

Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro

Aplicação das técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) nos intervalos médio (MIR) e próximo (NIR), para avaliação do conteúdo em n-alcenos e álcoois de cadeia longa de amostras vegetais e fecais

Dissertação de Mestrado de Engenharia Zootécnica

Sara Lia Pereira Almeida Santos

Orientadores: Professor Doutor Luís Miguel Mendes Ferreira e Doutor Nelson Filipe Lopes Machado



Vila Real, 2019

Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro

Aplicação das técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) nos intervalos médio (MIR) e próximo (NIR), para avaliação do conteúdo em n-alcenos e álcoois de cadeia longa de amostras vegetais e fecais

Dissertação de Mestrado de Engenharia Zootécnica

Sara Lia Pereira Almeida Santos

Orientadores: Professor Doutor Luís Miguel Mendes Ferreira e Doutor Nelson Machado

Composição do Júri

Presidente: Professora Doutora Maria José Marques Gomes

Vogais: Professora Doutora Ana Luísa Guimarães Dias Lourenço

Professor Doutor Miguel António Machado Rodrigues

Professor Doutor Luís Miguel Mendes Ferreira

Vila Real, 2019

“As doutrinas expostas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.”

Esta dissertação foi elaborada com vista à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Zootécnica apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Agradecimentos

Neste pequeno texto pretendo agradecer a todas as pessoas com quem me cruzei e que sem algumas das quais este trabalho não teria sido possível de realizar.

Em primeiro quero agradecer aos meus Pais por permitirem que fosse possível chegar até aqui, por toda a paciência, por toda a confiança depositada e por todo o apoio. Um Obrigada também à Família e amigos mais próximos pelo apoio e suporte emocional.

Agradeço aos meus orientadores, Professor Doutor Luís Ferreira pela sugestão do tema, por ter aceite aturar-me, pelas suas correções e sugestões sempre pertinentes, também pela paciência e disponibilidade. Ao Doutor Nelson Machado agradeço também toda a disponibilidade e paciência que teve e também toda a sua boa disposição característica que ajudou a passar alguns momentos no laboratório.

Agradeço ao CITAB, e aos responsáveis pelo mesmo, pela cedência do espaço e do equipamento para que pudesse analisar as minhas amostras e realizar esta dissertação. Agradecer também ao pessoal com quem me cruzei no laboratório durante a minha estadia, à Ana, à Irene, ao André, ao David e ao Marcelo por me terem acolhido tão bem, pela boa disposição e por fazerem com que o tempo passasse mais rápido. Ao Marcelo agradeço ainda a proteção contra os ares condicionados, o facto de ter sido o melhor parceiro de bancada e o melhor a contar piadas.

Não podia deixar de agradecer à minha Família da Bila. Um enorme Obrigada por todos os momentos passados e partilhados ao longo destes 5 anos, os melhores das nossas vidas, foi ótimo partilhar esta aventura com vocês. E já deixa saudades. Um Obrigada especial à Aninhas por partilhar comigo todos os momentos ao longo destes meses de elaboração desta dissertação, pela companhia nos cafés à hora de almoço, pelo chocalatinho acompanhar, pelo apoio e essencialmente pela paciência que eu sei que foi precisa muita. Mereces um lugarzinho no céu.

Às minhas colegas de casa, Bárbara, Daniela e Vinagre que me aturaram nos dias piores mas também me ajudaram a desanuviar a cabeça quando precisei, obrigada.

Por fim, agradeço ao Tomás por ter sido o meu braço direito ao longo destes 5 anos e o apoio que me ajudou a progredir.

