

Predição de Proteína em Grãos de Milho pela Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Próximo

Miguel M. G. Neto¹, Maria L. P. Simeone², Cristiane de C. Guimarães², Fátima V. Vasconcelos⁴ e Mariana A. Uba⁵

¹Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35-701-970, Sete Lagoas, MG, mgontijo@cnpms.embrapa.br;
²Analista Embrapa Milho e Sorgo, malu@cnpms.embrapa.br; ³Assistente Embrapa Milho e Sorgo; ⁴Eng^a Agrônoma, Bolsista Embrapa; ⁵Zootecnista, Bolsista PIBIC FAPEMIG/CNPq/Embrapa.

Palavras-chave: NIRS, quimiometria, composição bromatológica.

Introdução

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tem sido desenvolvida a partir de 1980 com o intuito de relacionar a composição de um alimento com sua absorção no infravermelho próximo, podendo assim prever sua composição, a digestibilidade e o teor de energia metabolizável, dentre outras variáveis inerentes ao alimento (PASQUINI, 2003; NICK, 1989; VALDES; LEESON, 1991; PEDROL; ROBUTTI, 1993).

Para se obter sucesso na utilização desta tecnologia é necessário seguir algumas etapas, como: seleção e variabilidade das amostras, aquisição dos resultados analíticos por métodos convencionais, leitura espectral, tratamento matemático dos espectros obtidos, determinação das equações, validação da curva de calibração e, finalmente, a implantação de uma rotina analítica (SHENK; WESTERHAUS, 1994).

Para muitas aplicações há uma relação direta entre os níveis dos constituintes químicos existentes no milho e seu valor relativo para usos na alimentação e industrial. Assim, a possibilidade de utilizar uma técnica não destrutiva, rápida e sem a utilização de produtos químicos, na determinação desses constituintes, torna-se de grande importância para o programa de melhoramento genético, pois possibilita que grande número de amostras sejam analisadas em um menor tempo e custo por análise.

Nesse trabalho objetivou-se o desenvolvimento de curvas de calibração por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo, para os teores de proteína em amostras de milho processado.

Material e métodos

Na construção dos modelos de regressão foram usadas 191 amostras de milho moído, oriundas de parcelas colhidas na safra 2007/2008 nos Ensaios Nacional Sul, Ensaio Elite Centro e Ensaio Elite Híbrido Centro Alto, conduzidos pela equipe responsável pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. As amostras foram pré-secas em estufa ventilada a 65 °C por 48 horas. Para a obtenção das amostras de milho moído, estas foram homogêneas em moinho de facas com peneira de 1 mm de tamanho de abertura de poro.

O método de referência utilizado para a determinação do teor de proteína total foi o de Kjeldhal (CUNNIFF, 1995). Foi determinado o teor de nitrogênio total, e o teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator 6,25.

Os espectros de reflectância na região do infravermelho próximo foram coletados em um espectrômetro NIR FLEX 500 Buchi, sendo realizadas 3 repetições para cada amostra, com



resolução de 4 cm^{-1} , 32 varreduras para cada espectro e a região espectral foi de 4.000 a 10.000 cm^{-1} , (2.500 - 1.000 nm). O equipamento apresenta precisão de 2 cm^{-1} para comprimentos de onda absoluto e reprodutibilidade relativa de $0,5\text{ cm}^{-1}$ entre 4.000 a 10.000 cm^{-1} . Para a obtenção dos espectros foram utilizadas aproximadamente 20 g de grãos de milho inteiro ou 4 g de milho moído. Os espectros foram obtidos em sala com temperatura de 23 °C.

A escolha da região espectral foi realizada após a avaliação do melhor conjunto de comprimentos de onda que permitiram ao modelo de calibração minimizar os erros de previsão. Na tentativa de minimizar os efeitos aleatórios ou sistemáticos indesejáveis de diferentes origens, foram empregadas técnicas de tratamento matemático nos espectros, antes da construção do modelo propriamente dito. Foram utilizados os seguintes tratamentos em cada espectro de acordo com o modelo desenvolvido: correção multiplicativa de sinal (MSC - *Multiplicative Signal Correction*) (MARTENS; NAES, 1989), para minimizar os efeitos de espalhamentos de luz, e a derivada primeira, para a correção de deslocamento de linha de base. Foram também avaliados ajustes de calibração considerando diferentes faixas de espectro previamente selecionadas.

O software NirCal 4.21 Buchi® foi utilizado para desenvolver e selecionar os pré-tratamentos dos dados, os modelos para calibração e, posteriormente, para testar e validar o modelo de calibração ajustado.

