



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**

CAMILA CARVALHO DA PAZ

**ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA
ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FORRAGEIRAS TROPICAIS**

**BELÉM-PA
2019**

CAMILA CARVALHO DA PAZ

**ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA
ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FORRAGEIRAS TROPICAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do Curso de
Doutorado em Saúde e Produção Animal na
Amazônia, para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. André Guimarães Maciel e
Silva

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Coutinho do Rêgo
Dr. Denis Bastianelli

**BELÉM-PA
2019**

CAMILA CARVALHO DA PAZ

**ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA
ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FORRAGEIRAS TROPICAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, área de concentração Produção Animal, para obtenção do título de Doutora.

Aprovado em janeiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Guimarães Maciel e Silva
Orientador
Universidade Federal do Pará - UFPA

Dr. Vincent Baeten
Centre Wallon de Recherches Agronomiques - CRA-W

Prof. Dr. Luciano Fernandes Sousa
Universidade Federal do Tocantins - UFT

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Manno
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

Prof. Dr. Felipe Nogueira Domingues
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

RESUMO

Ruminantes contribuem com a produção de alimentos no mundo e estes herbívoros, por meio da fermentação entérica, produzem metano, potente gás de efeito estufa conhecido pela elevada capacidade de absorver radiação infravermelha. A quantidade de metano produzida por ruminantes pode ser manipulada através das dietas ingeridas pelos mesmos, na inserção de alimentos que promovam mudanças no perfil fermentativo com o intuito de diminuir a metanogênese. Portanto é essencial que se tenha conhecimento da composição química, digestibilidade aparente dos alimentos utilizados, bem como da estimativa de produção de metano que possam ter. A espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) é uma técnica alternativa aos métodos convencionais para avaliação do valor nutritivo dos alimentos, visto que é um método rápido, que não requer grandes estruturas e soluções químicas específicas. Neste estudo, objetivou-se abordar o uso da tecnologia NIRS em forragens, além de estimar a produção *in vitro* e *in vivo* de metano entérico pela técnica NIRS. No experimento I objetivou-se avaliar a digestibilidade *in vitro* e produção de metano entérico de duas forrageiras tropicais em anos distintos, investigando a possibilidade de utilização de modelo de calibração para validação de bancos de dados de anos e/ou espécies distintas. No experimento II objetivou-se avaliar em ovinos machos a digestibilidade e produção de metano através da técnica do SF₆ (hexafluoreto de enxofre) em amostras de líquido ruminal, conteúdo ruminal e fezes úmidas e secas e moídas. Os espectros das amostras representativas dos experimentos, sendo forragens tropicais no experimento I e fezes, líquido e conteúdo ruminal no experimento II, foram coletados no equipamento NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001. Foram realizadas análises multivariadas através do software NIRCAl, visando adequado ajuste a todas as características e consequente validação das curvas de calibração desenvolvidas com elevada robustez e, posteriormente, correlações de Pearson entre resultados provenientes do laboratório e preditos no NIRS. É possível obter parâmetros de calibração e validação satisfatórios no que diz respeito à maior parte das variáveis relacionadas à composição química e digestibilidade de forragens, não havendo, portanto, necessidade do desenvolvimento de diferentes curvas de calibração por cultivar e ano, pois a partir de uma curva “global” é possível serem desenvolvidos modelos robustos de avaliação. Porém com relação as equações de predição de produtos gerados durante a DIVMS, como o gás metano, é recomendado a realização de mais análises laboratoriais convencionais, visando aumento da acurácia dos modelos. A predição de metano emitido *in vivo*, consumo e digestibilidade de matéria seca através da análise das fezes úmidas ou secas e moídas apresentam parâmetros elevados e modelo robusto, indicando que pode ser realizada.

Palavras-chave: Calibração. Composição química. Conteúdo Ruminal. Digestibilidade. Forragens tropicais. Líquido ruminal. Metanogênese. Nutrição animal. NIRS fecal. Ruminantes.

ABSTRACT

Ruminants contribute to the production of food in the world and these herbivores, through enteric fermentation, produce methane, a potent greenhouse gas known for its high capacity to absorb infrared radiation. The amount of methane produced by ruminants can be manipulated through the diets ingested by them, in the insertion of foods that promote changes in the fermentation profile in order to decrease methanogenesis. Therefore, it is essential to know the chemical composition, apparent digestibility of the foods used, as well as the estimated methane production that they may have. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is an alternative technique to conventional methods for evaluating the nutritional value of foods, since it is a fast method, which does not require large structures and specific chemical solutions. The objective was to approach the use of NIRS technology in forages, and also to estimate the *in vitro* and *in vivo* enteric methane production by the NIRS technique. In the experiment I, the objective was to evaluate the *in vitro* digestibility and enteric methane production of two tropical forages in different years, investigating the possibility of using a calibration model to validate databases of different years and/or species. In the experiment II the aim of this study was to evaluate the digestibility and methane production of SF₆ (sulfur hexafluoride) in samples of ruminal fluid, ruminal contents and moist and dried and ground feces in male sheep. The spectra of the representative samples of the experiments, being tropical forages in experiment I and feces, liquid and ruminal content in experiment II, were collected in the equipment NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001. Multivariate analyzes were performed through the NIRCals software, aiming an adequate adjustment to all the characteristics and consequent validation of the calibration curves developed with high robustness and, later, Pearson correlations between results from the laboratory and predicted in the NIRS. With the present studies, it was concluded that it is possible to obtain satisfactory calibration and validation parameters in most of the variables related to the chemical composition and digestibility of forage, so there is no need to develop different calibration curves per cultivar or year, because from a "global" curve it is possible to develop robust evaluation models, but in prediction equations of products generated during the IVDMD, such as methane gas, it is recommended to carry out more conventional laboratory analysis, aiming to increase accuracy of the models. The prediction of *in vivo* methane emitted, dry matter intake and digestibility through the analysis of wet or dry and ground faeces present high parameters and robust model, indicating that it can be done.

Keywords: Animal nutrition. Calibration. Chemical composition. Digestibility. Fecal NIRS. Methanogenesis. Ruminal content. Ruminal fluid. Tropical forages. Ruminants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid-Detergent Lignin
C	Carbono/ Carbono
CAL	Calibration/ Calibração
CH ₄	Methane/ Gás Metano
CH ₄ (g/kg CMS)	Emissão de metano em gramas por quilo de matéria seca consumida
CH ₄ g/dia	Emissão de metano em gramas por dia
CH ₄ g/PV	Emissão de metano em gramas por peso vivo
CH ₄ L/dia	Emissão de metano em litros por dia
CMS (kg/dia)	Consumo de Matéria Seca em quilos por dia
CORR	Correlação
CP	Crude Protein
CPI	Crude Protein Intake
CV	Cross-Validation
DDMI	Digestible Dry Matter Intake
DIG	Digestibility/ Digestibilidade
DM	Dry Matter
DMD	Dry Matter Digestibility
DMS (g/kg)	Digestibilidade da Matéria Seca em gramas por quilo
DOMI	Digestible Organic Matter Intake
DPCMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> pepsina-celulase da matéria seca
DP	Desvio Padrão
EE	Ether Extract/ Extrato Etéreo
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FNIRS	Fecal NIRS
g CH ₄ /h	Emissão de metano em gramas por hora
H	Hydrogen/ Hidrogênio
IVDMD	<i>In Vitro</i> Dry Matter Digestibility
IVOMD	<i>In Vitro</i> Organic Matter Digestibility

LIG	Lignin/ Lignina
M1	Mombaça 1° Ano
M2	Mombaça 2° Ano
Ma	Massai
MM	Mineral matter/ Matéria Mineral ou Cinzas
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
MMT	<i>Megathyrus maximus</i> Total
MT	Mombaça Total
N	Nitrogen/ Nitrogênio
NDF	Neutral Detergent Fiber
NIRS	Near Infrared Spectroscopy/ Espectroscopia do Infravermelho Próximo
O	Oxygen/ Oxigênio
OM	Organic Matter
OMD	Organic Matter Digestibility
PB	Proteína Bruta
pH	Potencial Hidrogeniônico
R ²	Coefficient of Determination/ Coeficiente de Determinação
RMSEC	Root-Mean Square Error of Calibration
RMSEP	Root-Mean Square Error of Prediction
RPD	Ratio of Prediction to Deviation/ Relação de desempenho do desvio
SD	Standard Deviation
SEC	Standard Error of Calibration/ Erro Padrão da Calibração
SECV	Standard Error of Cross Validation
SEP	Standard Error of Prediction
SF ₆	Hexafluoreto de Enxofre
VAL	Validation/ Validação
VC	Validação Cruzada

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	8
1.1 Objetivos	9
1.1.1 Objetivo geral.....	9
1.1.2 Objetivos específicos.....	9
1.2 Hipóteses	10
REFERÊNCIAS.....	10
USE OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY FOR THE EVALUATION OF FORAGE FOR RUMINANTS	12
Abstract.....	13
Resumo.....	13
2.1 Introduction.....	13
2.2 Development	14
2.2.1 Principles of NIRS	14
2.2.2 Calibration and validation process	15
2.2.3 Forage analysis.....	17
2.2.3.1 Chemical composition.....	17
2.2.3.1.1 Dry matter (DM) and organic matter (OM)	17
2.2.3.1.2 Crude protein (CP) and nitrogen (N).....	18
2.2.3.1.3 Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and lignin (LIG)/acid-detergent lignin (ADL).....	18
2.2.3.1.4 Ether extract (EE).....	19
2.2.3.2 Digestibility and gas production	19
2.2.3.3 Intake.....	20
2.2.3.4 Fecal NIRS (FNIRS).....	20
2.2.4 Implementation of NIRS	21

2.2.4.1 Forage preparation.....	21
2.2.4.2 Sample selection for different calibration equations.....	22
2.2.4.3 Equipment and new developments.....	23
2.3 Final considerations.....	23
References.....	24
ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE METANO ENTÉRICO	29
3.1 Introdução	31
3.2 Material e Métodos	33
3.2.1 Banco de dados para elaboração das curvas de calibração no NIRS	34
3.2.2 Design experimental.....	34
3.2.3 Preparação das amostras.....	35
3.2.4 Análise química	35
3.2.5 Análise de digestibilidade.....	35
3.2.5.1 Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS).....	35
3.2.5.2 Digestibilidade <i>in vitro</i> pepsina-celulase da matéria seca (DPCMS).....	36
3.2.6 Análise NIRS.....	36
3.2.6.1 Pré-tratamento espectral e desenvolvimento de calibrações NIRS.....	37
3.2.6.2 Validação de equações NIRS.....	37
3.2.6.3 Avaliação de equações NIRS.....	37
3.2.6.4 Validação externa de modelos de calibração NIRS.....	38
3.3 Resultados.....	38
3.3.1 Parametros estatísticos	38
3.3.2 Predição entre bancos de dados.....	41
3.4 Discussão.....	43
3.4.1 Parametros estatísticos	43
3.4.2 Validação Externa entre bancos de dados	45

3.5 Conclusão.....	46
3.6 Agradecimentos	47
Referências	47
ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> DE METANO ENTÉRICO.....	51
4.1 Introdução	53
4.2 Material e Métodos	54
4.2.1 Local, animais e dietas experimentais.....	54
4.2.2 Consumo (CMS)	55
4.2.3 Digestibilidade	56
4.2.4 Amostragem de fezes	57
4.2.5 Amostragem de líquido e conteúdo ruminal	57
4.2.6 Hexafluoreto de enxofre (SF ₆)	57
4.2.7 Análise por espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS).....	59
4.2.7.1 Pre tratamento espectral, desenvolvimento de calibrações NIRS e validação de equações NIRS	59
4.2.7.2 Avaliação de equações NIRS.....	60
4.3 Resultados.....	61
4.4 Discussão.....	64
4.5 Conclusão.....	66
4.6 Agradecimentos	66
Referências	67
CONCLUSÕES GERAIS.....	70

7. CONTEXTUALIZAÇÃO

Em 2018, o setor de ruminantes contribuiu com cerca de 24% da produção mundial de carne (63 milhões de toneladas), a produção global de leite foi de 510 milhões de toneladas e estima-se que, até 2030, aumentarão em 20% e 33%, respectivamente (USDA, 2018a, 2018b). Ruminantes como bovinos, ovinos, bubalinos e caprinos, por meio da fermentação ruminal entérica, produzem metano (NEVES, 2008) e setores que envolvem a produção dos mesmos têm sido responsabilizados pelo aumento da temperatura global, pois o metano é um potente gás do efeito estufa por possuir elevada capacidade de absorção de radiação infravermelha.

Apesar de se ter conhecimento de que o setor que envolve produção de ruminantes não representa o principal produtor desse gás e que outros gases como o CO₂, por exemplo, possuem maior relevância em relação ao efeito estufa, existe a necessidade de uma produção mais “limpa” em formas de intensificação sustentável, tendo em vista que os ruminantes domésticos representam uma das poucas origens de metano que podem ser manipuladas, em virtude da possibilidade de redução na produção do mesmo por diversas alternativas, como alteração do volumoso ou adição de lipídeos à alimentação dos animais (MOHAMMED et al., 2004; PEDREIRA, 2004).

Para obtenção da composição nutricional dos alimentos a serem incluídos na dieta dos animais que fornecem informações de produção de metano tanto pela estimativa baseada na composição química ou como produto da análise, pesquisadores costumeiramente utilizam métodos convencionais como Tilley e Terry (1963), Goering e Van Soest (1970) e hexafluoreto de enxofre (SF₆), sendo mais apropriados e que resultam em valores mais próximos à realidade os ensaios *in vivo* envolvendo produção animal e digestibilidade.

No entanto, a maior parte das metodologias demanda tempo, mão de obra especializada, reagentes químicos que produzem resíduos, elevado número de animais com conseqüente demanda de estrutura física, fármacos, alimentos e laboratórios, o que requer elevado investimento financeiro e limita a aplicabilidade do mesmo (HERRERO et al., 1996; MAURÍCIO et al., 2003; MOLANO et al., 2016).

Neste sentido, constata-se que o aumento do poder e o uso generalizado de computadores pessoais, de acordo com o desenvolvimento de procedimentos estatísticos multivariados no campo da quimiometria, resultaram em maior uso da Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIRS – *Near Infrared Spectroscopy*), que é uma alternativa aos métodos analíticos tradicionais para determinação do valor nutricional dos alimentos (STUTH

et al., 2003) e que revolucionou a caracterização de alimentos para animais.

O NIRS é um dos métodos mais rápidos para análise química disponível para a qualificação e quantificação das amostras (ANGELFIRE, 2009). O método possibilita a análise de muitas amostras devido ao baixo custo operacional (por amostra) e rapidez das análises. As principais vantagens da espectrometria NIR como ferramenta de análise qualitativa e quantitativa são: técnica não destrutiva e não invasiva, mínima manipulação de amostra e o baixo custo da análise, visto que como não utiliza reagente ou outros tipos de materiais para preparo das amostras, o custo por análise torna-se praticamente nulo (BERCHIELLI et al., 2006).

Para que a técnica de espectroscopia do infravermelho próximo possa ser validada, é necessário que haja um banco de dados consolidado proveniente de experimentos que promovam elevada robustez às curvas que irão gerar os modelos de calibração e validação. Nesse caso, podem ser realizados diferentes tipos de experimento *in vivo* e *in vitro*, dependendo dos resultados que se deseja obter e disponibilidade de materiais e equipamentos para realização do mesmo.

Sendo assim, a presente tese apresenta um artigo de revisão de literatura abordando a utilização da espectroscopia do infravermelho próximo na avaliação de forragens para ruminantes e dois artigos avaliando a metodologia NIRS na predição da produção de metano provenientes de dois estudos, sendo um de análise de digestibilidade *in vitro* e produção de metano de forrageiras tropicais de cultivares distintas e provenientes de anos distintos e outro de análise de produção de metano em ruminantes através da técnica do hexafluoreto de enxofre (SF₆) por meio da validação de curvas e desenvolvimento de modelos de calibração e validação confiáveis a fim de avaliar se é possível prever a produção de metano entérico obtida por SF₆ através da metodologia NIRS.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Utilizar a espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS) para predição da produção *in vitro* e *in vivo* de metano.

1.1.2 Objetivos específicos

Abordar como a espectroscopia NIR tem sido utilizada avaliação de forragens para ruminantes.

Desenvolver curvas de calibração e validação para determinação de duas metodologias de análise de digestibilidade *in vitro* de forragens tropicais, avaliando em qual das duas se obtém melhores modelos de predição.

Avaliar a possibilidade de utilização do modelo de um ano ou cultivar para predição de composição química do ano subsequente ou cultivar distinto.

Desenvolver curvas de calibração e validação para determinação do valor de digestibilidade e consumo da matéria seca através de amostra de fezes úmidas e fezes secas e moídas.

Desenvolver curvas de calibração e validação para determinação do valor da emissão de metano entérico através de amostra de fezes úmidas, fezes secas e moídas, líquido e conteúdo ruminal.

1.2 Hipóteses

Curvas de calibração de composição química, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e produção de gases de amostras provenientes de um ano de ensaio e/ou com cultivares distintas de forrageiras tropicais podem ser utilizadas para validar com precisão e acurácia amostras de anos subsequentes e/ou diferentes cultivares.

A produção de metano entérico pode ser estimada pela técnica de espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS) a partir de curvas de calibração e validação acuradas e robustas desenvolvidas com espectros de amostras de fornecido (forragem), fezes (úmidas e secas e moídas), líquido ruminal e conteúdo ruminal provenientes de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ANGELFIRE. **Introdução Teórica Espectroscopia Vibracional (infravermelho)**. s.d. Disponível em: <<http://www.angelfire.com/ab/prvs/infrav.html>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

BERCHIELLI, T.T.; GARCIA, A.de V.; OLIVEIRA, S.G. **Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição**. IN: BERCHIELLI, T.T.; GARCIA, A.DE V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep. p.397 – 422, 2006.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications)**. In Agriculture Handbook No. 379, 1970. p. 1–24.

HERRERO, M.; MURRAY, I.; FAWCETT, R. H.; DENT, J. B. Prediction of the *in vitro* gas production and chemical composition of kikuyu grass by near-infrared reflectance spectroscopy. **Animal Feed Science Technology**, v. 60, n. 60, p. 51–67, 1996.

MAURÍCIO, R. M.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N. M.; GALVÃO, R.; RODRIGUES, S. Potencial da Técnica *in Vitro* Semi-Automática de Produção

de Gases para Avaliação de Silagens de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2003.

MOHAMMED, N., ONODERA, R., ITABASHI, H., LILA, Z. A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller 's grains on *in vitro* tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, n. 3, p. 301-311, 2004.

MOLANO, M. L.; CORTÉS, M. L.; ÁVILA, P.; MARTENS, S. D.; MUÑOZ, L. S. Ecuaciones de calibración en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 4, n. 3, p. 139-145, 2016.

NEVES, M. C. **Produção *in vitro* de metano e análise da diversidade genética das Archaea metanogênicas do rúmen de bovinos**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

PEDREIRA, S.M. **Estimativa da produção de metano de origem animal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆)**. 2004. 136f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UESP, Jaboticabal, 2004.

STUTH, J.; JAMA, A.; TOLLESON, D. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. **Field Crops Research**, v. 84, p. 45–56, 2003.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A Two-Stage Technique for the *in Vitro* Digestion of Forage Crops. **Grass and Forage Science**, v. 18, n. 2, p. 104–111, 1963.

USDA. 2018a. **Dairy: World Markets and Trade**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 24 dez. 2018.

USDA. 2018b. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em 24 dez. 2018.

CAPÍTULO 1

USE OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY FOR THE EVALUATION OF FORAGE FOR RUMINANTS ⁽¹⁾

⁽¹⁾Artigo aceito para publicação no periódico científico Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences

Use of near infrared spectroscopy for the evaluation of forage for ruminants

Abstract: Near infrared spectroscopy (NIRS) is a technology that has been applied to evaluate the quality of forage for ruminants. This paper describes how the NIRS technique has been applied to the evaluation of fresh, dried and ground forage with, for example, laboratory bench equipment, portable equipment, and drones and tractors. The technology has been widely implemented in the evaluation of chemical composition (dry matter, crude protein, neutral and acid detergent fiber, lignin, and ether extract), digestibility, gas production, intake and other parameters of forage quality with the benefits of not destroying samples, not using reagents and providing rapid analyses, among others.