Resumo

O conhecimento dos fatores que influenciam a relação dinâmica entre o animal e a pastagem, em especial o comportamento alimentar dos animais revela-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias adequadas de gestão dos herbívoros em pastoreio. Os n-alcenos e os álcoois de cadeia longa (LCOH) têm sido utilizados como marcadores fecais para estimar diversos parâmetros nutricionais. No entanto, as suas análises químicas são morosas e dispendiosas, existindo, desta forma, a necessidade de se desenvolverem metodologias mais expeditas para avaliar as concentrações destes marcadores. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da tecnologia de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), no intervalo do infravermelho próximo (NIR) e no intervalo do infravermelho médio (MIR), para a determinação da concentração em n-alcenos e LCOH em amostras de distintas espécies vegetais e amostras fecais de herbívoros domésticos. Nesse sentido, foram registados, através destas técnicas, espectros de 33 amostras de alimentos (*Trifolium repens*, *Erica* spp., *Lolium perenne*, *Ulex gallii*, herbáceas, herbáceas do monte e gramíneas) e 181 amostras de fezes (bovinos e equinos). De modo a desenvolver calibrações para a previsão de concentrações n-alcenos e LCOH recorreu-se à análise estatística multivariada. Relativamente aos modelos desenvolvidos para as amostras vegetais, os melhores resultados foram observados para as calibrações com recurso ao NIR. Os melhores coeficientes de determinação de validação externa (R^2v) obtidos foram de 0,90 e 0,79 para LCOH e n-alcenos, respetivamente. Para as amostras fecais, no intervalo NIR, os resultados indicam previsões na validação externa (R^2v) similares para as duas espécies (0,64). Pelo contrário, no intervalo MIR foram observadas diferenças de R^2v entre amostras fecais de bovinos (0,70) e equinos (0,57). Em relação aos modelos criados para as fezes de ambas as espécies animais, observámos uma tendência para os LCOH e os n-alcenos presentes em maiores concentrações, serem os marcadores com melhores estimativas. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a seleção da técnica a utilizar poderá depender do tipo de matriz, sendo a homogeneidade das matrizes um dos fatores mais importantes para o seu sucesso. No sentido de melhorar a precisão e robustez dos modelos criados para as estimativas das concentrações destes marcadores utilizando estas metodologias, a base de dados (maior variabilidade) utilizada para as calibrações destes modelos terá que ser obrigatoriamente aumentada.

Palavras-chave: Herbívoros domésticos, álcoois de cadeia longa, n-alcenos, espectroscopia de infravermelho, calibrações.

Abstract

Understanding the factors that influence the dynamic relationship between animal and pasture, especially the grazing behaviour of the animals, is fundamental for the development of adequate management strategies of grazing herbivores. N-alkanes and long chain alcohols (LCOH) have been used as faecal markers to estimate various nutritional parameters. However, their chemical analyses are time-consuming and expensive, making it necessary to develop more expeditious methodologies to evaluate the concentrations of these markers. The objective of this work was to evaluate the use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) technology in the near infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) intervals, for the determination of the concentration of n-alkanes and LCOH, in samples of different plant species and faecal samples of domestic herbivores. In this sense, spectra of 33 food samples (*Trifolium repens*, *Erica spp.*, *Lolium perenne*, *Ulex gallii*, herbaceous, grass herbaceous and grass) and 181 faecal samples (bovine and equine) were recorded using these techniques. In order to develop calibrations for the prediction of n-alkane concentrations and LCOH, a multivariate statistical analysis was used. Regarding the models developed for the plant samples, the best results were observed for the calibrations using the NIR. The best external validation determination coefficients (R^2_v) obtained were 0,90 and 0,79 for LCOH and n-alkanes, respectively. For faecal samples, in the NIR range, the results indicate similar external validation predictions (R^2_v) for both species (0,64). However, in the MIR interval, differences of R^2_v were observed between faecal samples of cattle (0,70) and equines (0,57). Relative to the models developed for faeces of both animal species, it was observed that LCOH and n-alkanes presented in higher concentrations, were the markers with the best estimates. The results obtained in this study suggest that the selection of the used technique may depend on the type of matrix, and the homogeneity of the matrices is one of the most important factors for its success. In order to improve the accuracy and robustness of the created models, the database (greater variability) used for the calibrations of these models will have to be increased for the assessment of the concentrations of these markers using these methodologies.

Keywords: Domestic herbivores, long chain alcohols, n-alkanes, infrared spectroscopy, calibrations.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Quadros.....	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. Técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	5
2.1.1. Evolução Histórica.....	5
2.1.2. Princípios Teóricos.....	7
2.1.3. Intervalos Espectrais.....	9
2.1.4. Fatores que afetam os espectros.....	12
2.2. Métodos de Análise de Amostras.....	13
2.2.1. ATR.....	14
2.2.2. DRIFT.....	15
2.3. Análise Multivariada.....	16
2.3.1. Regressão PLS.....	19
2.4. Aplicação de técnicas FTIR na nutrição animal.....	20
3. Materiais e métodos.....	23
3.1. Aquisição de espectros.....	24
3.2. Processamento dos espectros.....	26

3.3. Desenvolvimento de modelos de calibração.....	27
3.4. Validação de modelos analíticos.....	28
4. Resultados e Discussão.....	29
4.1. Valores analíticos.....	29
4.2. Atribuições Espectrais.....	31
4.3. Equações de calibração.....	33
4.3.1. Previsão de parâmetros para amostras vegetais.....	33
4.3.2. Previsão de parâmetros para amostras fecais.....	36
5. Conclusões.....	41
6. Bibliografia.....	43

