroscopy for food quality analysis and control**. Amsterdam: Academic Press, 2009. p. 29-48.

RISIUS, H.; HAHN, J.; HUTH, M.; TÖLLE, R.; KORTE, H. In-line estimation of falling number using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy on a combine harvest. **Precision Agriculture**, v. 16, n. 3, p. 261-274, 2015.

SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O. Population definition, sample selection, and calibration procedures for near-infrared reflectance spectroscopy. **Crop Science**, v. 31, n. 2, p. 469-474, 1991.

SHI, H.; YU, P. Comparison of grating-based near-infrared (NIR) and Fourier transform mid-infrared (ATR-FT/MIR) spectroscopy based on spectral preprocessing and wavelength selection for the determination of crude protein and moisture content in wheat. **Food Control**, v. 82 p. 57-65, Dec. 2017.

SHIROMA, C.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 6, p. 596-605, 2009.

SIMMONDS, D. H. Chemical basis of hardness and vitreosity in the wheat kernel. **Bakers Digest**, v. 48, n. 5, p. 16-29, 1974.

TABELA 21. Indicações de características de qualidade por produto à base de trigo. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 10., 2016, Londrina. **Informações técnicas para trigo e triticale - safra 2017**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 43.

VERDÚ, S.; IVORRA, E.; SÁNCHEZ, A. J.; BARAT, J. M.; GRAU, R. Study of high strength wheat flours considering their physicochemical and rheological characterisation as well as fermentation capacity using SW-NIR imaging. **Journal of Cereal Science**, v. 62, p. 31-37, Mar. 2015.

WAES, C. V.; MESTDAGH, I.; LOOTENS, P.; CARLIER, L. Possibilities of near infrared reflectance spectroscopy for the prediction of organic carbon concentrations in grassland soils. **Journal of Agricultural Science**, v. 143, n. 6, p. 487-492, 2005.

WILLIAMS, P. Grains and seeds. In: OZAKI, Y.; MCCLURE, W. F.; CHRISTY, A. A. (Ed.). **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2007. p. 165-217.

XIE, F.; DOWELL, F. E.; SUN, X. S. Comparison of near-infrared reflectance spectroscopy and texture analyzer for measuring wheat bread changes in storage. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 25-29, 2003.

ZHANG, Y.; LUO, L.; LI, J.; LI, S.; QU, W.; MA, H.; YE, X. In-situ and real-time monitoring of enzymatic process of wheat gluten by miniature fiber NIR spectrometer. **Food Research International**, v. 99, p. 147-154, Sept. 2017.

ZHANG, P.; LITTLEJOHN, D. Interference assessment and correction in the partial least squares regression method for multicomponent determination by UV spectrophotometry. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 34, n. 2, p. 203-215, Sep. 1996.

ZIEGLER, J. U.; LEITENBERGER, M.; LONGIN, C. F. H.; WÜRSCHUM, T.; CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. Near-infrared reflectance spectroscopy for the rapid discrimination of kernels and flours of different wheat species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 51, p. 30-36, Aug. 2016.