Keywords: chemical composition, digestibility, fecal NIRS, gas production, intake, NIRS

Uso da espectroscopia do infravermelho próximo na avaliação de forragens para ruminantes

Resumo: Espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS) é uma tecnologia que tem sido aplicada na avaliação da qualidade da forragem de ruminantes. No presente artigo é descrita de que forma a técnica NIRS tem sido aplicada na avaliação de forragens frescas a pasto ou secas e moídas, tanto com o equipamento de bancada no laboratório, ou equipamento portátil e utilização de drones e tratores, por exemplo. A tecnologia tem sido amplamente implementada na avaliação da composição química (matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido, lignina, extrato etéreo), digestibilidade, produção de gases, consumo e outros parâmetros de avaliação de qualidade da forragem com os benefícios de não destruir amostras, não utilizar reagentes, fornece rápido resultado das análises, dentre outros.

Palavras-chave: composição química, consumo, digestibilidade, drone, produção de gás, NIRS, NIRS fecal

2.1 Introduction

Forages are the main and most important source of nutrients for ruminant livestock (Molano et al., 2016). Thus, it is important to understand and know forage nutritional values for improved business gains, because they directly influence the productive and reproductive performance of animals (Molano et al., 2016). This knowledge also allows animal requirements to be met to avoid unnecessary losses in the environment (De Boever

et al., 1997), as is a prediction of animal performance and the subsequent development of the livestock industry (Herrero et al., 1996).

Nutritional value estimation is generally done using classical wet chemical methods, such as those of Tilley & Terry (1963) and Goering & Van Soest (1970), to obtain nutritional information about forage (Herrero et al., 1996); however, some of these techniques are time-consuming, require skilled labor, are often expensive, use chemical reagents that in some cases may be hazardous contaminants and can be inaccurate (Herrero et al., 1996; Molano et al., 2016).

The most appropriate methods to determine the nutritional value of ruminant feed are *in vivo* assays assessing animal production and digestibility. However, these require a high number of animals, labor, feed, time and elevated financial investments, which limits their applicability (Maurício et al., 2003). According to Andrés et al. (2005), *in vivo* analyses also cannot describe the dynamics of nutrient supply and are not readily applicable to large sample numbers or when small quantities of feedstuff are available.

The near infrared spectroscopy (NIRS) technique has been applied since the 1960s in neurology and in the feed and raw material (pharma) industries; it has also been used in the evaluation of forages. This technique is rapid and has the possibility of not requiring sample processing, allowing for large-scale sampling. It requires no reagents (Stuth et al., 2003), is cheaper and more precise, and predicts crude protein (CP), fiber fraction and *in vivo* or *in vitro* digestibility more accurately than other laboratorial analyses (Murray, 1993). It has been used in the estimation of the nutritional constituents of forages since the work of Norris et al. (1976); therefore, it is a suitable and efficient tool that provides valuable information (Andreu-Rodríguez et al., 2017).

The aim of this literature review was to explore the utilization of NIRS to measure the chemical composition, digestibility, gas production and intake of forages by ruminants.

2.2 Development

2.2.1 Principles of NIRS

Near infrared spectroscopy is a rapid, non-destructive and valid alternative technique, which represents a radical shift from conventional chemical methods, in which the whole matrix is characterized in terms of its absorption properties (Tassone et al., 2014). All the organic bonds, such as C-H, N-H, and O-H, have absorption bands in the near infrared (NIR) region (Osborne, 2000); this shows that NIRS can detect the bonds of fractions of fats, proteins, and carbohydrates in forage (Ibáñez & Alomar, 2008).

The NIR region is located just outside the red band, with a wavelength range between 700 and 2500 nm in the electromagnetic spectrum; infrared (IR) light is emitted and absorbed by all biological compounds (Stuth et al., 2003). When a sample is scanned, the NIR spectrometer projects NIR light in the sample, and the radiant energy is absorbed by the sample molecules according to the frequency of a specific vibration, which results in a unique spectrum for that sample (Ibáñez & Alomar, 2008), which is then stored in a computer (Stuth et al., 2003).

Near infrared spectroscopy is a very rapid technique with a low maintenance cost. It provides results at the time of analysis, which makes it a very interesting tool for animal feed control (S Pujol et al., 2007) and a reliable tool in the determination of forage quality parameters (Castro, 2002; Ibáñez & Alomar, 2008; Molano et al., 2016).

2.2.2 Calibration and validation process

Before using NIRS, calibrations are required. The calibration process establishes a relationship between a spectrum and a reference property (e.g., composition parameter) through the creation of a spectrochemical prediction model (Shenk & Westerhaus, 1993). This model aims at making the most accurate and precise prediction for a parameter/variable of interest (Decruyenaere et al., 2015).

Calibration equations can be calculated from the relationship between the spectral properties of samples and the results obtained by a reference laboratory method (Marten et al., 1989); the development of robust and accurate NIRS predictions depends on a database of samples that represents the predicted forage characteristics (Parrini et al., 2018).

As for the quantity of forage samples that are necessary to build a robust calibration, the initial idea is to have a calibration for each species of forage or, in practical terms, more than one species, if they are closely related. Samples need to cover the variability (heterogeneously) of the sample being predicted, especially with respect to different species, from different years and distinct agronomical conditions, among other characteristics, to build a robust calibration.

As previously explained, the number of samples required can vary widely. Durmic et al. (2017) used 1231 samples for a calibration equation predicting nitrogen, 427 samples for a neutral detergent fiber (NDF) calibration, 402 samples for an acid detergent fiber (ADF) calibration, and 405 samples for an *in vitro* dry matter loss calibration. Parrini et al. (2018) used 105 samples of natural and naturalized pastures from Tuscany (Italy) and affirmed

that NIRS was able to precisely and accurately estimate the chemical composition of the pastures, even with a reduced number of samples.

Therefore, it is necessary that the laboratory values (from wet chemistry procedures) and techniques be precise and accurate to develop suitable calibration equations; the lower the error in reference values, the better the precision of the model (Osborne, 2000; Decruyenaere et al., 2015). This is a key point in the quality of the NIRS technique used, as NIRS requires a large number of reference samples for instrument calibration (S Pujol et al., 2007).

In terms of sample preparation, it is ideal if the sample is measured fresh, but frequently, there is a lack of fresh material available, so the spectra are collected from dried and ground samples, such that calibrations are more often performed with processed samples. In this case, attention should be given to the drying and grinding procedures; due to the fact that water is a strong absorber of NIR light and that particle size also affects the spectrum, it is essential that the conditions under which NIR spectra are obtained be as uniform as possible (Stuth et al., 2003).

Some disadvantages about the technique are related to the need of the reference method, the complexity about the calibration and validation process, the high financial investment in the inclusion of the technology, and qualification of the specialist.

According to Landau et al. (2006), the quality of the calibrations on NIRS can be evaluated in terms of the coefficient of determination (R^2), which represents the proportion of variability in the reference data that is accounted for by the regression equation. Other important variables are SEC (standard error of calibration) or SECV (standard error of cross validation), which are the variability in the difference between the predicted values and the values obtained by the reference methods when the equation was developed from the calibration data set (Landau et al., 2006) and RMSEC (root-mean square error of calibration).

When the spectra and the reference data are included and the calibration is finalized with high R^2 and low SEC values, it is necessary to validate them, which will evaluate the prediction and accuracy of the calibration process (Landau et al., 2006). After this first process, it is necessary to include new sample spectra and new reference data to evaluate the quality of the calibration equation, which will generate validation equation and parameters, such as R^2 , SEP (standard error of prediction), and RMSEP (root-mean square error of prediction). With good validation equation parameters and the inclusion of new spectra, it is then possible to make a prediction of the selected parameters of new samples.

To select the NIRS calibration and validation equations, they must have the highest R^2 and the lowest errors associated with the measurements in each phase (Molano et al., 2016).

2.2.3 Forage analysis

Since the work of Norris et al. (1976), the NIRS technique has been used to evaluate the quality of forages; researchers have found that NIRS has been successfully used in the prediction of nutritional value through direct scanning of forage samples (Boschma et al., 2017; Stuth et al., 2003). In the following sections and in the Tables 1 and 2, we will demonstrate how NIRS has been used to predict the composition of forages, from which the nutritional value can be extrapolated, and to predict the intake, digestibility, and gas production of forages.

2.2.3.1 Chemical composition

2.2.3.1.1 Dry matter (DM) and organic matter (OM)

According to Cozzolino (2014), the DM and OM yields are two of the most important parameters in forages and crops; they are directly related to production costs and also are also well analyzed by NIRS. Castro et al. (2005) evaluated the OM content of 366 dried and ground samples, finding a R^2 of 0.92, a SEC of 0.73, and a SECV of 0.89. Fernandes (2015) compared the results of 145 fresh and 140 processed (dried and ground) samples, obtaining DM values with a R^2 of 0.87 and SEC of 0.99, for fresh samples, and an R^2 of 0.89 and a SEC of 0.78, for processed samples, demonstrating that the NIRS methodology can be applied in fresh samples of forage.

Table 1. NIRS statistics parameters for chemical composition of forages.

Tabela 1. Parâmetros estatísticos NIRS para composição química de forragens.

Property	N	R^2	SEC	SECV	SEP	RMSEC	RMSEP	Author
DM/OM	145	0.87	0.99	-	-	-	-	Fernandes (2015)
	158	0.73	-	-	23.5	-	-	Cozzolino & Labandera (2002)
CP/N	50	0.98	-	-	-	1.02	-	Bezada et al. (2017)
	1231	0.98	0.84	0.88	-	-	-	Durmic et al. (2017)
	182	0.99	0.81	1.04	-	-	-	Ullmann et al. (2017)
	1025	0.98	-	-	1.00	-	-	Andueza et al. (2016)
	310	0.99	0.8	0.9	-	-	-	Molano et al. (2016)
	141	0.60	0.71	-	-	-	-	Fernandes (2015)
	147	0.97	-	-	-	-	-	Simeone et al. (2015)

	158	0.83	-	-	19.9	-	-	Cozzolino & Labandera (2002)
NDF	50	0.90	-	-	-	1.01	-	Bezada et al. (2017)
	427	0.96	26.1	27.7	-	-	-	Durmic et al. (2017)
	262	0.91	20.7 6	-	23.8	-	-	Ullmann et al. (2017)
	228	0.99	1.5	3.5	-	-	-	Molano et al. (2016)
	139	0.62	2.51	-	-	-	-	Fernandes (2015)
	147	0.95	-	-	-	-	1.74	Simeone et al. (2015)
ADF	402	0.97	17.4	18.5	-	-	-	Durmic et al. (2017)
	155	0.95	1.7	2.1	-	-	-	Molano et al. (2016)
	140	0.78	1.34	-	-	-	-	Fernandes (2015)
	147	0.93	-	-	-	-	1.46	Simeone et al. (2015)
LIG	182	0.86	4.44	7.19	-	-	-	Ullmann et al. (2017)
	147	0.94	-	-	-	-	-	Simeone et al. (2015)
EE	50	0.94	-	-	-	0.29	-	Bezada et al. (2017)
	245	0.94	2.17	2.80	-	-	-	Ullmann et al. (2017)
	115	0.51	0.63	-	-	-	-	Fernandes (2015)

N= number of samples, R²= coefficient of determination, SEP= standard error of prediction, SEC= standard error of calibration, SECV= standard error of cross-validation, DM= dry matter, OM= organic matter, CP= crude protein, N= nitrogen, NDF= neutral detergent fiber, ADF= acid detergent fiber, LIG= lignin, EE= ether extract

2.2.3.1.2 Crude protein (CP) and nitrogen (N)

According to Stuth et al. (2003), the total nitrogen (N) or CP (usually N×6.25) contents are two of the most commonly measured components of forages using the NIRS technique. Usually, researchers find very high R² values for these components, mainly due to the strong –N–H absorptions in the NIR region (Stuth et al., 2003). This is confirmed by the results obtained in the literature, which can vary from 0.60 to 0.99, representing good R² values from different species of forage sample, as tropical forage and *Brachiaria* spp. (Ullmann et al., 2017; Molano et al., 2016; Simeone et al., 2015; Fernandes, 2015).

2.2.3.1.3 Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and lignin (LIG)/acid-detergent lignin (ADL)

After CP, NDF and ADF contents are the next most frequently reported components in studies using NIRS technology for forage. Usually, researchers find good calibration equations, with R² ranging from 0.62 to 0.99 for NDF, 0.75 to 0.97 for ADF, and 0.86 to 0.94 for LIG (Durmic et al., 2017; Ullmann et al., 2017; Molano et al., 2016; Fernandes, 2015; Simeone et al., 2015), which came from many different studies from different places and forage species, as various cultivars of *Brachiaria* spp (Simeone et al., 2015).

It is also noticed that the number of samples can vary from study to study, in this case from 139 to 427, and variability can bring robustness to the calibration equation.

2.2.3.1.4 Ether extract (EE)

According to Stuth et al. (2003), the prediction of ether extract (EE) or lipids (LIP) with NIRS is not common, which can be caused by the low quantification of this property on forage; thus, the results can vary from good calibrations, as found by Ullmann et al. (2017), who analyzed 245 samples of forage and obtained R^2 of 0.94, SEC of 2.17, and SECV of 2.80, but different from those found in another study that used 115 samples of forage, but did not obtain so good calibration parameters (R^2 of 0.51 and SEC of 0.63) (Fernandes, 2015).

2.2.3.2 Digestibility and gas production

Digestibility is another parameter that can be measured by the NIRS technique, but because digestibility is a property rather than a chemical parameter of forage, prediction can be more difficult (Stuth et al., 2003). This happens because errors in predicting animal responses are usually greater than those in predicting chemical compositions (Norris et al., 1976). Therefore, by comparison with the usual chemical parameters, the calibration and validation equation values of *in vivo* characteristics are higher due the variation between animals (Decruyenaere et al., 2015).

In these *in vivo* studies, Decruyenaere et al. (2015) found R^2 and SECV values of 0.92 and 0.02, respectively, for the organic matter digestibility (OMD) of 951 samples, and Kneebone et al. (2015) observed R^2 values of 0.85 and 0.82, and SEC values of 0.03 and 0.01 for DMD and OMD, respectively, showing that the NIRS technique is appropriate for the prediction of OMD and DMD values of *in vivo* studies.

Even within the *in vitro* methodology to evaluate digestibility, the values of NIRS parameters can vary due to the different methods as two-stage pepsin cellulose or gas production technique, but in all of them, values that indicate accurate and robust calibrations were observed (Table 2).

Andrés et al. (2005) compared chemical composition data and NIRS data to predict gas production parameters and noted a more accurate prediction using NIRS, perhaps because the NIR spectra contained a chemical component and physical property information for the sample.

2.2.3.3 Intake

A reduction in forage intake is relevant due to its negative effect on animal production (Benvenuti et al., 2014), and the NIRS technique has been used to estimate this parameter with good values obtained in the calibration equations, as observed in the works of Decruyenaere et al. (2015) and Kneebone et al. (2015), and is reported in Table 2. The estimate of intake by nirs provides several benefits, such as speed in the result, besides not being necessary to develop an experiment, which would make use of animals, feed and later analyzes in the laboratory.

Table 2. NIRS statistics parameters for digestibility and intake of forages.

Tabela 2. Parâmetros estatísticos NIRS para digestibilidade e consumo de forragens.

Analyse	N	R ²	SEC	SECV	SEP	RMSEP	Author
IVDMD	405	0.95	26	28	-	-	Durmic et al. (2017)
	1025	0.93	-	-	0.04	-	Andueza et al. (2016)
	195	0.95	1.7	2.0	-	-	Molano et al. (2016)
	147	0.94	-	-	-	2.60	Simeone et al. (2015)
IVOMD	251	0.96	10.8	10.97	-	-	Ullmann et al. (2017)
DMD	100	0.85	0.03	-	-	-	Kneebone et al. (2015)
OMD	951	0.92	0.02	-	-	-	Decruyenaere et al. (2015)
	100	0.82	0.01	-	-	-	Kneebone et al. (2015)
DMI	1012	0.80	5.32	5.53	-	-	Decruyenaere et al. (2015)
	100	0.84	6.7	-	-	-	Kneebone et al. (2015)
OMI	936	0.80	4.28	4.53	-	-	Decruyenaere et al. (2015)
	100	0.80	6.8	-	-	-	Kneebone et al. (2015)
CPI	100	0.91	1.4	-	-	-	Kneebone et al. (2015)
DDMI	100	0.82	5.3	-	-	-	Kneebone et al. (2015)
DOMI	100	82	5.0	-	-	-	Kneebone et al. (2015)

N= number of samples, R²= coefficient of determination, SEP= standard error of prediction, SEC= standard error of calibration, SECV= standard error of cross-validation, IVDMD= *in vitro* dry matter digestibility, IVOMD= *in vitro* organic matter digestibility, DMD= dry matter digestibility, DMI= dry matter intake, OMI= organic matter intake, CPI= crude protein intake, DDMI= digestible dry matter intake, DOMI= digestible organic matter intake.

2.2.3.4 Fecal NIRS (FNIRS)

The chemical analysis of feces is usually conducted in the laboratory, which is associated with high costs and high labor. Based on how the sample is used (i.e., destroyed), it may be impossible to conduct different analyses when samples are small, as is often the case with fecal pellet samples (Ramanzin et al., 2017).

The use of NIRS to analyze feces to predict chemical composition, digestibility, or intake

is based on the fact that the spectral information found in feces is enough to describe the composition of the ingested diet (Dixon & Coates, 2009). In the application of this technique, instead of a forage spectra, feces is collected, and from this, the calibration and validation equations are built.

Brogna et al. (2018), using the NIRS technology to predict fecal indigestible neutral detergent fiber for dairy cows, observed R^2 of 0.77 and SEC of 0.90, DM and R^2 of 0.93 and SEC of 0.74 for CP and R^2 of 0.66 and SEC of 0.43 for starch, that can be considered good calibration models, as the results founded by Jancewicz et al. (2016) that developed NIRS equations to predict fecal composition (OM, starch, N, NDF, ADF, ADL, and EE) and digestibility [DM, OM, starch, CP, NDF, ADF and gross energy (GE)] and found good results ($R^2 \geq 0.70$ and SEP ≤ 6.85) for OM, starch, N, NDF, and ADL, and less promising results for ADF and EE, which can be observed by the lower result of R^2 (0.25) and high SEP (≤ 11.0).

In this case, FNIRS could be applied in the OM, starch, N, NDF, and ADL prediction, almost similar to what was found by Ramanzin et al. (2017), who presented more accurate FNIRS predictions for N and progressively less accurate predictions, in descending order, for NDF, ash, ADF, and ADL contents.

Decruyenaere et al. (2015) developed equations to analyze *in vivo* organic matter digestibility (OMD), dry matter voluntary intake (DMVI; g/kg BW 0.75) and organic matter voluntary intake (OMVI; g/kg BW 0.75); they used 951 samples for OMD, finding R^2 of 0.92, SEC of 0.02, and SECV of 0.02; 1012 samples for DMVI, finding R^2 of 0.80, SEC of 5.32, and SECV of 5.53; and 936 samples for OMVI, finding R^2 of 0.83, SEC of 4.28, and SECV of 4.53, showing that it is a very promising technique corroborating with Coates & Dixon (2011), who used 1052 samples to predict the dietary dry matter digestibility of cattle consuming tropical forages and found R^2 , SEC, and SECV values of 0.90, 1.87, and 1.91, respectively.

2.2.4 Implementation of NIRS

2.2.4.1 Forage preparation

Forage can be dried or oven-dried and afterwards ground to 1 mm (Bezada et al., 2017; Simeone et al., 2015; Andueza et al., 2016; Molano et al., 2016; Durmic et al., 2017; Ullmann et al., 2017; Parrini et al., 2018) or 2 mm (Zhang et al., 2017). This is done for the sake of standardization, especially because the quality of the calibration can be increased with sample preparation and measurement standardization (Reddersen et al.,

2013). However, it is also important to standardize all preparations of the sample (including temperature and amount of time), because this also changes the water content, which introduces the possibility of a different and new calibration curve for each preparation method.

On the other hand, studies have been developed and applied to evaluate forage quality of fresh samples using NIRS technology (Fernandes, 2015). This facilitates the implementation of the technique, because it allows for the evaluation of forage quality at the production site, *in locus*. Cozzolino & Labandera (2002) considered the use of wet materials interesting, because it avoids the drying and grinding processes of sample preparation and is a technique that can be implemented in plant breeding programs with a large number of samples to be analyzed.