Índice de Figuras

Figura 1- Representação do Espectro Eletromagnético (adaptado de Mills, 2016).....	9
Figura 2- Esquema de um sistema ATR (PerkinElmer, 2005).....	15
Figura 3- Processo geral de construção de modelos de regressão (Monteiro, 2011).....	18
Figura 4- Exemplo de amostra de brejo utilizada para análise.....	24
Figura 5- Exemplo de amostra de fezes de cavalos utilizada na análise.....	24
Figura 6- Espectrómetro FTIR Thermo Scientific Nicolet iS50 equipado com acessório ATR e DRIFT (Thermo Scientific, 2012).....	25
Figura 7- Espectros representativos de alimentos registados nos intervalos MIR (A) e NIR (B).....	31
Figura 8- Espectros representativos de fezes de bovinos e equinos registados nos intervalos MIR (A) e NIR (B).....	32

Índice Quadros

Quadro 1 - Concentrações (mg/kg MS) em LCOH e n-alcenos nos alimentos utilizados neste estudo provenientes de uma pastagem de montanha.....	30
Quadro 2 - Concentrações (mg/kg MS) em LCOH e n-alcenos nas fezes de bovinos em pastoreio em áreas de montanha.....	30
Quadro 3 - Concentrações (mg/kg MS) de LCOH e n-alcenos nas fezes de equinos em pastoreio em áreas de montanha.....	31
Quadro 4 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras vegetais obtidos pelo NIR.....	35
Quadro 5 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras vegetais obtidos pelo MIR.....	36
Quadro 6 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de bovinos obtidos pelo NIR...	37
Quadro 7 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de equinos obtidos pelo NIR...	38
Quadro 8 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de bovinos obtidos pelo MIR..	39
Quadro 9 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de equinos obtidos pelo MIR..	40

Lista de Abreviaturas

O20	eicosa-	C25	pentacos-
O22	docos-	C26	hexacos-
O24	tretacos-	C27	heptacos-
O26	hexacos-	C28	octacos-
O28	octacos-	C29	nonacos-
O30	triacont-	C30	triacont-
	-ol (LCOH)	C31	hentriacont-
		C32	dotriacont-
		C33	tritriacont-
			-ano (alcano)
ADF	Fibra do Detergente Ácido		
ADL	Lenhina do Detergente Ácido		
ATR	Refletância Total Atenuada		
DMO	Digestibilidade da Matéria Orgânica		
DP	Desvio-Padrão		
DRIFT	Refletância Difusa por Transformada de Fourier		
EB	Energia Bruta		
ED	Energia Digestível		
EM	Energia Metabolizável		
FB	Fibra Bruta		
FIR	Infravermelho Longínquo		
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier		
GB	Gordura Bruta		
IV	Radiação Infravermelha		
LCOH	Álcoois de cadeia longa		
MIR	Infravermelho Médio		
MPLS	Regressão Mínimos Quadrados Parciais Modificados		
MSR	Regressão Linear Múltipla		
NDF	Fibra do Detergente Neutro		
NIR	Infravermelho Próximo		

PB	Proteína Bruta
PCA	Análise dos Componentes Principais
PLS	Regressão Mínimos Quadrados Parciais
PV	Peso Vivo
R²	Coefficiente de Determinação
R²c	Coefficiente de Determinação de Calibração
R²cv	Coefficiente de Determinação de Validação Cruzada
R²v	Coefficiente de Determinação de Validação Externa
RMSEC	Erro Médio Quadrático de Calibração
RMSEP	Erro Médio Quadrático de Previsão
RMSEV	Erro Médio Quadrático de Validação
RPD	Valor do Desvio-Padrão
SNV	Varição Normal Padrão