Os métodos de ajustes de regressão multivariados PLS (Quadrados Mínimos Parciais - *Partial Least Squares*) e PCA (Análise dos Componentes Principais - *Principal Components Analysis*) foram avaliados considerando a leitura da reflectância para cada comprimento de onda (a cada 4 cm^{-1} dentro da faixa de 4.000 a 10.000 cm^{-1}), para cada uma das amostras utilizadas para calibração, objetivando-se encontrar uma relação entre a matriz (X) contendo os valores de reflectância dos espectros das amostras e o vetor que armazena as respectivas concentrações (Y).

O número ótimo de fatores componentes da regressão foi obtido avaliando-se a soma dos quadrados do erro residual predito (SQERP, do inglês *PRESS - Predictive residual error sum of squares*). A SQERP mostra a soma do quadrado dos desvios entre os valores preditos e referência.

O conjunto total de espectros foi dividido em dois subconjuntos: um de calibração (aproximadamente 2/3 dos espectros) e outro de validação (1/3 dos espectros). A habilidade do modelo de calibração para estimar (ou prever) o teor de cada componente baseado nos dados dos espectros NIR gerados, foi avaliada usando os erros de previsão e os coeficientes de determinação entre os valores dos teores de proteína estimados pelo modelo ajustado utilizando espectros NIR e os valores do método de referência das amostras do conjunto de calibração. Os parâmetros analisados nos resultados das equações de calibrações multivariadas obtidas foram: erro padrão da calibração (EPC), erro padrão da validação cruzada (EPCV) e a relação de desempenho dos desvios (RDD), indicadora da eficiência de uma calibração. Também foram considerados o coeficiente de regressão (b) e de determinação (r^2) da regressão linear ajustada entre os valores estimados pelo modelo de calibração e os valores experimentais do método de referência.

Resultados e discussão

Os valores obtidos pelos métodos de referências para os teores de proteína, para as amostras de milho utilizadas neste trabalho, estão compreendidos entre 6,47 e 13,11%.

O método do PLS foi o que melhor se adequou para a seleção do modelo de regressão multivariada de calibração para os parâmetros avaliados. Na Tabela 1 podemos observar os resultados para os critérios considerados para o ajuste das curvas de calibração utilizando grãos



de milho moído. A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na análise do menor erro padrão associado à calibração e à validação e respectivo coeficiente de determinação (r^2).

Tabela 1 – Resultados obtidos para a equação de calibração obtida no NIRCal para amostras de grãos de milho moído.

Análise	Calibração - Proteína
Número de espectros (3 por amostra)	342
Média (%)	10,17
Faixa (min-max) (%)	7,36-13,11
Desvio padrão (Referência)	1,23
Desvio padrão (Predito)	0,52
Erro Padrão de Calibração - EPC	0,62
Faixa de comprimento de onda (cm^{-1})	5000-10000
Tratamentos matemáticos ^a	1
Coeficiente de Regressão (b)	0,8086
Coeficiente de Determinação (r^2)	0,89

^aTratamentos matemáticos: Derivada primeira- Alisamento Savitzky-Golay.

Tabela 2 – Resultados da validação para a equação de calibração obtida no NIRCal para amostras de grãos de milho moído.

Análise	Validação - Proteína
Número de amostras	144
Média(%)	10,17
Faixa (min-max) (%)	7,50-12,29
Desvio padrão (Referência)	1,24
Desvio padrão (Predito)	0,52
Erro Padrão de Validação Cruzada - EPVC	0,61
Relação de Desempenho dos Desvios	0,85
Coeficiente de Regressão (b)	0,8100
Coeficiente de Determinação (r^2)	0,77

A Figura 1 apresenta o gráfico dos valores experimentais versus valores preditos para as amostras de milho dos conjuntos de calibração e validação.

Os coeficientes de determinação para proteína no milho moído (0,89) obtidos neste experimento estão abaixo dos valores encontrados por Orman e Schumann (1991) e Baye et al. (2006), os quais encontraram valores para milho moído de 0,97. Essas diferenças ocorrem em função da quantidade e variabilidade das amostras utilizadas no conjunto de calibração. A RDD para milho moído também ficou abaixo do valor 3, sugerido por Williams (2001), como performance ideal para curvas de calibração de determinações analíticas em alimentos, entretanto, apresenta boa acurácia para realização de *screening* para grandes números de amostras. Para melhorar a performance desse modelo, o conjunto de amostras deverá ser ampliado, bem como a distribuição entre as médias mínima e máxima. Um maior número de



amostras, com melhor distribuição, poderá melhorar a RDD da curva de calibração para valores próximos aos sugeridos por Williams (2001) para utilização como método analítico de rotina.