Cozzolino (2014), using a portable NIR spectrometer, affirmed a successful prediction of the DM, nitrogen, and protein components of fresh samples. The same result was found by Cozzolino & Labandera (2002), who obtained useful predictive models for the DM and CP contents of fresh forage, detecting similar results using dried samples. Some authors have also reported the use of a contact probe to collect the reflectance spectra of fresh samples (Lugassi et al., 2015). Mendarte et al. (2010) also obtained results that show the potential of portable NIRS technology in the determination of DM and CP contents of wet forage, but noticed that, in this case, a large number of samples was necessary to obtain a robust calibration equation.

2.2.4.2 Sample selection for different calibration equations

In this field, NIRS accuracy depends on a detailed database of samples and calibration equations for individual groups of materials and different methods of preparation prior to the spectra collection. To start the process, it is important to create a well-specified local calibration and, afterwards, work with a global calibration, which includes representative samples from several years, species, cuts, sample preparations, particle size, residual moistures, and other factors (Sinnaeve et al., 1994).

When working specifically with forages, seasonal effects should be noted, because if there are differences between them, a new calibration for each season or year might be necessary to ensure good accuracy (Garcia & Cozzolino, 2006); these values can also be included in the universal calibration equation, increasing the spectral range and producing a more robust universal calibration. According to Andueza et al. (2016), the results obtained by global calibrations can be improved by the local approach, increasing the

precision of the obtained results.

2.2.4.3 Equipment and new developments

The NIRS technique has also been used to analyze the quality of forages with equipment such as drones or cameras attached to tractors (Saari et al., 2017). In this system, NIR technology has been used to analyze hyperspectral images and describe the content of digestible organic matter in the dry matter of grass.

According to Hunt et al. (2010), it is also possible to post-process a raw digital camera image to produce a red, green, and NIR false-color image. For some commercial cameras, only the red channel is sensitive to NIR light; thus, these authors presented a new system in which a NIR, green, and blue digital image is obtained. They found good correlation between the leaf area index and the green normalized difference vegetation index (GNDVI).

To study the application of a complex visible and NIR camera system for parameters such as the leaf area index and the growth stage of forage, Fan et al. (2018) mounted a camera system to a tripod and collected data in two growing seasons; they found good prediction values and identification with acceptable accuracy and reliability, highlighting the advantage of this easy operation.

According to the results obtained by different authors, this technology can be coupled with the various types of vehicles routinely used in farming (e.g., tractors, trucks), aiming, for example, at evaluating the chemical composition to make decisions about changes (e.g., entry and exit of animals in a picket, the balance of diets).

2.3 Final considerations

As noted, NIRS has been extensively used, and technologies have been developed such that it can be applied both in analyses related to scientific research and in the farm environment.

There are limitations in the development of robust and accurate calibration and validation equations, and it is necessary that the reference data be of high quality and obtained using standardized laboratory methods. Another limitation is the application of the technique, which requires specialized labor for the creation and application of calibration and validation curves or the possible sharing of curves between equipment.

The prospects for NIRS technology are in the development of technologies that evaluate the quality of fresh on-farm forage, allowing daily variations in fresh fodder to be

detected, which promotes instantaneous adjustments to animal nutrition. Research related to the use of NIRS to evaluate the chemical composition of forages is already well established and defined, but it is still necessary to search for other parameters (e.g., *in vitro* digestibility, gas production, intake) for the on-farm application of this technology. In addition, there is a need for more research on the use of NIRS technology with portable equipment, mainly attached to tractors and drones, for application in daily farm use.

References

ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; CALLEJA, A.; JAVIER GIRALDEZ, F. Prediction of gas production kinetic parameters of forages by chemical composition and near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123–124, p. 487–499, 2005.

ANDREU-RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORAL, R.; AGULLÓ, E.; FERRÁNDEZ-VILLENA, M.; FERRÁNDEZ-GARCÍA, M.; BUSTAMANTE, M. Agricultural Water Management Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the assessment of biomass production and C sequestration by *Arundo donax* L. in salt-affected environments. *Agricultural Water Management*, v. 183, p. 94–100, 2017.

ANDUEZA, D.; PICARD, F.; MARTIN-ROSSET, W.; AUFRE`RE, J. Near-Infrared Spectroscopy Calibrations Performed on Oven-Dried Green Forages for the Prediction of Chemical Composition and Nutritive Value of Preserved Forage for Ruminants. *Applied Spectroscopy*, v. 70, n. 8, p. 1321–1327, 2016.

BENVENUTTI, M. A.; COATES, D. B.; BINDELLE, J.; POPPI, D. P.; GORDON, I. J. Can faecal markers detect a short term reduction in forage intake by cattle?. *Animal Feed Science and Technology*, v. 194, p. 44–57, 2014.

BEZADA, S. Q., ARBAIZA, T. F., CARCELÉN, F. C., SAN MARTÍN, F. H., LÓPEZ, C. L., ROJAS, J. E., RIVADENEIRA, V.; ESPEZÚA, O. F.; GUEVARA, J. V.; VÉLEZ, V. M. Predicción de la Composición Química y Fibra Detergente Neutro de Rye Grass Italiano (*Lolium multiflorum* Lam) mediante Espectroscopía de Reflectancia en Infrarrojo Cercano (NIRS). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, v. 28, n. 3, p. 538–548, 2017.

BOSCHMA, S. P.; MURPHY, S. R.; HARDEN, S. Growth rate and nutritive value of sown tropical perennial grasses in a variable summer-dominant rainfall environment, Australia. *Grass and Forage Science*, v. 72, p 234-247, 2017.

BROGNA, N.; PALMONARI, A.; CANESTRARI, G.; MAMMI, L.; DAL PRÀ, A.; FORMIGONI, A. 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.

CASTRO, P. *Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for forage analysis*. Lowland and Grasslands of Europe: Utilization and Development. FAO Corporate

Document Repository, 2002. 282 p.

CASTRO, P.; FERNÁNDEZ-LORENZO, B.; VALLADARES Y. J. Análisis de pastos mediante NIRS, *XLV Reunión Científica de la SEEP*, v. 1, p. 73–38, 2005.

COATES, D. B.; DIXON, R. M. Developing robust faecal near infrared spectroscopy calibrations to predict diet dry matter digestibility in cattle consuming tropical forages. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 19, n. 6, p. 507–519, 2011.

COZZOLINO, D. Applied Spectroscopy Reviews Use of Infrared Spectroscopy for In-Field Measurement and Phenotyping of Plant Properties: Instrumentation, Data Analysis, and Examples Use of Infrared Spectroscopy for In-Field Measurement and Phenotyping of Plant Properties. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 49, p. 564–584, 2014.

COZZOLINO, D.; LABANDERA, M. Determination of dry matter and crude protein contents of undried forages by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 82, p. 380–384, 2002.

DE BOEVER, J. L.; COTTYN, B. G.; DE BRABANDER, D. L.; VANACKER, J. M.; BOUCQUÉ, C. V. Prediction of the feeding value of maize silages by chemical parameters, *in vitro* digestibility and NIRS. *Animal Feed Science and Technology*, v. 66, n. 939, p. 211–222, 1997.

DECRUYENAERE, V.; PLANCHON, V.; DARDENNE, P.; STILMANT, D. Prediction error and repeatability of near infrared reflectance spectroscopy applied to faeces samples in order to predict voluntary intake and digestibility of forages by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, v. 205, n. 205, p. 49–59, 2015.

DIXON, R.; COATES, D. Review: Near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 17, n. 1, p. 1–31, 2009.

DURMIC, Z.; RAMÍREZ-RESTREPO, C. A.; GARDINER, C.; O'NEILL, C. J.; HUSSEIN, E.; VERCOE, P. E. Differences in the nutrient concentrations, *in vitro* methanogenic potential and other fermentative traits of tropical grasses and legumes for beef production systems in northern Australia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 97, n. 12, p. 4075-4086, 2017.

FAN, X.; KAWAMURA, K.; GUO, W.; XUAN, T. D.; LIM, J.; YUBA, N.; KUROKAWA, Y.; OBITSU, T.; LV, R.; TSUMIYAMA, Y.; YASUDA, T.; WANG, Z. Computers and Electronics in Agriculture A simple visible and near-infrared (V-NIR) camera system for monitoring the leaf area index and growth stage of Italian ryegrass. *Computers and Electronics in Agriculture*. v. 144, p. 314–323, 2018.

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*. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2015.

GARCIA, J.; COZZOLINO, D. Use of Near Infrared Reflectance (NIR) Spectroscopy to

Predict Chemical Composition of Forages in Broad-Based Calibration Models. *Agricultura Técnica*, v. 66, n. 1, p. 41–47, 2006.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. *Forage fiber analysis*. Agriculture Handbook. United States Department of Agriculture, Washington DC., 1970. 379 p.

HERRERO, M.; MURRAY, I.; FAWCETT, R. H.; DENT, J. B. Prediction of the *in vitro* gas production and chemical composition of kikuyu grass by near-infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science Technology*. v. 60, n. 60, p. 51–67, 1996.

HUNT, E. R.; DEAN HIVELEY, W.; FUJIKAWA, S. J.; LINDEN, D. S.; DAUGHTRY, C. S. T.; MCCARTY, G. W. Acquisition of NIR-green-blue digital photographs from unmanned aircraft for crop monitoring. *Remote Sensing*. v. 2, n. 1, p. 290–305, 2010.

IBÁÑEZ, L. S.; ALOMAR, D. Prediction of the chemical composition and fermentation parameters of pasture silage by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Chilean Journal of Agricultural Research*. v. 68, n. 4, p. 352–359, 2008.

JANCEWICZ, L. J.; SWIFT, M. L.; PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; KOENIG, K. M. Development of NIRS calibrations to estimate fecal composition and nutrient digestibility in beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. v. 403, p. 1–33, 2016.

KNEEBONE, D. G.; DRYDEN, MCL, G. Prediction of diet quality for sheep from faecal characteristics: comparison of near-infrared spectroscopy and conventional chemistry predictive models. *Animal Production Science*. v. 55, p. 1–10, 2015.

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, p. 1–11, 2006.

LUGASSI, R.; CHUDNOVSKY, A.; ZAADY, E.; DVASH, L.; GOLDSHLEGER, N.; BEN-DOR, E.; SARATHI ROY, P.; THENKABAIL, P. S. Estimating Pasture Quality of Fresh Vegetation Based on Spectral Slope of Mixed Data of Dry and Fresh Vegetation—Method Development. *Remote Sensing*. v. 7, p. 8045–8066, 2015.

MARTEN, G.; SHENK, J.; BARTON, F. *Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality*. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook, 1989. 643 p.

MAURÍCIO, R. M.; GUSTAVO, L.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N. M.; GALVÃO, R.; MARTINS, R.; AVELINO, J.; RODRIGUES, S. Potencial da Técnica *in Vitro* Semi-Automática de Produção de Gases para Avaliação de Silagens de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2003.

MENDARTE, S.; IBARRA, A.; GARBISU, C.; BESGA, G.; ALBIZU, I. Use of portable NIRS equipment in field conditions to determine the nutritional value of mountain pastures. *Grassland Science in Europe*. v. 15, p. 244–246, 2010.

MOLANO, M. L.; CORTÉS, M. L.; ÁVILA, P.; MARTENS, S. D.; MUÑOZ, L. S.

Ecuaciones de calibración en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*. v. 4, n. 3, p. 139-145, 2016.

MURRAY, I. Forage analysis by Near Infrared Spectroscopy. In: DAVIES, A., BAKER, R. D., GRANT, S. A., LAIDLAW, A. S. (Eds), *Sward Management Handbook*. 2 ed. The British Grassland Society, Reading, UK, 1993. 285-312p.

NORRIS, K. H.; BARNES, R. F.; MOORE, J. E.; SHENK, J. S. Predicting Forage Quality by Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Animal Science*. v. 43, n. 4, p. 889–897, 1976.

OSBORNE, B. Near-infrared spectroscopy in food analysis. In Meyers, R.A. (ed.) *Encyclopedia of analytical chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2000. p. 1-14.

PARRINI, S.; ACCIAIOLI, A.; CROVETTI, A.; BOZZI, R. 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.

RAMANZIN, M.; ÁNGELES, M.; AGUADO, P.; FERRAGINA, A.; STURARO, E.; SEMENZATO, P.; SERRANO, E.; CLAUSS, M.; ALBANELL, E.; CASSINI, R.; BITTANTE, G. Methodological considerations for the use of faecal nitrogen to assess diet quality in ungulates: The Alpine ibex as a case study. *Ecological Indicators*. v. 82, p. 399–408, 2017.

REDDERSEN, B.; FRICKE, T.; WACHENDORF, M. Effects of sample preparation and measurement standardization on the NIRS calibration quality of nitrogen, ash and NDFom content in extensive experimental grassland biomass. *Animal Feed Science and Technology*. v. 183, p. 77–85, 2013.

S PUJOL, A. M.; PÉREZ-VENDRELL, A. M.; TORRALLARDONA, D. Evaluation of prediction of barley digestible nutrient content with near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Livestock Science*. v. 109, p. 189–192, 2007.

SAARI, H.; AKUJÄRVI, A.; HOLMLUND, C.; OJANEN, H.; KAIVOSOJA, J.; NISSINEN, A.; NIEMELÄINEN, O. Visible, very near ir and short wave ir hyperspectral drone imaging system for agriculture and natural water applications. *Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, v. XLII-3/W3, p. 165–170, 2017.

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.

SIMEONE, M. L.; SOUZA, G. B.; GONTIJO NETO, M. M.; GUIMARÃES, C. C.; MEDEIROS, E.; BARROCAS, G. E. G.; PASQUINI, C. Use of NIR and PLS to Predict Chemical Composition of Brachiaria. *17th International Conference on Near Infrared Spectroscopy – Poster Presentation*, p. 195, 2015.

SINNAEVE, G.; DARDENNE, P.; AGNEESSENS, R. Global or local? A choice for NIR calibrations in analyses of forage quality', *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. v. 2, p.

163–175, 1994.

STUTH, J.; JAMA, A.; TOLLESON, D. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research*. v. 84, p. 45–56, 2003.

TASSONE, S.; MASOERO, G.; PEIRETTI, P. G. Vibrational spectroscopy to predict *in vitro* digestibility and the maturity index of different forage crops during the growing cycle and after freeze- or oven-drying treatment. *Animal Feed Science and Technology*. v. 194, p. 12–25, 2014.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A Two-Stage Technique for the *in Vitro* Digestion of Forage Crops. *Grass and Forage Science*. v. 18, n. 2, p. 104–111, 1963.

ULLMANN, I.; HERRMANN, A.; HASLER, M.; TAUBE, F. Influence of the critical phase of stem elongation on yield and forage quality of perennial ryegrass genotypes in the first reproductive growth. *Field Crops Research*. v. 205, p. 23–33, 2017.

ZHANG, X.; HAUSE, B.; YANG, Z.; NIE, G.; PAN, L.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; MA, X. Development and validation of near- infrared spectroscopy for the prediction of forage quality parameters in *Lolium multiflorum*. *PeerJ*. 2017.

CAPÍTULO 2

ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE METANO ENTÉRICO DE FORRAGEIRAS TROPICAIS

Resumo: As plantas forrageiras são amplamente utilizadas na produção de ruminantes e uma das premissas para intensificação sustentável dos sistemas de produção a pasto é o conhecimento da composição química e características ligadas ao valor nutritivo, como digestibilidade da matéria seca e o potencial de emissão de gases de efeito estufa, como o metano e dióxido de carbono entéricos. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de calibrações para estimação da composição química, duas metodologias de digestibilidade *in vitro* e produção de gases como CO₂ e CH₄, avaliando e comparando os modelos de calibração e validação desenvolvidos com banco de amostras contendo amostras de *Megathyrus maximus* cv Mombaça de dois anos distintos, amostras de *Megathyrus maximus* cv Massai e banco de dados contendo todas as amostras, observando de qual modelo pode-se obter maior robustez e acurácia pelas correlações obtidas entre as validações realizadas entre bancos de dados de diferentes anos e cultivares. Para isso, utilizou-se o equipamento NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001 e o Software NIRCal® BUCHI para realização de análises quimiométricas. Os parâmetros de calibração e validação são satisfatórios no que diz respeito à maior parte das variáveis relacionadas à composição química e digestibilidade de forragens, no caso *Megathyrus maximus*. Com relação a MS, MM, MO, PB, FDN, FDA e DPCMS, não há necessidade do desenvolvimento de diferentes curvas de calibração por cultivar e ano, pois a partir de uma curva “global” é possível o desenvolvimento de modelos robustos e confiáveis de avaliação. Com relação a equações de predição de EE, FDN, FDA, Lig e produtos gerados durante a DIVMS, como CH₄, é recomendado a inclusão de amostras com análises laboratoriais convencionais conhecidas, visando aumento de acurácia aos modelos.

Palavras-chave: Composição química. Digestibilidade *in vitro*. Forrageiras tropicais. Intensificação sustentável. Quimiometria.

Abstract: Forage plants are widely used in the production of ruminants and one of the premises for the sustainable intensification of pasture production systems is the knowledge of the chemical composition and characteristics related to the nutritive value, such as dry matter digestibility and the potential for emission of effect gases greenhouse gases, such as enteric methane and carbon dioxide. The objective of the present work was to develop calibrations for the estimation of chemical composition, two *in vitro* digestibility methodologies and gas production such as CO₂ and methane, evaluating and comparing the calibration and validation models developed with a sample bank containing samples of *Megathyrus maximus* cv Mombaça of two years, samples of *Megathyrus maximus* cv Massai and database containing all the samples, observing of which model one can obtain greater robustness and accuracy by the correlations obtained between the validations made between databases of different years and cultivars. For this, the equipment NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001 and the NIRCal® BUCHI Software were used for the accomplishment of chemometric analyzes. The present study presented satisfactory calibration and validation parameters regarding most of the variables related to chemical composition and forage digestibility, in the case *Megathyrus maximus*. In DM, MM, OM, CP, NDF, ADF and PCDMD, there is no need to develop different calibration curves per cultivar and year, since from a "global" curve it is possible to develop robust and reliable models of evaluation. In relation to the prediction equations of EE, NDF, ADF, Lig and products generated during IVDMD, such as methane gas, it is recommended to include samples with known conventional laboratory analysis, aiming to increase accuracy of the models.

Keywords: Chemical composition. Chemometrics. *In vitro* digestibility. Sustainable

intensification. Tropical forages.

3.1 Introdução

As plantas forrageiras são amplamente utilizadas na nutrição e produção de herbívoros por serem a principal fonte de nutrientes e, conseqüentemente, influenciarem na performance produtiva e reprodutiva destes (MERTENS, 1994). Em 2017, o Brasil possuía 164,96 milhões de hectares de pasto, com taxa de ocupação de 1,34 cabeça/hectare e lotação de 0,94 unidade animal/hectare (ABIEC, 2018), índices estes que podem e devem ser aumentados e nos quais já se tem observado melhora, principalmente no que diz respeito à diminuição do desmatamento e aumento da produtividade/área.

Uma das premissas para a melhora nos índices produtivos diz respeito a uma intensificação sustentável dos sistemas de produção a pasto, em que ocorre aumento da produtividade dos sistemas de produção respeitando os limites e características do ecossistema em que está inserido. Para que o sistema possa inserir práticas de intensificação atreladas à sustentabilidade, um dos principais gargalos trata-se da adequação da dieta contendo forragens às exigências nutricionais dos animais, sendo necessário conhecer a composição química desses alimentos com rapidez, precisão e acurácia. Além disso, conhecer características ligadas ao valor nutritivo de plantas forrageiras, como a digestibilidade da matéria seca e o efeito desta na emissão de gases de efeito estufa, como o metano e dióxido de carbono entéricos, podem ser fundamentais no uso de forrageiras em sistemas de produção.

Metodologias convencionais para análises que informem o valor nutricional em plantas forrageiras são laboriosas, o que muitas vezes torna inseguro e/ou atrasa tomadas de decisão no manejo de pastagens e que pode afetar, por exemplo, no conhecimento do momento ideal de entrada dos animais no pasto, momento este em que há maior produção de matéria seca digestível e disponível aos animais, bem como na precisão da composição da suplementação que será fornecida, fatores que interferem diretamente na emissão de gases produzidos durante a fermentação (HILL et al., 2016) e que possuem influência no efeito estufa.