1. Introdução

O conhecimento dos fatores que influenciam a relação dinâmica existente entre o animal e a pastagem revela-se fundamental para o desenvolvimento de uma estratégia adequada de gestão dos herbívoros em regime de pastoreio (Stuth *et al.*, 1995; Rook & Tallowin, 2003). Estas relações são específicas para cada comunidade vegetal e espécie animal sendo que são pouco conhecidas para as comunidades vegetais de montanha (Rook *et al.*, 2004). O comportamento animal (ocupação espacial da pastagem, a seleção de dieta e a ingestão de alimento) constitui-se como o principal mecanismo de influência do animal na pastagem (Hodgson *et al.*, 1991; Celaya *et al.*, 2007), sendo influenciado por variáveis bióticas (espécie animal, raça, estado fisiológico, idade, experiência de pastoreio, mas também a disponibilidade, valor nutritivo, estrutura e heterogeneidade dos recursos alimentares), abióticas (relevo, condições climáticas) e manejo (carga animal, tipo de pastoreio). O conhecimento do comportamento alimentar das diferentes espécies de herbívoros domésticos, em especial a seleção de dieta, sob as diferentes comunidades vegetais é essencial para o desenvolvimento de sistemas de pastoreio apropriados a cada situação específica no sentido de se obter uma utilização mais eficiente e sustentável da vegetação existente e atingir os objetivos de produção animal definidos (Hutchings & Gordon, 2001; Rook & Tallowin, 2003).

Tradicionalmente, a avaliação da composição da dieta selecionada por herbívoros domésticos baseia-se em medições diretas na biomassa vegetal ou nos próprios animais, designadamente a observação direta do animal em pastoreio e a análise micro-histológica de fragmentos vegetais em diferentes amostras (extrusa esofágica, o digesta e as fezes). A observação direta dos animais é frequentemente utilizada, sendo a sua simplicidade apontada como a principal vantagem desta metodologia. Os procedimentos micro-histológicos baseiam-se na identificação visual dos fragmentos cuticulares epidérmicos em amostras de extrusa esofágica e amostras de outros compartimentos gastrointestinais ou mesmo de fezes. A composição da dieta é expressa em termos da proporção de fragmentos identificáveis provenientes de cada espécie vegetal. Esta é uma metodologia muito laboriosa, exigindo formação dos investigadores. Além disso, a possível digestão diferencial das espécies de plantas e a grande proporção de fragmentos não identificáveis reduzem a precisão das estimativas da composição da dieta (Holechek *et al.*, 1982; Mayes & Dove, 2000; Dove & Mayes, 2005).

Em alternativa às metodologias anteriormente apresentadas, alguns componentes das ceras epicuticulares das plantas, em especial os n-alcenos (Roumet *et al.*, 2006), os álcoois de cadeia longa (Dove & Charmley, 2008) e os ácidos gordos de cadeia longa (Ferreira *et al.*, 2010) têm sido utilizados como marcadores fecais para avaliar distintos parâmetros nutricionais (p.e. a digestibilidade, a ingestão voluntária e a composição das dietas) (Dove & Mayes, 2006). As partes aéreas da maior parte das plantas são cobertas por estas ceras epicuticulares, sendo constituídas por uma mistura complexa de componentes hidrofóbicos como ácidos gordos de cadeia longa, aldeídos, álcoois, esteróis, cetonas, flavonóides, triterpenos e alcenos (Post-Beittenmiller, 1996) cuja composição varia com a parte morfológica das espécies vegetais, apresentando as folhas e inflorescências uma tendência para apresentarem concentrações mais elevadas nestes compostos. Uma das grandes vantagens da utilização destes marcadores reside no facto de para a sua quantificação ser usado o mesmo procedimento analítico utilizado em amostras de dieta e fezes, reduzindo assim o trabalho e erro analítico (Dove & Mayes, 2005; Ru *et al.*, 2002). Uma característica que é comum a estes constituintes das ceras epicuticulares é que as suas concentrações variam entre espécies vegetais, plantas e partes morfológicas da mesma planta (Dove & Mayes, 1996) tornando-os marcadores apropriados para avaliar a composição da dieta selecionada pelos herbívoros. O princípio da sua utilização consiste na comparação das concentrações destes marcadores observadas numa mistura – extrusa esofágica, o digesta e as fezes – com as suas concentrações observadas nos possíveis componentes da dieta, espécies vegetais ou partes da planta que contribuem para essa mistura (Ferreira *et al.*, 2017).

Uma das principais desvantagens apontadas a esta metodologia, tal como para outras análises químicas, reside no facto de se revelarem dispendiosas e morosas (Ru *et al.*, 2002; Moorby *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2015). Estes métodos tradicionais de determinação de n-alcenos e álcoois, são impraticáveis nas explorações onde os resultados são precisos rapidamente, por exemplo, para tomar decisões sobre o manejo alimentar aplicado aos animais (Dixon & Coates, 2009) havendo a necessidade de se desenvolverem metodologias mais expeditas para a avaliação das concentrações destes marcadores nas espécies vegetais e nas fezes.