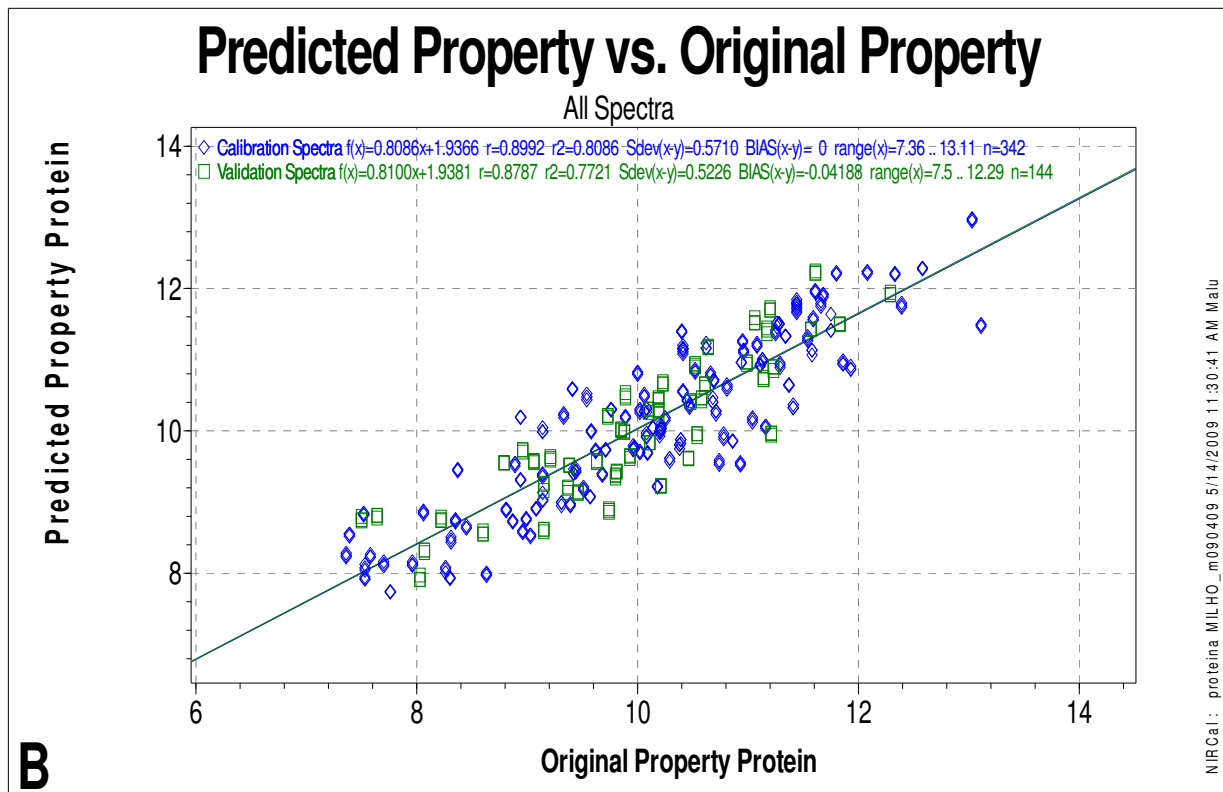


Figura 1 – Modelos de regressão ajustados com base nos teores de proteína, obtidos pelos métodos analíticos de referência e predito via NIRS, das amostras utilizadas para calibração e validação.

Conclusão

A curva ajustada para proteína bruta apresentou performance adequada para utilização em amostras provenientes de ensaios de *screening* ou onde se tem grande número de repetições de amostras por tratamentos.

Para utilização em determinações analíticas como método de rotina laboratorial, os modelos de calibração devem ser aprimorados por meio do aumento do número de amostras e aplicação de critérios na seleção das amostras a serem utilizadas no modelo.

Agradecimentos

À FAPEMIG e ao projeto PRODESILP: FNDCT/FINEP/MCT que aportaram recursos para o desenvolvimento das atividades e aquisição do equipamento NIRS. Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo Lauro José Moreira Guimarães e Paulo Evaristo Guimarães pela disponibilização das amostras de milho utilizadas.



Referências

BAYE, T. M.; PEARSON, T. C.; SETTLES, A. M. Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, London, v. 43, p. 236-243, 2006.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989. 418 p.

NICK, D. Los programas de control de calidad en las empresas avícolas. **Avicultura Profesional**, Athens, v. 7, p. 20-24, 1989.

ORMAN, B. A.; SCHUMANN JR., R. A. Comparison of near-infrared spectroscopy calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 883-886, 1991.

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

PEDROL, H. M.; ROBUTTI, J. L. Determinacion de lisina en maiz por reflexion en el infrarrojo cercano y su utilizacion en el mejoramiento. **Informe Tecnico**, Pergamino, n. 280, p. 1-16, 1993.

SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: FAHEY JR., G. C. **Forage quality evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 406-449.

VALDES, E. V.; LEESON, S. Analisis rápido de energía metabolizable por espectroscopia de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR). **Avicultura Profesional**, Athens, v. 8, p. 128-130, 1991.

WILLIAMS, P. C. Implementation of near-infrared technology. In: WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. H. (Ed.). **Near-infrared technology in the agricultural and food industries**. 2. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 2001. p. 145-169.