Nesse contexto, ganham destaque técnicas como a Espectroscopia do Infravermelho Próximo (*Near Infrared Spectroscopy* - NIRS), que é rápida, utiliza pouca quantidade de amostra, requer pouca ou nenhuma preparação da amostra, não é destrutiva, não utiliza reagentes químicos, permite análise de diversos parâmetros simultaneamente,

dentre outros (DECRUYENAERE et al., 2012; NORRIS et al., 1976). A utilização desta metodologia na rápida avaliação de qualidade de forragens iniciou com o trabalho de Norris et al. (1976), com estimação da composição química, consumo e digestibilidade de forragens em ruminantes.

A avaliação de alimentos pela espectroscopia NIR envolve a quimiometria no desenvolvimento de equações de calibração e validação, com base em resultados obtidos no método convencional. A fim de aumentar a acurácia das equações, espera-se que o banco de dados represente os valores reais das amostras (DE SOUSA et al., 2011) e apresente variabilidade referente às espécies e/ou cultivares, local, estações do ano, adubações, dentre outros que possam influenciar na composição química e, conseqüentemente, no valor nutritivo da mesma. Parâmetros de calibração e validação das equações fornecem informações acerca da acurácia, robustez e confiabilidade das equações, sendo essenciais para avaliação e comparação de curvas.

Estudos avaliando manejo e produção de plantas forrageiras requerem, pelo menos, dois anos para serem concluídos, o que eleva o número de amostras, fazendo com que os ensaios experimentais sejam onerosos e de difícil condução, pois envolvem grande dedicação à avaliação dos parâmetros de composição química por métodos convencionais.

Visando solucionar essa questão, é possível que a predição de características do alimento a partir de curvas de calibração do primeiro ano de ensaios com plantas forrageiras seja suficiente para avaliar com acurácia e precisão amostras de anos subsequentes, como realizado por Perramon et al. (2016), que utilizaram a tecnologia NIRS para avaliar o conteúdo de N de amostras obtidas no segundo ano a partir de análise realizada no primeiro ano pelo método convencional, utilizada para formar a curva de calibração para N.

Apesar do significativo número de publicações científicas utilizando a tecnologia NIRS para avaliação do valor nutricional de forragens, poucos são os trabalhos que fazem menção aos parâmetros indicativos de qualidade e confiabilidade da curva de calibração (BOSCHMA; MURPHY; HARDEN, 2017; ERGON et al., 2017; LAWRENCE et al., 2017; MAXWELL; MOIR; EDWARDS, 2016; MCROBERTS et al., 2018), o que impede uma avaliação da robustez e acurácia acerca das equações utilizadas.

Dentre as forrageiras utilizadas nos sistemas de produção de ruminantes, a espécie *Megathyrus maximus* é uma das principais forrageiras cultivada em todo o mundo nas regiões tropicais e subtropicais (TORRES et al., 2013) e é altamente valorizada no Brasil

por possuir elevada capacidade de produção de matéria seca e qualidade de forragem. Dentre as cultivares mais difundidas e utilizadas desta espécie, tem-se os cultivares Mombaça e Massai, que possuem diferentes características morfofisiológicas e consequentes composições químicas (TORRES et al., 2013).

Além das características morfofisiológicas, outros fatores podem causar variação na composição, como adubação, época e até mesmo o ano de cultivo e, desta forma, questiona-se a necessidade do desenvolvimento de diferentes curvas de calibração por planta, cultivar e ano, ou se uma única curva maior (“global”) contendo e incluindo todas as variações seria capaz de prever com acurácia as variações em composição das plantas, avaliando também se todas as variáveis podem ser utilizadas de forma confiável ou se há diferença na própria composição, o que diminuiria o tempo dispendido em laboratório, além do investimento em reagentes e produtos químicos, acelerando também a tomada de decisões visando maior produtividade.

Sendo assim, objetivou-se com o presente trabalho desenvolver calibrações para composição química, digestibilidade e produção de gases como CO₂ e metano (CH₄), avaliando e comparando modelos de calibração e validação desenvolvidos com banco de amostras formados por *Megathyrus maximus* cv Mombaça de dois anos distintos, amostras de *Megathyrus maximus* cv Massai e banco de dados contendo todas as amostras, observando de qual modelo pode-se obter maior robustez e acurácia também pelas correlações obtidas entre as validações realizadas entre bancos de dados de diferentes anos e cultivares.

3.2 Material e Métodos

A espectroscopia NIR foi empregada na predição da composição química, digestibilidade da matéria seca obtidas por duas metodologias, produção de CH₄, CO₂ e pH para avaliação de 2 cultivares de *Megathyrus maximus* (Mombaça e Massai). As amostras de *Megathyrus maximus* Mombaça foram produzidas em dois anos subsequentes gerando, no total, cinco bancos de dados distintos (*Megathyrus maximus* total - MMT, Mombaça total - MT, Mombaça 1º ano - M1, Mombaça 2º ano - M2 e Massai - Ma).

Posteriormente foram avaliados os parâmetros de composição química que tiveram os melhores ajustes, observando se a partir do banco de dados de uma cultivar é possível prever as mesmas variáveis em amostras de outra cultivar e a possibilidade de se prever de forma acurada e robusta um parâmetro a partir de amostras do ano anterior

(por exemplo, M1 predizer MS e PB do M2).

3.2.1 Banco de dados para elaboração das curvas de calibração no NIRS

As amostras utilizadas no estudo são provenientes de três estudos, em que os dois com amostras de *Megathyrus maximus* cv. Mombaça foram conduzidos durante dois anos na área experimental da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), na cidade de Castanhal (Pará), com coordenadas geográficas 1°18'10.08" S, 47°56'56.10" W, cujo clima é classificado como Af pela classificação de Köppen. No experimento, as amostras receberam dosagens crescentes de adubação nitrogenada (0, 10, 20, 30, 40 e 50 kg ha⁻¹ de N aplicação⁻¹ após cada corte (altura residual de 40 cm), que ocorreu após a pastagem atingir altura de 90cm, que corresponde ao ponto em que a cultivar intercepta 95% de radiação solar sobre o dossel (HACK et al., 2007).

O experimento com *Megathyrus maximus* cv. Massai foi conduzido durante um ano na Fazenda Escola de Igarapé-Açu (FEIGA), em Igarapé-Açu (PA) pertencente a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), com coordenadas geográficas 01°07'21"S e 47°36'27"W, que apresenta temperatura anual média de 26,8 °C e clima do tipo Am, segundo a classificação de Köppen. Neste experimento, as amostras receberam seis aplicações de adubação nitrogenada ao longo do período chuvoso, em doses de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 kg de N.ha⁻¹ ano⁻¹, sempre que o dossel atingia 50 cm de altura (altura residual de 15 cm), o que correspondia a 95% de interceptação luminosa, observado pelo aparelho analisador de dossel Accupar modelo LP-80®.

3.2.2 Design experimental

O experimento foi realizado no complexo de análise quantitativa do Laboratório de Nutrição Animal (LABNUTAN) do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Belém, Pará, no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, Pará, na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais e no Cirad umr Selmet, Montpellier (França).

No total foram analisadas, no primeiro ano, 162 amostras de *Megathyrus maximus* cv. Mombaça e 65 amostras de *Megathyrus maximus* cv. Massai para composição química e, destas, 49 de Mombaça e 50 de Massai foram utilizadas para análise de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, digestibilidade pepsina-celulase, CH₄, ácido carbônico (CO₂) e potencial hidrogeniônico (pH).

No segundo ano foram realizadas análises de composição química de 240 amostras de *Megathyrus maximus* cv. Mombaça, sendo adicionadas às amostras de Mombaça do primeiro ano de estudo, gerando assim o banco de dados (Mombaça total).

3.2.3 Preparação das amostras

As amostras de capim foram pesadas e acondicionadas após a coleta em estufa de circulação forçada a 55°C por 72 horas, moídas em moinho estacionário do tipo Willey utilizando-se peneira com crivos de 1 (um) milímetro e armazenadas em recipientes de polietileno com tampa.

3.2.4 Análise química

Para determinação de matéria seca (MS), as amostras foram secas em estufa a 105°C por 16 horas (AOAC-967.03). Foram determinados também os teores de MM (matéria mineral ou cinzas) pela queima da MO (matéria orgânica) em mufla a 600° C durante 4 horas (AOAC Método Oficial 942.05), proteína bruta (PB) (AOAC Método Oficial 984.13) e extrato etéreo (EE) (AOAC Método Oficial 920.39), sendo determinados de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2005). As determinações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das amostras foram realizadas utilizando aparelho ANKON Fiber Analyzer F200 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY) de acordo com o método descrito por Goering e Van Soest (1970) e Van Soest; Robertson; Lewis (1991). Os teores de lignina foram analisados pelo método Van Soest e Wine (1967).

3.2.5 Análise de digestibilidade

3.2.5.1 Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

No experimento de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, 99 amostras de *Megathyrus maximus* cv Mombaça e Massai aleatoriamente selecionadas foram analisadas para DIVMS e produção de gases de acordo com a metodologia de Theodorou et al. (1994), modificada por Mauricio et al. (1999), em que o potencial hidrogeniônico (pH) do líquido remanescente da análise de DIVMS foi medido em potenciômetro de hidrogênio (MS TecnoPON®, MPA 210, Piracicaba- SP-Brasil).

Após 24h de incubação, amostras de 10 mL de gás foram retiradas e colocadas em tubos Exertainer evacuados (Labco Ltd., High Wycombe, Buckinghamshire, UK) de 5

mL. A concentração de CH₄ foi medida por cromatografia gasosa como descrito por Holtshausen et al. (2009) e a produção de metano foi calculada de acordo com equação desenvolvida por Longo et al. (2006).

3.2.5.2 Digestibilidade *in vitro* pepsina-celulase da matéria seca (DPCMS)

As mesmas 99 amostras de *Megathyrus maximus* cv Mombaça e Massai aleatoriamente selecionadas para o primeiro ensaio de DIVMS foram avaliadas a partir da digestibilidade *in vitro* pelo método enzimático de duas fases, sendo a primeira com pepsina e segunda com celulase, desenvolvido por Aufrere (1982).

3.2.6 Análise NIRS

Os espectros das amostras de forragens secas e moídas foram coletados no equipamento do Laboratório de Nutrição Animal (LABNUTAN) do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Belém, Pará, NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001 (Buchi AG, Flawil, Switzerland) que possui alcance espectral de 800 a 2500 nm utilizando mensurações sólidas de espectro em triplicata com resolução de 2 nm de amostras colocadas em placas de petri.

Cinco bibliotecas espectrais foram criadas para amostras de forragem; a primeira (MMT= *Megathyrus maximus* total) biblioteca contendo todas as amostras de Mombaça e Massai sendo, as de Mombaça, provenientes dos dois anos de estudo (1581 espectros); a segunda (MT= Mombaça total) contendo amostras de Mombaça dos dois anos (1212 espectros); a terceira (M1= Mombaça ano 1) sendo formada por amostra de Mombaça do primeiro ano (492 espectros); a quarta (M2= Mombaça ano 2) contendo amostra de Mombaça do segundo ano (720 espectros) e a quinta (Ma= Massai) sendo formada por amostras de Massai do único ano de coleta (369 espectros).

Os espectros das amostras coletados foram utilizados para predição da composição química da forragem, bem como predição digestibilidade *in vitro* em duas metodologias, CH₄, CO₂ e pH.

Foi utilizado o Software NIRCal® BUCHI para desenvolvimento de calibrações robustas e confiáveis através da correlação dos espectros NIR das amostras com as análises de referência.

3.2.6.1 Pré-tratamento espectral e desenvolvimento de calibrações NIRS

A fim de minimizar o efeito da alteração da linha de base e permitir a produção de um modelo que ofereça uma melhor precisão e que atenda às especificações de calibração e validação, os espectros foram pré-processados por uma combinação de tratamentos matemáticos utilizando a 2ª derivada de Taylor 3 pontos gap5. A regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR - Partial Least Squares Regression) foi utilizada para desenvolver equações de calibração para todas as variáveis utilizando os espectros das forragens. Foram realizadas eliminações de outliers baseados na estatística crítica valor $T \geq 2,5$.

3.2.6.2 Validação de equações NIRS

Dois métodos de validação semelhantemente válidos (externa e cruzada) foram utilizados para avaliação da acurácia das equações de predição desenvolvidas. Na validação externa, dois terços dos espectros foram aleatoriamente inseridos no grupo de calibração e um terço no grupo de validação e a validação cruzada foi realizada em variáveis que possuíam número de espectros ≥ 300 , visto que a validação cruzada deve ser realizada quando o número de amostras é insuficiente para ser dividido em grupos distintos de calibração e validação (TOWETT et al., 2013).

3.2.6.3 Avaliação de equações NIRS

Na avaliação da precisão da curva, foram analisados os coeficientes de determinação da calibração (R^2_c) e o erro padrão de calibração (SEC). A acurácia da predição das equações de calibração foi avaliada pelos coeficientes de determinação da validação externa (R^2_v) e coeficiente de determinação da validação cruzada (R^2_{vc}). De acordo com as recomendações de Shenk; Westerhaus; Hoover (1979), quanto menores os valores de SEC, mais ajustada está a equação e baixos valores de R^2 frequentemente indicam que os dados provenientes do laboratório são imprecisos. Foi calculado o RPD (*ratio of prediction to deviation* - relação de desempenho do desvio) como recomendado por Williams (2014), que faz relação entre desvio padrão dos valores obtidos no laboratório (SD) e o erro padrão da validação externa (SEP) ou cruzada (SECV) (DE SOUSA et al., 2011) e é também utilizado para avaliação da precisão e acurácia de equações NIRS (BEZADA et al., 2017).

Para avaliação dos parâmetros, com relação a R^2 utilizou-se o indicado por Andrés

et al. (2005), em que os valores de 0.50-0.69, 0.70-0.89 e >0.90 denotam calibração ineficaz, regular e boa, respectivamente; buscou-se, também, modelos que obtivessem o menor valor de SEC, SEP e SECV, denotando baixos valores de erros. Ao RPD, para que a equação fosse considerada confiável era necessário que o valor fosse maior que 3 (WILLIAMS & SOBERING, 1996).

Foi observada, para avaliação das calibrações e predições, a existência de correlações entre os valores oriundos das análises laboratoriais e os valores preditos pelo NIRS utilizando o PROC CORR Pearson ($P < 0,05$) utilizando pacote estatístico SAS® University Edition (2013).

3.2.6.4 Validação externa de modelos de calibração NIRS

Validações externas dos modelos de calibração foram desempenhadas nas propriedades da composição química que apresentaram modelos de parâmetros de calibração com coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,7 e realizadas entre bancos de dados a fim de observar a possibilidade de realização de adequada predição de amostras de bancos de dados distintos.

3.3 Resultados

3.3.1 Parâmetros estatísticos

Os resultados das análises laboratoriais convencionais de MS, MM, MO, PB, EE, FDN, FDA e Lignina) apresentaram variabilidade em todos os bancos de dados (Tabela 1).

Tabela 1 - Estatística descritiva e parâmetros estatísticos dos modelos de calibração desenvolvidos para composição bromatológica de forragem com cinco diferentes tipos de bancos de dados.

Variável	BD		N	Média	Amplitude	DP	R ²	Bias	PC	SEC	SEP	RPD	Cor	
MS	MMT	Cal	342	23,53	15,73 a 35,74	3,98	0,90	0,00	15	1,70		1,91	0,83	
		Val	168	23,51	15,77 a 34,29	3,82	0,83	-0,08			2,12			
	MT	Cal	265	24,06	15,77 a 35,74	4,42	0,93	0,00	15	1,60		1,77	0,80	
		Val	128	23,71	17,03 a 33,65	3,88	0,79	-0,61			2,46			
	M1	Cal	108	21,87	15,77 a 35,74	3,74	0,94	0,00	15	1,23		1,86	0,88	
		Val	52	20,76	15,77 a 34,7	3,18	0,81	-0,64			2,03			
	M2	Cal	162	25,31	16,25 a 34,29	3,76	0,92	0,00	15	1,50		1,52	0,85	
		Val	73	26,22	18,16 a 33,56	4,02	0,78	0,08			2,56			
	Ma	Cal	77	21,91	18,12 a 27,49	1,85	0,91	0,00	15	0,79		1,38	0,70	
		Val	37	22,38	18,56 a 27,11	2,22	0,68	-0,32			1,73			
	MM	MMT	Cal	340	6,65	3,82 a 10,64	1,25	0,88	0,00	15	0,58		2,07	0,65
			Val	172	6,78	3,87 a 10,60	1,23	0,84	0,06			0,66		
MT		Cal	266	6,95	3,96 a 12,53	1,22	0,93	0,00	15	0,45		1,93	0,62	
		Val	131	7,03	4,37 a 11,85	1,32	0,86	0,04			0,68			

	M1	Cal	110	7,35	3,96 a 12,53	1,50	0,97	0,00	15	0,37	1,37	0,88	
		Val	51	7,37	4,77 a 10,60	1,33	0,73	0,28			1,08		
	M2	Cal	161	6,77	4,08 a 9,4	1,15	0,95	0,00	15	0,36	2,00	0,51	
		Val	75	6,76	4,91 a 9,33	1,03	0,85	-0,03			0,57		
	Ma	Cal	81	5,79	2,87 a 8,21	1,13	0,90	0,00	15	0,50	0,95	0,71	
		Val	37	5,86	3,82 a 7,18	1,03	0,35	-0,02			1,15		
MO	MMT	Cal	263	93,02	87,46 a 96,04	1,20	0,92	0,00	15	0,47	2,21	0,62	
		Val	130	92,98	88,14 a 95,92	1,34	0,90	-0,03			0,60		
	MT	Cal	266	92,94	87,46 a 96,04	1,33	0,94	0,00	15	0,47	1,49	0,62	
		Val	133	93,01	88,20 a 95,63	1,31	0,75	-0,01			0,89		
	M1	Cal	109	95,57	87,47 a 96,04	1,54	0,94	0,00	15	0,51	2,01	0,91	
		Val	52	92,61	89,39 a 95,22	1,30	0,86	-0,14			0,73		
	M2	Cal	161	93,22	90,44 a 95,92	1,17	0,89	0,00	15	0,38	1,59	0,51	
		Val	77	93,21	90,6 a 95,13	1,10	0,75	0,00			0,72		
	PB	MMT	Cal	340	11,98	3,7 a 20,34	3,23	0,90	0,00	15	1,40	1,77	0,75
			Val	165	12,12	4,01 a 19,38	3,21	0,81	0,06			1,88	
		MT	Cal	266	11,66	3,7 a 18,88	3,07	0,91	0,00	15	1,28	1,86	0,83
			Val	126	11,84	4,48 a 17,86	2,72	0,80	-0,04			1,65	
M1		Cal	109	12,32	6,22 a 24,99	3,12	0,93	0,00	15	1,18	1,26	0,72	
		Val	54	12,55	7,24 a 18,88	2,73	0,63	0,15			2,40		
M2		Cal	160	11,48	3,7 a 17,98	2,89	0,85	0,00	15	1,54	1,80	0,81	
		Val	68	11,36	5,2 a 17,86	3,00	0,83	0,09			1,70		
Ma		Cal	82	12,95	4,92 a 20,34	3,92	0,96	0,00	15	1,03	1,82	0,91	
		Val	34	12,98	5,75 a 19,85	3,67	0,81	0,27			2,16		
EE		MMT	Cal	265	1,99	0,32 a 3,48	0,66	0,68	0,00	15	0,49	1,01	0,20
			Val	128	2,02	0,633 a 3,27	0,58	0,15	0,02			0,67	
	MT	Cal	264	2,03	0,32 a 3,48	0,64	0,66	0,00	15	0,48	1,03	0,50	
		Val	127	1,97	0,43 a 3,27	0,60	0,28	-0,07			0,63		
	M1	Cal	104	1,86	0,32 a 3,44	0,67	0,90	0,00	15	0,29	1,12	0,68	
		Val	51	1,82	0,61 a 3,13	0,53	0,59	-0,04			0,58		
	M2	Cal	159	2,13	0,5 a 3,69	0,66	0,75	0,00	15	0,44	0,87	0,54	
		Val	78	2,07	0,82 a 3,36	0,58	0,02	-0,02			0,76		
	FDN	MMT	Cal	337	68,37	53,75 a 78,55	4,03	0,82	0,00	15	2,29	2,00	0,56
			Val	161	68,44	56,65 a 76,14	4,12	0,76	0,16			2,70	
		MT	Cal	263	67,00	53,75 a 80,45	3,90	0,77	0,00	15	2,50	1,63	0,49
			Val	129	66,98	56,3 a 75,39	3,70	0,54	0,29			3,29	
M1		Cal	109	68,16	45,83 a 78,18	4,32	0,86	0,00	15	2,20	0,80	0,65	
		Val	54	67,85	57,87 a 74,92	4,15	0,22	-0,45			4,88		
M2		Cal	162	66,13	53,75 a 80,45	3,93	0,84	0,00	15	2,16	1,89	0,54	
		Val	70	66,24	58,23 a 76,57	3,04	0,58	0,66			3,05		
Ma		CV	122	72,60	66,41 a 78,55	2,43	0,78	0,00	15	1,52	1,13	0,83	
FDA		MMT	Cal	339	36,15	28,81 a 43,49	2,70	0,78	0,00	15	1,69	1,65	0,54
			Val	163	36,33	29,96 a 42,66	2,59	0,71	0,08			1,85	
	MT	Cal	261	35,38	27,44 a 45,85	2,72	0,77	0,00	15	1,75	1,26	0,60	
		Val	130	35,82	28,82 a 43,45	2,56	0,48	0,05			2,43		
	M1	Cal	106	35,52	27,44 a 42,35	2,91	0,90	0,00	15	1,26	0,98	0,63	
		Val	53	36,26	30,12 a 41,38	2,84	0,30	0,39			3,19		
	M2	Cal	160	35,48	27,81 a 46,11	2,78	0,87	0,00	15	1,38	1,34	0,63	
		Val	71	35,39	30,05 a 40,37	2,17	0,55	0,39			2,27		
	Ma	CV	119	38,53	34,27 a 43,49	1,76	0,81	0,00	15	1,04	1,16	0,82	
	LIG	MMT	Cal	255	2,64	1,08 a 5,08	0,60	0,72	0,00	15	0,42	1,34	0,45
			Val	123	2,55	1,41 a 3,97	0,52	0,33	-0,10			0,54	
MT		Cal	264	2,64	0,74 a 4,97	0,64	0,68	0,00	15	0,47	1,16	0,52	
		Val	129	2,61	1,5 a 4,08	0,55	0,20	0,03			0,64		
M1		Cal	109	2,70	1,08 a 4,67	0,68	0,84	0,00	15	0,36	0,90	0,59	
		Val	50	2,54	1,52 a 3,94	0,54	0,06	-0,21			0,71		
Ma		Cal	157	2,63	0,74 a 5,13	0,64	0,80	0,00	15	0,38	1,11	0,58	
		Val	77	2,69	1,48 a 4,97	0,66	0,24	0,03			0,70		