A tecnologia de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), principalmente no intervalo de infravermelho próximo (NIR), revela-se assim uma oportunidade para a determinação da composição química e nutricional de dietas (Dixon & Coates, 2009; Gaffney *et al.*, 2012). As análises NIR são mais simples, não-destrutivas das

amostras, mais precisas (Ru *et al.*, 2002), mais rápidas, mais baratas que o método convencional e também não utilizam reagentes nem produzem resíduos (Rahman *et al.*, 2015). É uma técnica extremamente versátil que permite avaliar simultaneamente vários parâmetros químicos (p.e. teores em amido, proteína, etc.) e nutricionais (p.e. digestibilidade *in vivo* e/ou digestibilidade *in vitro*) (Givens *et al.*, 1997). Nos últimos 20 anos, as análises NIR foram amplamente utilizadas para a caracterização do valor nutritivo de forragens (Decruyenaere, 2015). Apesar das vantagens, esta tecnologia também apresenta importantes limitações, entre as quais os custos de aquisição de equipamentos, a necessidade de calibração, validação e atualização das equações para os diferentes tipos de matriz (Rahman *et al.*, 2015; Swain & Friend, 2013).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização das tecnologias FTIR para a determinação da concentração em n-alcenos e LCOH em amostras de distintas espécies vegetais e amostras fecais de herbívoros domésticos em regime de pastoreio em áreas desfavorecidas de montanha.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

2.1.1. Evolução Histórica

O termo espectroscopia provém do termo latim *spectare* que significa “olhar através de” e hoje em dia refere-se a qualquer técnica de onde se tire proveito da interação entre radiação e matéria, para retirar informação relativamente à estrutura ou constituição desta última (Dias, 1986). Em termos históricos, foi em 1740 que Isaac Newton demonstrou que a luz solar, ao atravessar um prisma de vidro, se decompõe nas cores do arco-íris, naquilo que viria a ser considerada a primeira experiência espectroscópica (Lajunen & Perämäki, 2004).

Sendo a radiação infravermelha (IV) não visível ao olho humano, a descoberta da mesma viria a ter lugar mais tarde, em 1800 pelo cientista William Herschel quando investigava qual a “cor” da radiação solar que produzia mais calor. Durante a experiência, Herschel observou que a temperatura aumentava significativamente na zona acima da região vermelha do espectro, descobrindo assim uma zona invisível da radiação que denominou de infravermelho (Pasquini, 2003).

A radiação IV é uma radiação eletromagnética que se localiza no intervalo espectral entre os comprimentos de onda de 760 nm a 100000 nm, encontrando-se assim num intervalo correspondente a comprimentos de onda maiores do que a parte vermelha da porção visível do espectro eletromagnético, mas menores do que a radiação de micro-ondas (Tsai & Hamblin, 2017). No que diz respeito à utilização da radiação IV para estudo da matéria, o seu início deu-se em 1900, quando Coblentz cria um espectrómetro rudimentar e consegue produzir os primeiros espectros de compostos orgânicos, embora o aparelho, que recorria à radiação solar, permitisse somente aquisição um espectro por dia. Coblentz verificou que cada composto possuía o seu próprio espectro, sendo este específico, único e referente à sua constituição (Pasquini, 2003).

A segunda guerra mundial foi o acontecimento histórico que marcou o desenvolvimento da espectroscopia de IV como técnica de análise. Estes avanços impulsionaram a tecnologia para o desenvolvimento de espectrómetros comercialmente disponíveis, permitindo assim a implementação generalizada desta técnica (Siesler *et al.*, 2002). A espectroscopia de infravermelho é classificada como uma técnica analítica versátil e

universal de análise estrutural e composicional para uma grande variedade de amostras orgânicas, inorgânicas e biológicas, podendo ser utilizada para determinações qualitativas e quantitativas. Proporciona vantagens nas áreas da produção e controlo de qualidade devido às suas potencialidades que se traduzem na realização de uma análise sem destruição da amostra e muitas vezes sem tratamento prévio, na robustez do aparelho, na rapidez e facilidade de execução (Stuart, 2004). As técnicas espectroscópicas baseadas na radiação IV traduzem a interação das moléculas com a radiação eletromagnética, havendo uma alteração do seu momento dipolar que se reflete na intensidade dos picos registados (Gallignani & Brunetto, 2004).