BD= Banco de dados; MMT= *Megathyrus maximus*; MT= Mombaça total; M1= Mombaça ano 1; M2=

Mombaça ano 2; Ma= Massai; Cal= calibração; Val= validação; DP= desvio padrão; R²= coeficiente de determinação; PC= componentes principais – *principal component*; SEC= erro-padrão da calibração - *standard error of calibration*; SEP= erro-padrão da predição externa - *standard error of prediction*; SECV= erro-padrão da calibração cruzada - *standard error of cross validation*; RPD= relação de desempenho do desvio - *ratio of performance to deviation*

Fonte: A autora

Os resultados das análises laboratoriais convencionais de MS, MM, MO, PB, EE, FDN, FDA e Lignina demonstram que há variabilidade em todos os bancos de dados.

A maior parte dos resultados de R² da calibração apresentaram modelos variando de regular a bom; os dois modelos ineficazes foram observados com maior frequência em EE e lig (MT). O banco de dados com maiores valores de R²_v foi o MMT (0,9) e o menor foi Ma (0,02). Não foram observados RPD's que denotassem equações confiáveis (RPD>3,00), portanto nestes casos deve-se analisar conjuntamente os valores dos coeficientes de determinação gerados, bem como os valores dos erros de calibração e predição, a fim de decidir se os mesmos podem ou não ser utilizados.

Devido ao menor número de amostras, nas variáveis FDN e FDA do banco de dados Ma foi utilizado o método de validação cruzada, sendo observados valores de SECV de 2,16 e 1,56, respectivamente. Quase metade dos modelos desenvolvidos não demonstraram confiabilidade e performance adequada, em que o parâmetro EE destaca-se independente do banco de dados.

O maior coeficiente de correlação entre os valores observados e preditos foi na variável PB (0,912) e os demais coeficientes de correlação desta mesma variável apresentaram valores de regulares a bons, comportamento também observado na maior parte dos bancos de dados das variáveis PB, MO, MM e MS.

Tabela 2 - Estatística descritiva e parâmetros estatísticos dos modelos de calibração desenvolvidos para duas metodologias de digestibilidade *in vitro* e estimativas de produção de metano, gás carbônico e pH de forragem com cinco diferentes tipos de bancos de dados.

Variável	BD	VC	N	Média	Amplitude	DP	R ²	PC	SEC	SECV	RPD	Corr
DPCMS	MMT	VC	95	53,01	44,37 a 62,6	3,26	0,96	15	0,96	1,43	2,28	0,948
	M1	VC	49	52,37	44,98 a 58,27	2,91	0,98	15	0,56	1,32	2,22	0,990
	Ma	VC	50	53,76	44,37 a 62,6	3,46	0,98	15	0,66	1,38	2,51	0,989
DIVMS	MMT	VC	93	57,65	41,02 a 71,72	6,04	0,89	15	2,78	4,39	1,42	0,873
	M1	VC	49	56,62	41,02 a 67,65	6,63	0,97	15	1,69	4,20	1,59	0,986
	Ma	VC	48	58,65	41,94 a 71,72	5,63	0,95	15	1,69	3,74	1,56	0,853
CH ₄	MMT	VC	95	11,67	7,81 a 15,10	1,57	0,84	15	0,87	1,32	1,19	0,825
	M1	VC	49	12,14	9,08 a 15,10	1,42	0,95	15	0,45	1,07	1,33	0,981
	Ma	VC	49	11,23	7,81 a 13,48	1,56	0,90	15	0,68	1,48	1,06	0,887
CO ₂	MMT	VC	92	55,36	38,08 a 67,63	5,78	0,91	15	2,34	3,80	1,59	0,843
	M1	VC	46	59,35	49,25 a 67,63	3,79	0,97	15	0,94	2,55	1,56	0,785
	Ma	VC	48	51,09	34,67 a 63,76	4,69	0,95	15	1,52	3,77	1,35	0,845
pH	MMT	VC	95	5,94	5,68 a 6,51	0,16	0,76	15	0,08	0,13	1,24	0,870
	M1	VC	49	5,96	5,74 a 6,51	0,20	0,88	15	0,07	0,17	1,11	0,976

	Ma	VC	50	5,91	5,68 a 6,14	0,08	0,84	15	0,03	0,07	1,22	0,939
--	-----------	-----------	----	------	-------------	------	------	----	------	------	------	-------

BD= banco de dados; MMT= *Megathyrus maximus*; MT= Mombaça total; M1= Mombaça ano 1; M2= Mombaça ano 2; Ma= Massai; VC= validação cruzada; DP= desvio padrão; R²= coeficiente de determinação; PC= componentes principais – *principal component*; SEC= erro-padrão da calibração - *standard error of calibration*; SECV= erro-padrão da calibração cruzada - *standard error of cross validation*; RPD= relação de desempenho do desvio - *ratio of performance to deviation*; Corr= correlação

Fonte: A autora

As variáveis DPCMS, DIVMS, CH₄, CO₂ e pH, apresentadas na tabela 2, retrataram variabilidade em todos os bancos de dados.

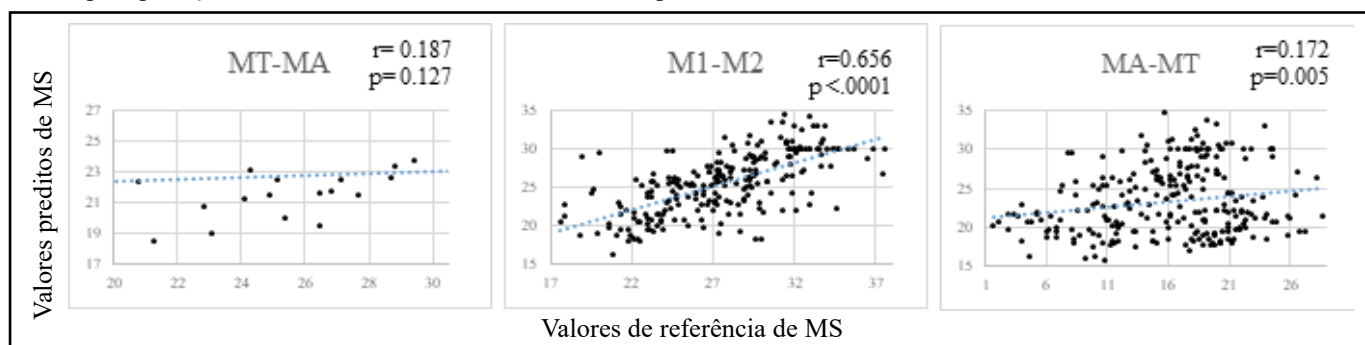
Em ambas as metodologias de determinação de digestibilidade, observou-se valores de R² que denotam bons modelos de calibração, podendo ser confirmados, no caso da DPCMS, pelos elevados resultados de correlação apresentados. Todos os resultados de correlação entre valores observados e preditos pela equação de calibração exibiram valores que variaram de regulares a bons e, de acordo com os RPD observados, as variáveis CH₄ e pH representam modelos não confiáveis.

Em todas as variáveis observou-se correlação linear positiva entre os dados oriundos do laboratório e dados preditos pelo NIR.

3.3.2 Predição entre bancos de dados

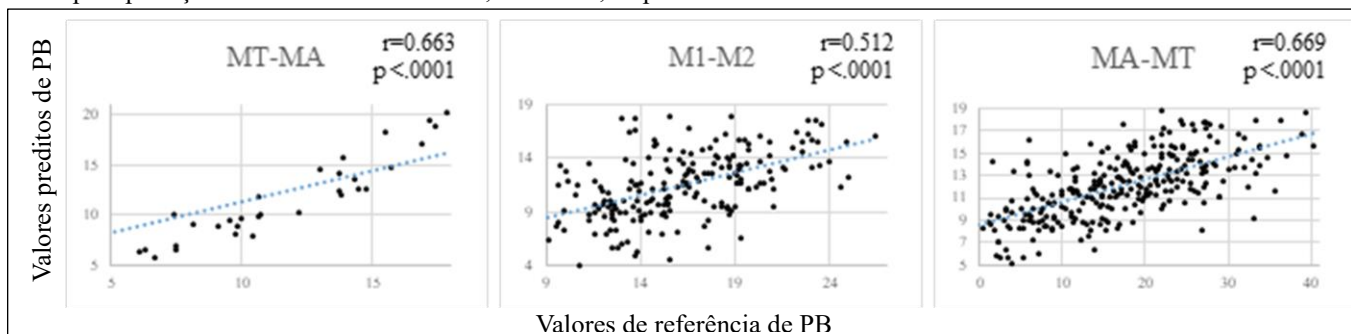
As figuras 1 e 2 apresentam os resultados de validação externa avaliando modelos dos parâmetros MS e PB em 3 grupos de bancos de dados, sendo MT com MA, M1 com M2 e Ma com MT, em que buscou-se observar se o modelo desenvolvido era robusto suficiente para prever valores de amostras não pertencentes ao banco de dados original, provenientes de anos e espécies distintas.

Figura 1 - Correlação entre valores de MS obtidos pelo método convencional nos bancos de dados Ma, M2 e MT e os resultados gerados utilizando-se as equações de calibração dos bancos de dados MT, M1 e Ma para predição dos bancos de dados Ma, M2 e MT, respectivamente.



Fonte: A autora

Figura 2 - Correlação entre valores de PB obtidos pelo método convencional nos bancos de dados Ma, M2 e MT e os resultados gerados utilizando-se as equações de calibração dos bancos de dados MT, M1 e Ma para predição dos bancos de dados Ma, M2 e MT, respectivamente.



Fonte: A autora

Como observado nas figuras 1 e 2, o modelo desenvolvido para predição de MS no banco de dados Mombaça 1 pode ser empregado na predição dos valores de MS das amostras do ano subsequente, representado pelo banco de dados Mombaça 2. Com relação à validação externa dos modelos de PB, observa-se que todos os modelos apresentaram correlação positiva entre os resultados obtidos no laboratório e os preditos no NIRS, o que pode ser também observado na maioria das propriedades apresentadas na Tabela 3, que expõe os coeficientes de correlação entre os valores obtidos pelo método convencional e os dados preditos a partir de modelo de calibração desenvolvido em banco de dados distinto.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação entre valores de propriedades obtidos no método tradicional e gerados a partir de curva de calibração desenvolvida em banco de dados distinto.

Propriedade	Bancos de Dados	r
MM	M1 prediz M2	0,952*
	MT prediz Ma	0,910*
	Ma prediz MT	0,852*
MO	M1 prediz M2	0,680*
DPCMS	M1 prediz Ma	0,944*
	Ma prediz M1	0,859*
DIVMS	M1 prediz Ma	0,707*
	Ma prediz M1	0,496*
CH ₄	M1 prediz Ma	0,650*
	Ma prediz M1	0,475
CO ₂	M1 prediz Ma	0,757*
	Ma prediz M1	0,560
pH	M1 prediz Ma	0,425*
	Ma prediz M1	0,426*

MM= matéria mineral; MO= matéria orgânica; DPCMS= digestibilidade pepsina-celulase da matéria seca; DIVMS= digestibilidade *in vitro* da matéria seca; CH₄= metano; CO₂= gás carbônico; pH= potencial hidrogeniônico; MT= Mombaça total; M1= Mombaça ano 1; M2= Mombaça ano 2; Ma= Massai.

*correlações significativas $p < 0,05$

Fonte: A autora

3.4 Discussão

3.4.1 Parâmetros estatísticos

As variabilidades observadas em todos os parâmetros a partir dos resultados de média, range e desvio padrão demonstraram-se aceitáveis ao desenvolvimento de modelos de calibração e validação NIRS (PARRINI et al., 2018; BEZADA et al., 2017).

Os valores de R^2 observados nos modelos de calibração e validação de MS foram semelhantes aos observados por Parrini et al. (2018), que obtiveram valores de R^2_c 0,99 e R^2_v 0,99, indicando que as equações desenvolvidas podem ser utilizadas por possuírem bons valores de coeficiente de determinação. Em relação aos bancos de dados do próprio estudo, também observaram-se bons valores de coeficientes de determinação, visto que os menores valores observados para calibração e validação foram 0,90 (MMT) e 0,68 (Ma), respectivamente. O menor valor foi o do banco de dados MMT, o que pode ser explicado pela grande variação entre as amostras, o que diminuiu a acurácia dos resultados, porém apresentou o maior valor de R^2_v , o que indica aumento de robustez do modelo, podendo ser utilizado em um banco de dados mais amplo.

O presente estudo apresentou, em todos os bancos de dados, valores de R^2_c de forma semelhante aos observados por Bezada et al. (2017) de R^2_c 0,90 e R^2_v 0,86, Decruyenaere et al. (2009) R^2_c 0,86 e Thomson et al. (2018) R^2_c 0,70, R^2_v 0,52 e RPD 1,32 exceto em M1 e Ma que, apesar de possuírem bons valores de R^2_c , apresentam baixos R^2_v , possivelmente pelo menor número de amostras presente no grupo de validação, o que poderia ser melhorado com a inclusão de maior número de amostras ao banco de dados.

Os valores do coeficiente de determinação da MO foram semelhantes aos observados por Castro, Fernández-Lorenzo e Valladares (2005) (R^2_c 0,92, R^2_v 0,88) nos bancos de dados MMT e M1 MT e M2 apresentaram valores inferiores de R^2_v , o que afetou a acurácia dos modelos.

O nitrogênio total (N) ou proteína bruta é um dos componentes das forragens e rações mais frequentemente medidos pela espectroscopia do infravermelho próximo e a principal causa são as fortes absorções -N-H na região NIR (STUTH; JAMA; TOLLESON, 2003), como observado pelos valores dos coeficientes de determinação do presente estudo nos bancos de dados MMT, MT, M2 e Ma, que apresentaram também RPD com valores superiores aos demais. Os parâmetros gerados pelas curvas de calibração da maior parte dos bancos de dados corroboram com os observados por

Thomson et al. (2018) (R^2_c 0,97; R^2_v 0,75; RPD 1,58) e foram menores que os observados por Parrini et al. (2018), que obteve valores de R^2_c 0,99 e R^2_v 0,99 em calibrações.

A mensuração de extrato etéreo com NIRS é menos comum (STUTH; JAMA; TOLLESON, 2003) e em todos os bancos de dados do presente estudo observou-se modelos com performance inadequada e baixa acurácia, demonstrados pelos valores de RPD e R^2 , semelhantemente ao observado por Thomson et al. (2018), que apesar do valor elevado de R^2_c 0,83 apresentou menores valores de R^2_v 0,25 e RPD 0,89, sendo ambos inferiores dos observados por Parrini et al. (2018) (R^2_c 0,98; R^2_v 0,98). Dale (2014) obteve inadequados resultados de parâmetros de modelos de calibração de EE e atribuiu este fato ao menor conteúdo da propriedade em forragens, bem como ao próprio método clássico de análise que determina não apenas o conteúdo de gordura, mas também ceras e pigmentos solúveis da planta, o que indica um provável acúmulo de erros provenientes da análise gravimétrica.

No que diz respeito aos parâmetros gerados no desenvolvimento de modelos de predição de FDN, FDA e LIG, o único banco de dados que demonstrou acurácia confiável e calibrações regulares a partir dos maiores valores de R^2 e menores erros de calibração e validação foi o que continha todas as amostras (MMT), demonstrando que é importante ter variabilidade no banco de dados afim de aumentar a robustez e possibilitar a aplicabilidade do mesmo, possivelmente pois a maior variação das amostras permite uma diluição dos erros provenientes das análises gravimétricas que, no caso dos presentes parâmetros, são sequenciais e, portanto, acumulativos. Os valores observados no presente estudo foram inferiores aos observados por Bezada et al. (2017) que obtiveram R^2_c 0,90 e R^2_v 0,86 para FDN e Parrini et al. (2018) que apresentou valores de R^2_c 0,99 e R^2_v 0,98 para FND, R^2_c 0,99 e R^2_v 0,98 em ADF e R^2_c 0,99 e R^2_v 0,98 para LIG. Desta forma, sugere-se a inclusão de maior quantidade de amostras de valores distintos a fim de aumentar a confiabilidade deste método de determinação (MOLANO et al., 2016).

Com relação aos indicadores de qualidade e precisão das calibrações cruzadas desenvolvidos para as metodologias de determinação de digestibilidade, bons modelos foram desenvolvidos, confirmados pelos altos valores de R^2_{cv} e baixos erros apresentados. Ao serem avaliados os valores de RPD, observa-se que DPCMS exibe valores superiores aos de DIVMS, que apresentou modelos com valores menores, porém ainda relativamente altos, o que pode ser justificado pelos parâmetros dos modelos de calibração cruzada gerados, diretamente influenciados pela natureza da metodologia, sendo uma análise de digestibilidade “química”, em que não há inclusão do “fator animal”, portanto

apresentam resultados mais precisos, porém não necessariamente mais acurados em referência ao resultado real de digestibilidade do alimento.

Isso é corroborado, por exemplo, nos resultados de amplitude e desvio padrão entre os bancos de dados de DPCMS e DIVMS, que possuem as mesmas amostras, porém a DIVMS possui valores com maior amplitude e valores mais elevados de desvio padrão. Os valores de R^2_{cv} corroboram com os apresentados na literatura, em que Andueza et al. (2016) obteve valor de 0,97 em modelo de calibração cruzada para predição de DPCMS e Castro, Fernández-Lorenzo e Valladares (2005) de 0,95 e SEC de 1,82.

No tocante aos produtos gerados na análise de DIVMS (CH_4 , CO_2 e pH), a maior parte dos coeficientes de determinação tiveram valores de regulares a bons ($R^2 > 0,70$), no entanto não foi acompanhado pelos valores de RPD, o que aponta a necessidade de maior número de amostras para aumentar a confiabilidade do modelo, visto que se tratam de modelos de predição de gases, porém observa-se potencial para utilização da técnica. O modelo construído para predição de pH apresentou RPD semelhante ao observado por Thomson et al. (2018) (RPD=1,21) que, apesar de elevado valor de R^2_c (0,93), apresentou R^2_v indicando calibração ineficaz (0,48).

A correlação positiva observada em todos os bancos de dados permite afirmar que os valores gerados pelo pré-tratamento da segunda derivada possuem relação com os obtidos no laboratório, assim como observado por Norris et al. (1976).

A partir dos dados apresentados no presente estudo e notando que o grupo MMT apresentou bons modelos de calibração e validação desenvolvidos, é mais conveniente e prático a utilização de uma equação “global” criada e implementada contendo as diferentes cultivares de anos distintos, inclusive pelo tempo maior que é necessário para coletar quantidade suficiente de amostras para calibração e construção de modelos robustos e acurados, corroborando com Thomson et al. (2018) e Andueza et al. (2011), que também observaram aumento nos valores de SEP quando calibração com base de dados restrita foi utilizada ao invés da global, sendo um resultado indesejado para modelos de calibração.

3.4.2 Validação externa entre bancos de dados

Em relação aos procedimentos de validação externa em que foram utilizados bancos de dados distintos no tocante ao ano e cultivares, observou-se que, para avaliação de MS, a única validação externa que apresentou correlação positiva regular significativa entre os dados gerados pelo modelo e os observados no laboratório foi entre Mombaça

ano 1 e Mombaça ano 2, mostrando que o modelo gerado em um ano pode ser utilizado para predição de MS no ano seguinte dentro da mesma cultivar.

No caso de predições entre cultivares distintas, acredita-se que o modelo mais acurado seja o que abrange maior variedade de cultivares e anos, principalmente em casos semelhantes ao do presente estudo, em que os coeficientes de determinação da validação indicam modelos com calibração variando de ineficaz (Ma=0,68) a regular (MT=0,79), não predizendo, portanto, com a necessária precisão, especialmente quando um grupo possui características morfofisiológicas distintas.

Na predição de PB utilizando bancos de dados com diferentes cultivares de *Panicum maximum* e proveniente de diferentes anos, observou-se correlação positiva significativa em todos os modelos, podendo-se afirmar que os modelos gerados podem ser utilizados para predição, mesmo que de anos ou cultivares distintos, porém com ressalvas com relação à acurácia, como observado pelo menor coeficiente de correlação na predição de M2 a partir do modelo gerado em M1 ($r=0,512$), sendo reflexo do menor valor de RPD (1,26) quando comparado aos bancos de dados MT (1,86) e Ma (1,82), visto que o RPD demonstra quão acurado e confiável está o modelo desenvolvido.

Observaram-se satisfatórios valores de correlação nas predições de MM realizadas entre todos os bancos de dados, apresentando o maior valor de correlação entre predição realizada entre anos distintos na mesma espécie (0,952).

Com relação aos resultados de predição externa entre bancos de dados de modelos de calibração desenvolvidos para análises de digestibilidade e produção de gases, observaram-se maiores valores de correlação no parâmetro DPCMS em comparação à DIVMS, possivelmente relacionada à natureza da análise laboratorial.

No caso de produtos da fermentação, como estimativas de CH₄, CO₂ e pH, observaram-se comportamentos distintos, em que nas predições realizadas a partir do banco de dados Ma para CH₄ e CO₂ não foram observadas correlações, confirmando, portanto os resultados de RPD, que foram inferiores no banco de dados em questão. Destaca-se que mesmo nas predições em que foram observadas correlações, os valores apresentados variaram de fracos (CO₂ e pH) a regulares (CH₄) indicando, portanto, a inclusão de dados e análises laboratoriais afim de aumentar a acurácia dos modelos.

3.5 Conclusão

O presente estudo apresentou coeficientes de calibração e validação satisfatórios no que diz respeito à maior parte das variáveis relacionadas à composição química e

digestibilidade de forragens, no caso *Megathyrus maximus*, em que a partir de uma curva “global” é possível serem desenvolvidos modelos robustos e confiáveis de avaliação.

Os resultados de correlação entre bancos de dados demonstraram a possibilidade de predição das propriedades MS, PB, MM, MO, DIVMS, DPCMS, CH₄, CO₂ e pH a partir da obtenção de elevados valores entre anos e satisfatórios na maior parte das predições realizadas entre modelos de calibração desenvolvidos em bancos de dados de forragens de espécies distintas.

3.6 Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro (bolsa de doutorado) dado pela CAPES Pró-Amazônia e à Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA), EMBRAPA Gado de Leite e CIRAD umr Selmet pela realização do experimento e análises laboratoriais.

Referências

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Pefil da Pecuária no Brasil**, 2018.

ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; CALLEJA, A.; GIRÁLDEZ, F. J. Nutritive evaluation of forages by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 13, n. 6, p. 301–311, 2005.

ANDUEZA, D.; PICARD, F.; JESTIN, M.; ANDRIEU, J.; BAUMONT, R. NIRS prediction of the feed value of temperate forages: efficacy of four calibration strategies. **Animal**, v. 5, n. 7, p. 1002–1013, 2011.

ANDUEZA, D.; PICARD, F.; MARTIN-ROSSET, W.; AUFRÈRE, J. Near-Infrared Spectroscopy Calibrations Performed on Oven-Dried Green Forages for the Prediction of Chemical Composition and Nutritive Value of Preserved Forage for Ruminants. **Applied Spectroscopy**, v. 70, n. 8, p. 1321–1327, 2016.

AOAC (2005) Association of Official Analytical Chemists International. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.

AUFRERE, J. Etude de la prevision de la digestibilite des fourrages par une methode enzymatique. **Annales de zootechnie INRA/EDP Sciences**, v. 31, n. 2, p.111-130, 1982.

BEZADA, S. Q.; ARBAIZA, T. F.; CARCELÉN, F. C.; SAN MARTÍN, F. H.; LÓPEZ, C. L.; ROJAS, J. E.; VÉLEZ, V. M. Predicción de la Composición Química y Fibra

Detergente Neutro de Rye Grass Italiano (*Lolium multiflorum Lam*) mediante Espectroscopía de Reflectancia en Infrarrojo Cercano (NIRS). **Revista de Investigaciones Veterinaria del Perú**, v. 28, n. 3, 538–548, 2017.

BOSCHMA, S. P.; MURPHY, S. R.; HARDEN, S. Growth rate and nutritive value of sown tropical perennial grasses in a variable summer-dominant rainfall environment, Australia. **Grass and Forage Science**, v. 72, p. 234–247, 2017.

CASTRO, P.; FERNÁNDEZ-LORENZO, B.; VALLADARES, Y. J. Análisis de pastos mediante NIRS. **XLV Reunión Científica de La SEEP**, v. 1, p. 73–80, 2005.

DALE, L. M. **Using NIR and NIR-HSI Spectrometry To Study Forage Chemical and Botanical Composition**. 2014. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências Agronomicas e Engenharia) Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2014.

DE SOUSA, L. C.; GOMIDE, J. L.; MILAGRES, F. R.; DE ALMEIDA, D. P. Desenvolvimento de modelos de calibração NIRS para minimização das análises de madeiras de eucalyptus spp. **Ciencia Florestal**, v. 21, n. 3, p. 589–597, 2011.

DECRUYENAERE, V.; FROIDMONT, E.; BARTIAUX-THILL, N.; BULDGEN, A.; STILMANT, D. Faecal near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) compared with other techniques for estimating the in vivo digestibility and dry matter intake of lactating grazing dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 3–4, p. 220–234, 2012.

DECRUYENAERE, V.; LECOMTE, P.; DEMARQUILLY, C.; AUFRERE, J.; DARDENNE, P.; STILMANT, D.; BULDGEN, A. 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, p. 138–156, 2009.

ERGON, A.; KIRWAN, L.; FYSTRO, G.; BLEKEN, M. A.; COLLINS, R. P.; ROGNLI, O. A. Species interactions in a grassland mixture under low nitrogen fertilization and two cutting frequencies. II. Nutritional quality. **Grass and Forage Science**. v. 72, p. 333-342, 2017.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analyses** (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). In Agriculture Handbook No. 379 (pp. 1–24), 1970.

HACK, E. C.; FILHO, A. B.; MORAES, A. D.; CARVALHO, P. C.; MARTINICHEN, D.; PEREIRA, T. N. Características estruturais e produção de leite em pastos de capim-mombaça (*Panicum maximum Jacq.*) submetidos a diferentes alturas de pastejo. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 218–222, 2007.

HILL, J.; MCSWEENEY, C.; WRIGHT, A. D. G.; BISHOP-HURLEY, G.; KALANTAR-ZADEH, K. Measuring Methane Production from Ruminants. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 26–35, 2016.

HOLTSHAUSEN, L.; CHAVES, A. V.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MCALLISTER, T. A.; ODONGO, N. E.; BENCHAAAR, C. Feeding saponin-containing

Yucca schidigera and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2809–2821, 2009.

LAWRENCE, D. C.; O'DONOVAN, M.; BOLAND, T. M.; KENNEDY, E. Effects of autumn and spring defoliation management on the dry-matter yield and herbage quality of perennial ryegrass swards throughout the year. **Grass and Forage Science**, v. 72, p. 38-49, 2017.

LONGO, C. **Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 154f. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 4, p. 321–330, 1999.

MAXWELL, T. M. R.; MOIR, J. L.; EDWARDS, G. R. Grazing preference of Merino sheep for naturalized annual clover species relative to commonly sown clover species. **Grass and Forage Science**, v. 71, -. 291-304, 2016.

MCROBERTS, K. C.; PARSONS, D.; KETTERINGS, Q. M.; HAI, T. T.; QUAN, N. H.; BA, N. X.; CHERNEY, D. J. R. Urea and composted cattle manure affect forage yield and nutritive value in sandy soils of south-central Vietnam. **Grass and Forage Science**, v. 73, p. 132-145, 2018.

MERTENS, D. R. **Regulation of forage intake**. In G. C. (Ed. . FAHEY JR. (Ed.), Forage quality, evaluation and utilization (pp. 450–493). Madison: American Society of Agronomy, 1994.

MOLANO, M. L.; CORTÉS, M. L.; ÁVILA, P.; MARTENS, S. D.; MUÑOZ, L. S. Ecuaciones de calibración en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 4, n. 3, p. 139-145, 2016.

NORRIS, K.; BARNES, R. F.; MOORE, J.; SHENK, J. S. Predicting Forage Quality by Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 889–897, 1976.

PARRINI, S.; ACCIAIOLI, A.; CROVETTI, A.; BOZZI, R. 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.

PERRAMON, B.; BOSCH-SERRA, D.; DOMINGO-OLIVÉ, F.; BOIXADERA, J. The efficiency of nitrogen in cattle manures when applied to a double-annual forage cropping system. **Grass and Forage Science**, v. 72, p. 676–690, 2016.

SAS® University Edition, SAS 9.1.3 Cary, NC: SAS Institute Inc., 2013.

SHENK, J.; WESTERHAUS, M.; HOOVER, M. Analysis of Forages by Infrared

Reflectance. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 5, p. 807-812, 1979.

STUTH, J.; JAMA, A.; TOLLESON, D. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. **Field Crops Research**, v. 84, p. 45–56, 2003.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3–4, p. 185–197, 1994.

THOMSON, A. L.; HUMPHRIES, D. J.; RYMER, C.; ARCHER, J.; GRANT, N.; REYNOLDS, C. K. Assessing the accuracy of current near infra-red reflectance spectroscopy analysis for fresh grass-clover mixture silages and development of new equations for this purpose. **Animal Feed Science and Technology**, v. 239, p. 94–106, 2018.

TORRES, F. E.; DE OLIVEIRA, E. P.; TEODORO, P. E.; DA SILVEIRA, M. V.; RIBEIRO, L. P.; SILVEIRA, O. Forage production of *Panicum maximum* cultivars under different growing seasons and seed types. **Revista de Ciências Agrárias de Portugal**, v. 36, n. 4, p.435–440, 2013.

TOWETT, E. K.; ALEX, M.; SHEPHERD, K. D.; POLREICH, S.; AYNEKULU, E.; MAASS, B. L. Applicability of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for determination of crude protein content in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 45–53, 2013.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the Official Agricultural Chemist**, v.50, p.50-55, 1967.

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

WILLIAMS, P. C.; D. C. SOBERING. How we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**. A. M. C. Davies and P. C. Williams, ed. (pp. 185–188). NIR Publications, Chichester, UK, 1996.

CAPÍTULO 3

ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE METANO ENTÉRICO

Resumo: Herbívoros ruminantes produtores de leite, carne e outros derivados consumidos por humanos como bovinos, ovinos, bubalinos e caprinos, produzem metano por meio da fermentação ruminal, sendo esta uma questão não apenas ambiental, porém também questão de ordem econômica e produtiva, pois estima-se que, durante a fermentação, a formação de metano represente perda de 7 a 10% do consumo de energia bruta. Metodologias convencionais para avaliação de parâmetros elementares na produção animal como composição química, consumo, digestibilidade e produção de metano são laboriosas, o que muitas vezes torna inseguro e/ou atrasa tomadas de decisão que avaliem a sustentabilidade do sistema de produção e a metodologia NIRS ganham destaque por ser rápida, não utilizar grandes quantidades de amostra, não ser destrutiva, não utilizar reagentes, dentre outros. Dentro da utilização da técnica NIRS, o NIRS Fecal (FNIRS) tem sido grandemente difundido e no presente estudo objetivou-se avaliar a metodologia NIRS para predição do consumo de matéria seca, digestibilidade de matéria seca e emissão de metano a partir de espectros de líquido ruminal, conteúdo ruminal, fezes úmidas e fezes secas e moídas, provenientes de estudo que utilizou a tecnologia do hexafluoreto de enxofre para quantificação da produção de metano de 28 ovinos Dorper-Santa Inês. Para isso, utilizou-se o equipamento NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001 e o software NIRCal® BUCHI para análises quimiométricas. Com o presente estudo, concluiu-se que é possível estimar a produção *in vivo* de metano a partir de espectros de líquido ruminal, conteúdo ruminal, fezes úmidas e fezes secas em moídas, observado pelos valores de coeficiente de determinação da calibração, em que se destacam os modelos desenvolvidos a partir de amostras de fezes úmidas e fezes secas e moídas, indicando maior acurácia e robustez, porém pelo trabalho pioneiro desenvolvido, nota-se a necessidade do desenvolvimento de mais estudos.

Palavras-chave: Consumo. Digestibilidade. Fezes. FNIRS. Hexafluoreto de enxofre. Ovinos.

Abstract: Ruminant herbivores that produce milk, meat and other derivatives consumed by humans such as cattle, sheep, buffaloes and goats, produce methane through ruminal fermentation, which is not only an environmental issue, but also a matter of economic and productive order because during fermentation the formation of methane represents loss of 7 to 10% of gross energy. Conventional methodologies for evaluating elementary parameters in animal production such as chemical composition, intake, digestibility and methane production are laborious, which often renders insecure and/or delay decisions that assesses the sustainability of the production system. In this case, the NIRS methodology stands out for being fast, not using large amounts of sample, not being destructive, not using reagents, among others. In the NIRS technique, Fecal NIRS (FNIRS) has been widely disseminated and the objective of this study was to evaluate the NIRS methodology to predict dry matter intake, dry matter digestibility and methane emission from samples of ruminal fluid, ruminal content, moist feces and dry and ground feces from a study using sulfur hexafluoride technology to quantify the methane production of 28 sheep. For this, the NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001 and the NIRCal® BUCHI software were used for chemometric analysis. With the present study, it was possible to estimate the *in vivo* production of methane from ruminal fluid, ruminal content, moist feces and dry and ground feces, observed by the values of coefficient of determination of the calibration, in which highlight the models developed from samples of moist feces and dry and ground feces, indicating greater accuracy and robustness, but for the pioneer work developed, it is noted the need to develop more studies.

Keywords: Intake. Digestibility. Feces. FNIRS. Sheep. Sulfur hexafluoride.

4.1 Introdução

Herbívoros ruminantes produtores de leite, carne e outros derivados consumidos por humanos como bovinos, ovinos, bubalinos e caprinos, produzem metano (CH₄) por meio da fermentação ruminal (NEVES, 2008) e têm sido responsabilizados pelo aumento da temperatura global, pois o CH₄ é um potente gás de efeito estufa por possuir propriedade de absorção de radiação infravermelha.

A produção de CH₄ não apenas representa preocupação ecológica e ambiental, como é também questão de ordem econômica e produtiva, pois estima-se que, durante a fermentação, a formação de CH₄ represente perda de 7 a 10% do consumo de energia bruta (MOSS; GIVENS, 1993), podendo variar pelo nível de consumo, composição da dieta e digestibilidade aparente de energia (SOLIVA; HESS, 2007).

Metodologias convencionais para avaliação de parâmetros elementares na produção animal como composição química, consumo, digestibilidade e produção de metano são laboriosas, o que muitas vezes torna inseguro e/ou atrasa tomadas de decisão que avaliem a sustentabilidade do sistema de produção. No caso da mensuração de CH₄, a técnica do hexafluoreto de enxofre (SF₆) possibilita a mensuração de grande número de animais em pastejo (HAMMOND et al., 2009), porém requer considerável investimento em infraestrutura e suporte técnico, além da possibilidade de alterar o comportamento animal, portanto metodologias como Espectroscopia do Infravermelho Próximo (*Near Infrared Spectroscopy* - NIRS) ganham destaque.

A tecnologia NIRS tem sido amplamente utilizada por ser rápida, utilizar pouca quantidade de amostra, requer pouca ou nenhuma preparação da amostra, não ser destrutiva, não utilizar reagentes químicos, permitir análise de diversos parâmetros simultaneamente, dentre outros (BERCHIELLI, 2006; DECRUYENAERE et al., 2012; NORRIS et al., 1976); para aplicação e validação da técnica, é necessário o desenvolvimento de curvas de calibração composta por banco de dados com amostras com parâmetros de valores obtidos a partir de análises convencionais previamente realizadas.

A metodologia NIRS tem sido aplicada de diversas maneiras na produção de ruminantes, desde análise de forragens até predição de qualidade da carne e produção diária de CH₄ em gado de leite (DEHARENG et al., 2012). Uma das maneiras que tem sido difundida nos últimos anos tem sido pela utilização do NIRS fecal, em que o NIRS facilita a análise econômica e oportuna dos constituintes das fezes com o objetivo de usar

essas informações para prever alguns atributos da dieta (DIXON; COATES, 2009) ou informações referentes à digestibilidade ou consumo.

Através de análises quimiométricas e valores provenientes de análises convencionais confiáveis, é possível implantar a tecnologia NIRS para predição de parâmetros em que as medições espectrais são realizadas em amostras que não são necessariamente o material de interesse, mas um material derivado, como fezes (DIXON; COATES, 2009), líquido ruminal (TURZA et al., 2002) ou conteúdo ruminal.

O NIRS Fecal, técnica que utiliza o espectro de fezes para desenvolvimento de curvas de calibração e validação no NIRS, tem sido uma metodologia difundida e aplicada com acurácia e robustez na produção de ruminantes (ANDUEZA et al., 2017; FANCHONE; LI et al., 2007; STUTH; JAMA; TOLLESON, 2003; PEARCE; LYONS; STUTH, 1993) pela alta correlação existente entre o conteúdo com componentes de interesse, como balanço nutricional, além facilidade de coleta da amostra, que pode ser feita até em animais criados de forma extensiva, tendo a vantagem de não alterar o comportamento animal.

O rúmen pode ser considerado uma grande caixa de fermentação, em que as macromoléculas do alimento são consumidas e convertidas em diversos produtos (TURZA et al., 2002), incluindo o CH₄, portanto o trabalho também visou avaliar a possibilidade de estimação da produção de CH₄ entérico a partir de amostras obtidas do rúmen, sendo líquido e conteúdo ruminal, observando de quais podem ser obtidos melhores parâmetros de calibração e validação, que promovam acurácia e robustez aos modelos, com consequentes resultados confiáveis.

Objetivou-se avaliar a metodologia NIRS para predição da produção *in vivo* de CH₄ a partir de espectros de líquido ruminal, conteúdo ruminal, fezes úmidas e fezes secas e moídas.

4.2 Material e Métodos

O presente experimento foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA), obtendo parecer aprovado, protocolado sob o CEUA nº 8694141217.

4.2.1 Local, animais e dietas experimentais

O experimento foi conduzido de maio a julho de 2017 no galpão experimental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – IFPA, localizado no

município de Castanhal com coordenadas geográficas 1°18'10.08" S, 47°56'56.10" W, que possui tipo climático Af segundo Köppen e precipitação média de 2.770mm/ano. As médias de temperatura e umidade relativa do ar anual são 26,8°C e 85%, respectivamente (BASTOS et al., 2002). Foram utilizados 28 cordeiros castrados mestiços Dorper-Santa Inês com peso vivo (PV) inicial médio de 22±3 kg, alojados em gaiolas metabólicas medindo 0,80x1,20 metros, providas de cocho, baldes para fornecimento de água e sal e bandejas apropriadas para colheita de fezes. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 08h e 16h, de modo que houvesse 20% de sobras para análise do consumo.

As dietas tiveram na composição 400g/kg MS de volumoso (silagem de milho), 600g/kg MS de concentrado e mistura mineral. A porção do concentrado foi constituída de concentrado padrão e de coprodutos regionais (torta de cupuaçu e torta de tucumã). Os tratamentos testados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes nas dietas experimentais.

Ingredientes	Milho e Soja	Soja grão	Torta	
			Cupuaçu	Torta Tucumã
Silagem Milho	40,0	40,0	40,0	40,0
Milho	43,2	40,7	6,2	13,2
Farelo Soja	14,8	1,3	6,8	13,9
Soja grão	-	14,5	-	-
Óleo Soja	-	1,5	-	-
Torta de Cupuaçu	-	-	45,0	-
Torta de Tucumã	-	-	-	30,9
Suplemento mineral-vitamínico ¹	1,5	1,5	1,5	1,5
Calcário	0,5	0,5	0,5	0,5

¹ Cálcio 140 g Fósforo 65 g Magnésio 10 g Enxofre 12 g Sódio 130 g Cobalto 80 mg Ferro 1000 mg Iodo 60 mg Manganês 3.000 mg Selênio 10 mg Zinco 5.000 mg Flúor (máx) 650 mg Vitamina A 50.000 U.I. Vitamina E 312 U.I

Fonte: A autora

Os concentrados foram semanalmente misturados em misturador durante 15 minutos a fim de impedir oxidação e rancificação dos ingredientes, sendo posteriormente acondicionados em tambores hermeticamente fechados. A abertura do silo foi realizada semanalmente e o armazenamento ocorreu da mesma maneira.

As tortas de cupuaçu e tucumã foram adquiridas da empresa AmazonOil, localizada em Ananindeua, Pará, sendo todas oriundas de processamento mecânico.

4.2.2 Consumo (CMS)

Na avaliação do consumo, durante 54 dias (incluindo período de coleta) a

quantidade de dieta fornecida foi calculada de acordo com o consumo de matéria seca (CMS) prévio e ajustes foram feitos de forma a permitir 20% de sobras no ofertado diário. Para estimação do CMS, amostras de ingredientes e de dietas remanescentes foram coletadas e pesadas, em que amostras compostas por semana foram devidamente acondicionadas em sacos de plástico, identificadas e congeladas em freezer a -20 °C para posteriores análises laboratoriais.

4.2.3 Digestibilidade

A digestibilidade aparente foi estimada durante três períodos experimentais de cinco dias, a partir de amostras de dieta fornecida, rejeitada e fezes, sendo coletados 20% de amostras para análise.

Todo material amostrado (dieta e fezes) foi devidamente acondicionado em sacos de plástico, identificados e congelados em freezer a -20 °C. Para as análises químicas, amostras dos ingredientes e das dietas rejeitadas foram descongeladas e secas a 55 °C por 72 h, sendo posteriormente moídas em moinho estacionário do tipo Willey utilizando-se peneira com crivos de 1 (um) milímetro e armazenadas em recipientes de polietileno com tampa, para posteriores determinações de matéria seca (MS), em que as amostras foram secas em estufa a 105 °C por 16 horas (AOAC-967.03). Foram determinados também os teores de MM (matéria mineral ou cinzas) pela queima da MO (matéria orgânica) em mufla a 600° C durante 4 horas (AOAC Método Oficial 942.05), proteína bruta (PB) (AOAC Método Oficial 984.13) e extrato etéreo (EE) (AOAC Método Oficial 920.39), sendo determinados de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2005). As determinações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das amostras foram realizadas utilizando aparelho ANKON Fiber Analyzer F200 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY) de acordo com o método descrito por Goering e Van Soest (1970) e Van Soest; Robertson; Lewis (1991). Os teores de lignina foram analisados pelo método Van Soest e Wine (1967).

O consumo de nutrientes foi obtido pela diferença do fornecido pelo rejeitado, sendo o coeficiente de digestibilidade aparente “CDA”:

$$CDAN (\%) = [(NCON - NEXC) / NCON] \times 100$$

Sendo:

CDAN = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente

NCON = quantidade do nutriente consumido (g)

NEXC = quantidade do nutriente excretado (g)

(SILVA; LEÃO, 1979).

4.2.4 Amostragem de fezes

Durante os cinco dias finais de cada período experimental foram realizadas coletas totais de fezes, sendo armazenadas congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de coleta do espectro, em que foram descongeladas a temperatura ambiente e, após primeira coleta do espectro (fezes úmidas), foram posteriormente secas a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, no mínimo, 72 h e moídas em moinho estacionário do tipo Willey utilizando-se peneira com crivos de 1 (um) milímetro para segunda coleta dos espectros, com amostras de fezes secas e moídas.

4.2.5 Amostragem de líquido e conteúdo ruminal

Ao final de cada período experimental, amostras de líquido ruminal foram coletadas por sonda esofágica, sendo retirados em torno de 50 mL de líquido ruminal filtrado em fralda de algodão no momento da coleta, retirando-se conteúdo da saliva. As amostras foram armazenadas em tubo falcon de 50 mL identificados e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do descongelamento e consequente coleta de espectro.

Os animais foram abatidos ao final do experimento e, nesse momento, houve coleta única de amostra de conteúdo ruminal em sacos plásticos identificados, que foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do descongelamento para coleta de espectro e posterior descarte.

4.2.6 Hexafluoreto de enxofre (SF_6)

A emissão *in vivo* de CH_4 foi estimada pela técnica do hexafluoreto de enxofre (SF_6) (JOHNSON et al. 1994 adaptada por MEISTER et al., 2013), onde o gás emitido por cada animal foi coletado diariamente durante 5 dias consecutivos. Os 28 ovinos foram adaptados aos aparatos usados na coleta, durante 21 dias, no período pré-experimento. As cápsulas de permeação de SF_6 , com taxa de emissão conhecida, foram administradas oralmente, através de sonda esofágica, 72 horas antes do início das coletas, para permitir que a emissão do gás se tornasse constante. Antes da administração, os tubos de permeação foram mantidos em água a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 semanas no laboratório e pesados semanalmente.

Cada animal foi equipado com um aparato para coleta dos gases composto por: cabresto de coleta de gás, o qual possui tubo capilar com passagem de fluxo de ar conhecido; recipientes coletores feitos de tubo PVC denominados “cangas”, onde foram

armazenados os gases eructados pelo animal; e selote, sela em tamanho reduzido, alocada no dorso do animal onde a canga foi fixada. O cabresto era conectado a canga, a qual possuía pressão negativa, que foi preenchida de gases até a metade da capacidade, ao longo de 24 h.

As coletas iniciavam às 06h00, diariamente, uma por uma, respeitando-se a mesma ordem de coleta. A cada intervalo de coleta de 24 h a canga do animal era desconectada, tinha a pressão mensurada e era substituída. Para esta técnica, uma bomba de vácuo dois estágios e um manômetro digital, com escala de 0 a 203 kPa, foram utilizados, o que permitiu a mensuração da pressão inicial e final de cada canga, durante o período de coleta.

Um mínimo de cinco amostras de cada animal era requerido para ser incluído na análise dos dados. Cada canga teve a pressão anotada e posteriormente pressurizada utilizando-se gás nitrogênio puro (N₂). Duas amostras do ar do ambiente foram coletadas por dia, a fim de determinar a concentração de CH₄ e SF₆ ambiental. Esses valores foram subtraídos das amostras dos animais e serviram para calcular a produção líquida do ar expirado.

Após o término do período de coletas e antes da determinação dos gases CH₄ e SF₆, as cangas foram pressurizadas entre 1,3 e 1,5 psi (g) com injeção de nitrogênio e, em seguida, as leituras das pressões de diluição inicial e final foram obtidas com um manômetro digital portátil (± 0.01) certificado para faixa de leitura de -1 a +3 bar, com o objetivo de se obter o fator de diluição. As curvas de calibração dos gases foram feitas através dos gases padrão, com concentrações CH₄ em ppm (5 ± 0.25 , 10 ± 0.16 e 19 ± 0.65 ppm) e para SF₆ em ppt (34 ± 9.0 , 91 ± 9.0 e 978 ± 98.0 ppt), de acordo com Westberg et al. (1998).

As concentrações de CH₄ e SF₆ foram determinadas na Embrapa Amazônia Oriental, no Laboratório de Análises de Sistemas Sustentáveis, localizado em Belém - PA, através de cromatógrafo a gás Modelo 7890A, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna megabore (0,53 μ m, 30 m) Plot HP-Al/M (para CH₄) e detector de captura de elétrons (μ -ECD) e coluna megabore HP-MolSiv (para SF₆).

A taxa de emissão de metano foi calculada de acordo com a fórmula:

$$Q_{CH_4} = Q_{SF_6} \times [CH_4]/[SF_6]$$

Onde:

Q_{CH₄}= taxa de emissão em litros/h

Q_{SF₆}= taxa de liberação conhecida de SF₆ do tubo de permeação

CH₄ e SF₆= concentrações de metano e hexafluoreto de enxofre mensuradas na canga.

As emissões de metano em g/dia, L/dia e g CH₄/kg CMS (g/kg) foram calculadas pela divisão da emissão diária de CH₄ de cada animal pelo consumo (durante coleta de metano) e a emissão de metano (g/animal/dia) em relação a g/PV; a variável g CH₄/h representa a produção de metano por hora, sendo todos ao longo do período experimental.

4.2.7 Análise por espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS)

Os espectros das amostras de fezes (tanto úmidas quanto secas e moídas), conteúdo ruminal e líquido ruminal foram coletados no Laboratório de Nutrição Animal (LABNUTAN) do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Belém, Pará, NIRFlex N-500 FT-NIR Spectrometer Technical Datasheet Cell N500-001 (Buchi AG, Flawil, Switzerland) que possui alcance espectral de 800 a 2500 nm utilizando mensurações sólidas em triplicata com resolução de 2 nm de amostras colocadas em placas de petri.

Quatro bibliotecas espectrais foram criadas a partir das amostras provenientes do experimento *in vivo*; a primeira biblioteca contendo todas as amostras de líquido ruminal (LR; N= 42), a segunda contendo amostras de conteúdo ruminal (CR; N= 16), a terceira sendo formada por amostras de fezes úmidas (FU; N= 53) e a quarta contendo amostras de fezes após processo de secagem e moagem (FSM; N= 52).

Os espectros coletados foram utilizados para predição de consumo de matéria seca (CMS), digestibilidade da matéria seca (DMS) e produção de metano de acordo com as variáveis g CH₄/h, CH₄ g/dia, CH₄ L/dia, CH₄ CMS, CH₄ g/PV e CH₄ (g/kg CMS), sendo que para predição de CMS e DMS foram utilizados apenas os espectros de fezes úmidas e fezes secas e moídas.

Foi utilizado o Software NIRCal® BUCHI a fim de promover o desenvolvimento de calibrações robustas e confiáveis através da correlação dos espectros NIR com as análises de referência.

4.2.7.1 Pre tratamento espectral, desenvolvimento de calibrações NIRS e validação de equações NIRS

A fim de minimizar o efeito da alteração da linha de base e permitir a produção de um modelo que ofereça acurácia e que atenda as especificações de calibração e validação,

os espectros foram pré-processados por uma combinação de tratamentos matemáticos utilizando a 2ª derivada de Taylor 3 pontos gap5. A regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR - Partial Least Squares Regression) foi utilizada para desenvolver equações de calibração para todas as variáveis utilizando os espectros das forragens. Foram realizadas eliminações de outliers baseados na estatística crítica T value $\geq 2,5$.

Foi utilizado o método de validação cruzada “one leave out” para avaliação da acurácia das equações de predição desenvolvidas.

4.2.7.2 Avaliação de equações NIRS

Para avaliar a precisão da curva, foram analisados os coeficientes de determinação da calibração (R^2_c) e o erro padrão de calibração (SEC). Foi avaliada também a raiz quadrada média do erro da calibração (SEC) e validação cruzada (SECV), buscando-se o menor valor de erro possível. A acurácia da predição das equações de calibração foi avaliada pelo coeficiente de determinação da validação cruzada (R^2_{vc}). De acordo com as recomendações de Shenk; Westerhaus; Hoover (1979), quanto menores os valores de SEC, mais ajustada a equação está e baixos valores de R^2 frequentemente indicam que os dados provenientes do laboratório são imprecisos. Também foi calculado o RPD (*ratio of performance to deviation* - relação de desempenho do desvio), que faz relação entre desvio padrão dos valores obtidos no laboratório (SD) e o erro padrão da validação cruzada (SECV) (DE SOUSA et al., 2011) e é também utilizado para avaliação da precisão e acurácia de equações NIRS (BEZADA et al., 2017).

Com relação à avaliação dos parâmetros, para R^2 utilizou-se o indicado por Andrés et al. (2005), em que os valores de 0,50-0,69, 0,70-0,89 e $>0,90$ denotam calibração ineficaz, regular e boa, respectivamente. Ao RPD, para que a equação fosse considerada confiável era necessário que o valor fosse maior que 3 (WILLIAMS & SOBERING, 1996).

Para avaliação das calibrações e predições, foram observadas a existência de correlações entre os valores oriundos do laboratório e os valores preditos pelo NIRS utilizando o PROC CORR Pearson ($P < 0,05$) utilizando pacote estatístico SAS® University Edition (2013).

4.3 Resultados

Tabela 2 - Estatística descritiva e parâmetros estatísticos dos modelos de calibração desenvolvidos para predição de metano (gCH₄/h, CH₄ g/dia, CH₄ L/dia, CH₄ CMS, CH₄ g/PV, CH₄ g/kg CMS), consumo e digestibilidade a partir de amostras de conteúdo ruminal, líquido ruminal, fezes úmidas e fezes secas e moídas.

Amostra	Variável		N	Média	Amplitude	DP	R ²	PC	SEC	SECV	RPD
Conteúdo Ruminal	gCH ₄ /h	VC	25	0,84	0,35 a 1,48	0,27	0,97	8	0,06	0,20	1,49
		Pred		0,84	0,31 a 1,52	0,26					
	CH ₄ g/dia	VC	24	20,36	8,5 a 35,73	6,31	0,97	8	1,54	4,93	1,32
		Pred		20,36	7,54 a 36,27	6,12					
	CH ₄ L/dia	VC	21	27,86	11,86 a 49,90	9,65	0,98	8	1,82	7,67	1,20
		Pred		27,86	10,64 a 51,94	9,48					
	CH ₄ CMS	VC	21	1,23	0,91 a 1,59	0,17	0,97	8	0,04	0,18	0,95
		Pred		1,23	0,80 a 1,61	0,17					
	CH ₄ g/PV	VC	22	0,51	0,21 a 0,75	0,15	0,87	4	0,08	0,13	1,12
		Pred		0,51	0,13 a 0,77	0,13					
	CH ₄ (g/kg CMS)	VC	22	16,80	6,67 a 29,36	5,77	0,74	4	3,86	5,43	1,07
		Pred		16,80	6,13 a 29,47	4,29					
Líquido Ruminal	gCH ₄ /h	VC	36	0,82	0,35 a 1,38	0,21	0,91	9	0,09	0,16	1,42
		Pred		0,82	0,35 a 1,41	0,20					
	CH ₄ g/dia	VC	41	20,48	8,5 a 36,21	6,12	0,90	8	2,67	4,67	1,37
		Pred		20,48	8,18 a 37,10	5,50					
	CH ₄ L/dia	VC	39	27,88	11,86 a 50,57	7,69	0,89	8	3,56	6,16	1,46
		Pred		27,88	13,06 a 49,48	6,82					
	CH ₄ CMS	VC	38	1,23	0,82 a 1,45	0,14	0,85	8	0,07	0,14	1,15
		Pred		1,23	0,87 a 1,50	0,12					
	CH ₄ g/PV	VC	32	0,51	0,21 a 0,77	0,13	0,91	8	0,05	0,11	1,19
		Pred		0,51	0,26 a 0,79	0,12					
	CH ₄ (g/kg CMS)	VC	35	16,39	6,67 a 24,8	4,43	0,90	8	1,90	3,59	1,28
		Pred		16,39	7,39 a 24,17	4,00					
Fezes Úmidas	gCH ₄ /h	VC	52	0,84	0,35 a 1,51	0,27	0,86	8	0,14	0,19	1,42
		Pred		0,84	0,28 a 1,42	0,23					
	CH ₄ g/dia	VC	39	20,19	8,5 a 36,21	6,94	0,95	8	2,12	3,29	2,03
		Pred		20,19	8,49 a 35,86	6,60					
	CH ₄ L/dia	VC	39	28,08	11,86 a 50,57	9,76	0,95	8	3,13	5,02	1,84
		Pred		28,08	11,40 a 50,93	9,25					
	CH ₄ CMS	VC	43	1,19	0,70 a 1,49	0,19	0,84	8	0,11	0,16	1,16
		Pred		1,19	0,77 a 1,46	0,16					
	CH ₄ g/PV	VC	41	0,51	0,21 a 0,77	0,13	0,92	8	0,05	0,09	1,51
		Pred		0,51	0,27 a 0,79	0,12					
	CH ₄ (g/kg CMS)	VC	37	17,26	6,67 a 27,58	4,43	0,91	8	1,83	3,00	1,43
		Pred		17,26	7,97 a 27,38	4,04					
CMS (kg/dia)	VC	45	2,01	1,08 a 2,73	0,45	0,88	8	0,21	0,33	1,38	
	Pred		2,01	0,90 a 2,60	0,39						
DMS (g/kg)	VC	40	62,75	53,48 a 74,24	4,78	0,83	8	2,66	4,33	1,06	
	Pred		62,75	54,96 a 75,43	3,98						
Fezes Secas e Moídas	gCH ₄ /h	VC	41	0,88	0,35 a 1,51	0,32	0,94	12	0,11	0,22	1,67
		Pred		0,88	0,27 a 1,64	0,30					
	CH ₄ g/dia	VC	40	21,06	8,5 a 36,21	7,67	0,91	10	3,18	4,75	1,57
		Pred		21,06	6,31 a 38,95	6,98					
	CH ₄ L/dia	VC	41	29,40	11,86 a 50,57	10,67	0,91	10	4,43	6,61	1,59
		Pred		29,40	8,67 a 54,51	9,71					
	CH ₄ CMS	VC	44	1,21	0,53 a 1,59	0,21	0,87	10	0,11	0,15	1,36
		Pred		1,21	0,71 a 1,64	0,19					
	CH ₄ g/PV	VC	41	0,52	0,21 a 0,78	0,15	0,91	10	0,06	0,09	1,54
		Pred		0,52	0,21 a 0,82	0,14					

CH ₄ (g/kg CMS)	VC	40	17,37	6,67 a 27,58	5,00	0,92	10	1,90	2,68	1,70
	Pred		17,37	4,82 a 25,43	4,63					
CMS (kg/dia)	VC	47	1,99	1,08 a 2,73	0,46	0,83	10	0,26	0,36	1,26
	Pred		1,99	1,03 a 2,78	0,38					
DMS (g/kg)	VC	46	63,19	48,4 a 79,19	5,17	0,88	10	2,41	3,52	1,31
	Pred		63,19	52,52 a 76,37	4,58					

DP= desvio padrão; R²= coeficiente de determinação; PC= componentes principais – *principal component*; SEC= erro-padrão da calibração - *standard error of calibration*; SECV= erro-padrão da calibração cruzada - *standard error of cross validation*; RPD= relação de desempenho do desvio - *ratio of performance to deviation*; VC= validação cruzada; g CH₄/h= emissão de metano em gramas por hora; CH₄ g/dia= emissão de metano em gramas por dia; CH₄ L/dia= emissão de metano em litros por dia; CH₄ CMS= emissão de metano por matéria seca consumida; CH₄ g/PV= emissão de metano em gramas por peso vivo; CH₄ (g/kg CMS)= emissão de metano em gramas por quilo de matéria seca consumida; CMS (kg/dia)= consumo de matéria seca em quilos por dia; DMS (g/kg)= digestibilidade da matéria seca em gramas por quilo.

Fonte: A autora

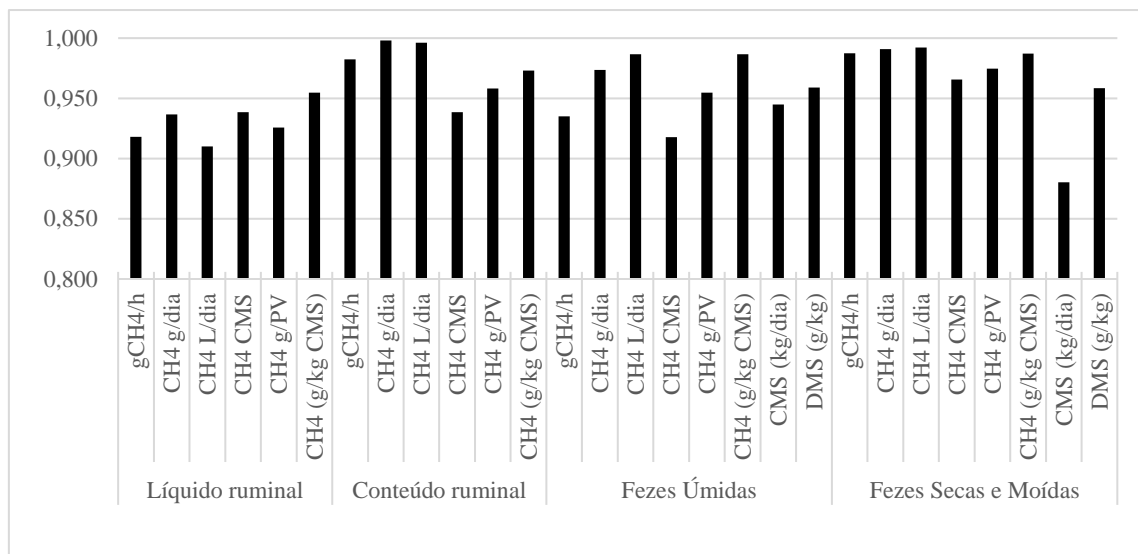
Em todos os grupos de amostras observou-se variabilidade que permitiu o desenvolvimento de curvas de calibração e posterior estimativa de produção de metano (Tabela 2).

Na estimativa de produção de CH₄ que mede a produção por hora (g CH₄/h), houve altos valores de R²_{cv} e baixos SECV com os modelos de calibração desenvolvidos a partir de todas as amostras, em que se destaca o modelo de fezes secas e moídas, que obteve o mais alto valor de RPD (1,64), semelhantemente ao observado com relação à produção de metano por dia em gramas, em que as fezes úmidas apresentaram o maior valor de RPD (2,03).

Com relação às variáveis de produção de CH₄ (g/PV) e (g/Kg) do consumo de matéria seca, os modelos desenvolvidos por amostras de líquido e conteúdo ruminal não apresentaram RPD que denotasse acurácia e precisão.

Os modelos de predição de produção de CH₄ (g/kg CMS) e CMS (kg/dia) desenvolvidos com amostras de fezes úmidas obtiveram R² e RPD que indicaram tendência de acurácia, possivelmente tendo a necessidade de inclusão de amostras na equação para aumentar a confiabilidade dos mesmos. O mesmo foi observado nos modelos desenvolvidos com amostras de fezes secas e moídas, com adição das variáveis de produção de CH₄ (g/PV) e digestibilidade de matéria seca.

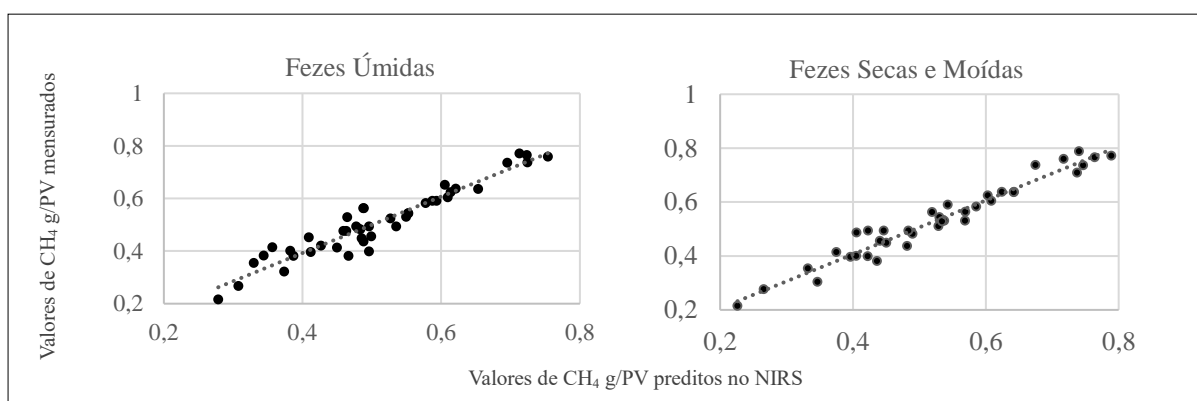
Figura 1 - Correlações observadas entre os valores de metano, consumo e digestibilidade obtidos pelos métodos convencionais e os preditos no NIRS



Fonte: A autora

É possível observar as correlações entre os valores obtidos pelas metodologias convencionais de mensuração de metano, consumo e digestibilidade e os resultados preditos no NIRS para as mesmas variáveis (Figura 1). Nota-se valores positivos e elevados de coeficientes de correlação em todas as variáveis, destacando-se as variáveis de produção de metano g/PV e em g/kg CMS que obtiveram altos valores em todos os bancos de dados. Observou-se, também, altos coeficientes em CMS e DMS nas amostras em que foram avaliados (fezes úmidas e fezes secas e moídas).

Figura 2 - Representação gráfica da correlação entre os valores de CH₄ g/PV mensurados pela metodologia convencional e preditos no NIRS a partir de fezes úmidas e fezes secas e moídas.



Fonte: A autora

Na figura 2 observa-se a relação entre os valores de metano g/PV obtidos pela

metodologia convencional (SF_6) e os valores preditos por espectroscopia do infravermelho próximo. Em fezes úmidas, foi obtido coeficiente de correlação de 0,955 e em fezes secas e moídas, de 0,975.

4.4 Discussão

A variabilidade observada em todas as variáveis estudadas indica a possibilidade do desenvolvimento de modelos de calibração NIRS, sendo confirmados pelos elevados valores de coeficiente de determinação, que demonstra também a qualidade da análise convencional realizada, mesmo apesar do baixo número de amostras utilizados, o que é consequência do número de animais, visto que existem diversos desafios (financiamento, local, medicamentos, tempo disponível, alimentos, dentre outros) para a realização de experimentos *in vivo*, o que indica mais um benefício da utilização da espectroscopia NIR na produção animal nesse contexto.

Com relação aos parâmetros de mensuração de metano, a partir dos resultados de RPD pode-se observar maior tendência de robustez nos modelos desenvolvidos a partir de espectros de amostra de fezes, que são os mais utilizados para análises NIRS. Além da frequente utilização do NIRS Fecal, esse tipo de amostra possui a vantagem da facilidade na coleta, não havendo necessidade do uso de procedimentos com uso de sonda esofágica ou fistula, por exemplo. O presente trabalho possui pioneirismo na utilização de conteúdo ruminal, líquido ruminal e fezes para este tipo de predição.

Hammond et al. (2009), utilizando a técnica SF_6 para mensuração de CH_4 (g/kg CMS) de ovinos na Nova Zelândia, obtiveram valores superiores aos do presente estudo ($23,4 \pm 5,7$) onde, com amostras de fezes úmidas ou secas e moídas, observou-se valor de RPD mínimo de 1,9, o que sugere que a partir desses dois processamentos de fezes pode-se prever de forma robusta e acurada a produção de CH_4 em grama por kg de alimento consumido.

Na análise de produção de CH_4 por dia em litros, apesar dos modelos de calibração cruzada exibirem elevados valores de coeficiente de determinação a partir de todas as amostras, não foi observado valor de RPD superior a 2, que indicaria modelo confiável, como também observado na variável de produção de metano por consumo de matéria seca.

Para predição de consumo de matéria seca, os modelo desenvolvido para amostras de fezes úmida apresentou valores superiores aos obtidos por Valiente et al. (2004) que, utilizando 15 amostras de fezes moídas para predição de consumo obtiveram valores de

0,83, 1,96 e 3,58 para R^2 , SEC e SECV, respectivamente, e que foram semelhantes aos observados a partir de amostras secas e moídas podendo, portanto, serem considerados modelos robustos de predição.

Os mesmos autores supracitados, utilizando NIRS fecal para predição da digestibilidade da matéria seca, obtiveram valores de R^2 e SECV de 0,74 e 2,68, ainda inferiores aos observados no presente estudo com ambas amostras de fezes. De acordo com Bomfim (2013), calibrações desenvolvidas para predição da digestibilidade com fezes secas e moídas que possuam coeficientes de determinação variando de 0,79 a 0,98, com erro padrão da validação entre 0,02 a 4,07, são consideradas como de boas performances, como é o caso do presente estudo, tanto no modelo desenvolvido com amostra de fezes seca e moída quanto do modelo obtido com fezes úmidas.

Os maiores valores de coeficiente de determinação e RPD apresentados nos modelos desenvolvidos a partir de fezes secas e moídas possivelmente são devidos à maior padronização da amostra que acontece quando passa por procedimento de secagem e moagem, diminuindo a influência da água na formação do espectro. Porém, mesmo com os valores mais elevados sendo observados nos modelos de fezes secas e moídas, nota-se que os resultados de R^2 e RPD dos modelos gerados com fezes úmidas também denotam modelos robustos de calibração podendo, portanto, ser utilizados em predições com o benefício de não ter a necessidade dos processos de secagem e moagem, fornecendo assim resultados ainda mais rápidos de análises.

É evidente, a partir da correlação linear positiva observada em todas as amostras e variáveis (Figura 1) que a metodologia NIRS é apta para predições de emissões *in vivo* de CH_4 , bem como CMS e DMS. No entanto, a precisão e a robustez das equações de predição e as diferenças observadas entre os elevados valores de coeficiente de determinação e os equivalentes RPD's podem ser ainda melhoradas pela adição de amostra com valores conhecidos no modelo a fim de aumentar a variabilidade da população.

Além disso, observou-se que melhores modelos de predição foram obtidos em amostras de fezes, sendo provável consequência da amostragem que foi realizada para a coleta de espectro, em que, das amostras de fezes, foram realizadas amostras compostas de todo o produzido no período de um dia, diferente das amostras de líquido e conteúdo ruminal que, por serem retiradas em pequenas quantidades e apenas uma vez ao dia, possivelmente não representaram da forma mais adequada os parâmetros analisados no presente estudo.

Sendo assim, de forma geral observou-se a possibilidade de utilização de todos os tipos de amostras para predição da estimação de produção de metano, notando-se maior dificuldade na necessidade de banco de dados com significativo e representativo número de amostras e que contenha variação, afim de que o modelo de calibração seja robusto e passível de ser utilizado com acurácia nas mais diversas situações.

Mesmo com o atual número de dados, observou-se potencial de utilização de modelos desenvolvidos em todos os processamentos de amostras de fezes na estimativa de CH₄ entérico, consumo e digestibilidade, o que é um resultado promissor, visto que a utilização da técnica NIRS fecal como ferramenta de monitoramento nutricional tem o potencial de incrementar de forma racional e econômica, a produção de ruminantes no Brasil, tornando a atividade pecuarista mais competitiva no âmbito do agronegócio (GONÇALVES et al., 2018).

4.5 Conclusão

É possível estimar a produção *in vivo* de CH₄ a partir de espectros de líquido ruminal, conteúdo ruminal, fezes úmidas e fezes secas e moídas, observado pelos valores de coeficiente de determinação da calibração, em que se destacam os modelos desenvolvidos a partir de amostras de fezes úmidas e fezes secas e moídas, que também possibilitaram bons modelos de predição de digestibilidade e consumo da matéria seca.

Para todos os modelos de calibração, a inserção de amostras com valores conhecidos provenientes da metodologia convencional nas curvas de calibração desenvolvidas poderá aumentar a confiabilidade das mesmas a partir de valores mais elevados de RPD.

Sugere-se a necessidade do desenvolvimento de mais estudos utilizando dados obtidos em experimentos *in vivo* com animais de diferentes espécies, idades e alimentação, a fim de que a aplicação desta metodologia possa ser comparada e melhor avaliada.

4.6 Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro para realização do estudo dado pela CAPES Pró-Amazônia e à Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA) e EMBRAPA Amazônia Oriental pela realização do experimento e análises laboratoriais.

Referências

- ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; CALLEJA, A.; GIRÁLDEZ, F. J. Nutritive evaluation of forages by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 13, n. 6, p. 301–311, 2005.
- ANDUEZA, D.; PICARD, F.; DOZIAS, D.; AUFRÈRE, J. Fecal Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Prediction of the Feed Value of Temperate Forages for Ruminants and Some Parameters of the Chemical Composition of Feces: Efficiency of Four Calibration Strategies. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 9, p. 2164–2176, 2017.
- AOAC (2005) Association of Official Analytical Chemists International. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- BASTOS, T. X.; PACHECO, N. A.; NECHET, D.; SÁ, T. D. A. **Aspectos climáticos de Belém nos últimos cem anos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, Embrapa Amazônia Oriental Documentos, 2002, 31p.
- BERCHIELLI, T. T. **Nutrição de Ruminantes**. (T. T. Berchielli, A. V. Pires, & S. G. de Oliveira, Eds.). Jaboticabal - SP: FUNEP - Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 598 p, 2006.
- BEZADA, S. Q.; ARBAIZA, T. F.; CARCELÉN, F. C.; SAN MARTÍN, F. H.; LÓPEZ, C. L.; ROJAS, J. E.; VÉLEZ, V. M. Predicción de la Composición Química y Fibra Detergente Neutro de Rye Grass Italiano (*Lolium multiflorum* Lam) mediante Espectroscopía de Reflectancia en Infrarrojo Cercano (NIRS). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 28, n. 3, p. 538–548, 2017.
- BOMFIM, M. A. D. NIRS as a tool to determine the nutritional value of native pasture for small ruminants. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, v. 50, p. 1–11, 2013.
- DE SOUSA, L. C.; GOMIDE, J. L.; MILAGRES, F. R.; DE ALMEIDA, D. P. Desenvolvimento de modelos de calibração NIRS para minimização das análises de madeiras de eucalyptus spp. **Ciencia Florestal**, v. 21, n. 3, p. 589–597, 2011.
- DECRUYENAERE, V.; FROIDMONT, E.; BARTIAUX-THILL, N.; BULDGEN, A.; STILMANT, D. Faecal near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) compared with other techniques for estimating the in vivo digestibility and dry matter intake of lactating grazing dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 3–4, p. 220–234, 2012.
- DEHARENG, F.; DELFOSSE, C.; FROIDMONT, E.; SOYEURT, H.; MARTIN, C.; GENGLER, N.; VANLIERDE, A.; DARDENNE, P. Potential use of milk mid-infrared spectra to predict individual methane emission of dairy cows. **Animal**, v. 6, n. 10, p. 1694–1701, 2012.

DIXON, R.; COATES, D. Review: Near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 17, n. 1, p. 1–31, 2009.

FANCHONE, A.; ARCHIMÈDE, H.; BOVAL, M. Comparison of fecal crude protein and fecal near-infrared reflectance spectroscopy to predict digestibility of fresh grass consumed by sheep. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 236–243, 2009.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analyses** (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). In Agriculture Handbook No. 379. p. 1–24, 1970.

GONÇALVES, J. L.G.; FERNANDES, A. M. F. F.; SOUSA, R. T. S.; SANTOS, S. F. Utilização do NIRS na determinação dos parâmetros de digestibilidade e consumo em ruminantes. **Nutritime**, v. 15, n. 4, p. 8200–8253, 2018.

HAMMOND, K. J.; MUETZEL, S.; WAGHORN, G. C.; PINARES-PATINO, C. S.; BURKE, J. L.; HOSKIN, S. O. The variation in methane emissions from sheep and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 69, p. 174–178, 2009.

JOHNSON, D. E.; JOHNSON, K.; HUYLER, M.; WESTBERG, H.; LAMB, B.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science And Technology**, v.28, p.359-362, 1994.

LI, H.; TOLLESON, D.; STUTH, J.; BAI, K.; MO, F.; KRONBERG, S. Faecal near infrared reflectance spectroscopy to predict diet quality for sheep. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 263–268, 2007.

MEISTER, N. C.; LEMOS, N. L. S.; ALARI, F. O.; SILVA, V. C.; KOURY FILHO, W.; MALHEIROS, E. B.; RUGGIERI, A. C. Determination of methane production on grass fed goats. **Advances in Animal Biosciences**, v. 4, n. 2, p. 541, 2013.

MOSS, A. R.; GIVENS, D. I. Effect of supplement type and grass silage:concentrate ratio on methane production by sheep. **Proceedings of the British Society of Animal Production**, v. 52, 1993.

NEVES, M. C. **Produção *in vitro* de metano e análise da diversidade genética das Archaea metanogênicas do rúmen de bovinos**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 115 f. Jaboticabal, 2008.

NORRIS, K.; BARNES, R. F.; MOORE, J.; SHENK, J. S. Predicting Forage Quality by Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 889–897, 1976.

PEARCE, R. A.; LYONS, R. K.; STUTH, J. W. Influence of handling evaluations methods on fecal NIRS. **Journal Of Range Management**, v. 46, p. 274–276, 1993.

SAS® University Edition, SAS 9.1.3 Cary, NC: SAS Institute Inc., 2013.

SHENK, J.; WESTERHAUS, M.; HOOVER, M. Analysis of Forages by Infrared Reflectance. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 5, p. 807-812, 1979.

SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livrocere. 380p, 1979.

SOLIVA, C. R.; HESS, H. D. **Measuring methane emission of ruminants by in vitro and in vivo techniques**. In *Measuring Methane Production from Ruminants*, p. 15–31, 2007.

STUTH, J.; JAMA, A.; TOLLESON, D. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. **Field Crops Research**, v. 84, p. 45–56, 2003.

TURZA, S.; JIE, Y. C.; TERAZAWA, Y.; TAKUSARI, N.; AMARI, M.; KAWANO, S. On-line monitoring of rumen fluid in milking cows by fibre optics in transmittance mode using the longer NIR region. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 10, n. 2, p. 111–120, 2002.

VALIENTE, O. L.; ANDUEZA, D.; DE VEGA, A.; OLMOS, G.; MUÑOZ, F. The use of NIRS for prediction of intake, digestibility and diet composition in sheep fed mixed grain:roughage diets. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 13, p. 227–230, 2004.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583–3597, 1991.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the Official Agricultural Chemist**, v.50, p.50-55, 1967.

WESTBERG, H. H.; JOHNSON, K. A.; COSSALMAN, M. W.; MICHAL, J. J. **A SF₆ tracer technique: methane measurement from ruminants**. Pullman: Washington State University. 40p, 1998.

WILLIAMS, P. C.; D. C. SOBERING. How we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**. A. M. C. Davies and P. C. Williams, ed. (pp. 185–188). NIR Publications, Chichester, UK, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

Com o presente estudo, concluiu-se que a metodologia NIRS tem sido amplamente utilizada de forma que pode ser aplicada tanto em análises de forragem relacionadas à pesquisa científica quanto no ambiente da fazenda, apresentando parâmetros de calibração e validação satisfatórios no que diz respeito à maior parte das variáveis relacionadas à composição química e digestibilidade de forragens, bem como concluindo não haver necessidade do desenvolvimento de diferentes curvas de calibração por cultivar e ano, pois a partir de uma curva “global” é possível serem desenvolvidos modelos robustos de avaliação, porém quando trata-se de equações de predição de produtos gerados durante a DIVMS, como o gás metano, é recomendado a adição de amostras possuindo resultados de análises laboratoriais convencionais, visando aumento de acurácia aos modelos.

Em relação a amostras de líquido ruminal, conteúdo ruminal e fezes (úmidas e secas e moídas), foram desenvolvidas eficientes equações de calibração em todas as amostras, destacando-se calibrações desenvolvidas com fezes úmidas e fezes secas e moídas por apresentarem parâmetros denotando predições mais acuradas e robustas para estimação da produção de metano entérico.

Sugere-se o desenvolvimento de mais estudos utilizando dados obtidos em experimentos *in vivo* com animais de diferentes espécies, idades e alimentação, afim de que a aplicação desta metodologia possa ser comparada e melhor avaliada.