O grande “salto” da utilização da espectroscopia IV viria a surgir mais tarde, quando, quase cem anos depois da sua descoberta, o interferómetro de Michelson começa a ser utilizado para a aplicação desta técnica, representando o início histórico da espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (McCarthy & Kemeny, 2008). Este dispositivo ótico foi inventado em 1880 por Albert Abraham Michelson (Smith, 1996) e o desenvolvimento do FTIR não teria sido possível sem o mesmo.

Inicialmente, o interferómetro de Michelson foi criado para testar a existência de um *éter luminífero* como meio de propagação das ondas de luz. Posteriormente, Michelson estando ciente do potencial do seu interferómetro para obtenção de espectros, mediu manualmente muitos interferogramas. Infelizmente, os cálculos para converter um interferograma num espectro eram demasiado morosos, tornando assim impraticável o uso do interferómetro para a obtenção dos mesmos (Smith, 1996).

Mais tarde, a invenção e o desenvolvimento dos computadores, que realizam operações matemáticas para fazer os cálculos das transformadas de Fourier com maior rapidez, foram necessários para tornar o FTIR uma realidade (Smith, 1996). Esta técnica tem manifestado o seu enorme potencial na análise química de amostras biológicas. Com o desenvolvimento deste equipamento, espectros IV ganharam maior resolução e tornaram-se mais reprodutíveis, havendo a possibilidade de serem obtidos com recurso a certos acessórios, tais como o ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*), numa ampla variedade de tipos de amostras (Gaffney *et al.*, 2012). A introdução destes instrumentos gerou uma verdadeira revolução na espectroscopia de infravermelho devido às vantagens que fornece ao seu utilizador, pois permite a determinação automatizada de parâmetros de maior importância na caracterização de amostras (Stuart, 2004). Retirou-se essencialmente proveito desta técnica,

no intervalo do IV médio, onde se situam as frequências de vibração dos modos vibracionais fundamentais.

O infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) passou mais tarde a ser utilizado para fins analíticos, após a sua utilização nos estudos de Karl Norris em 1960, quando o mesmo estudou a caracterização de produtos agrícolas e alimentares com a espectroscopia de infravermelho próximo (Siesler *et al.*, 2002), ainda que este intervalo fosse primeiramente utilizado como suplemento às técnicas do IV médio e UV-visível.

Até às primeiras aplicações do NIR, relatadas na década dos anos 50, não se acreditava que esta técnica contivesse qualquer valor analítico, no entanto o setor dos alimentos agrícolas foi o primeiro a adotar a espectroscopia NIR como técnica analítica (Blanco & Villarroya, 2002). O NIR, aplicado em conjunto com a tecnologia FTIR, evoluiu ao ponto de se tornar indispensável para a investigação científica, bem como para uma extensa lista de aplicações nas áreas da agricultura, indústria alimentar, petrolífera, ambiental, farmacêutica e medicina, entre outras (Pasquini, 2003; Jimaré Benito *et al.*, 2008). A tecnologia NIR tem sido, também, amplamente utilizada em ciência animal para prever a composição química de forragens (Stuth & Tolleson, 2000), substituindo assim os métodos tradicionais (Blanco & Villarroya, 2002).

2.1.2. Princípios Teóricos

O termo espectroscopia designa métodos analíticos que consistem no estudo da interação das radiações eletromagnéticas com as moléculas (McCarthy & Kemeny, 2008). A ligação de dois átomos em moléculas envolve diferentes tipos de energia, como a energia translacional, vibracional e eletrónica. No caso da espectroscopia de infravermelho, esta tem por base os movimentos relativos dos átomos numa molécula, isto é, as suas vibrações. Esta espectroscopia deteta a radiação que é absorvida pelas ligações vibracionais moleculares (McCarthy & Kemeny, 2008).

A radiação eletromagnética decompõe-se em dois componentes ondulatórios, uma onda elétrica e uma magnética. A componente elétrica é a que vai interagir com as moléculas originando assim a absorção da radiação infravermelha (Stuart, 2004). Para que ocorra absorção por parte de uma molécula é necessário que a radiação incidente nesta provoque excitação dos seus modos vibracionais, de modo a que a sua energia corresponda à diferença de dois níveis energéticos vibracionais, que mediante a frequência e quantidade de energia

pode indicar o tipo e o número de ligações entre os átomos e grupos funcionais (Gottlieb *et al.*, 2004).

Para explicar o comportamento vibracional das moléculas existem vários modelos, contudo este comportamento é descrito pelo modelo do oscilador harmónico linear. Segundo este, a energia vibracional de um determinado sistema é uma função quadrática da distância entre os átomos, sendo a oscilação entre eles, simétrica (Siesler *et al.*, 2002).

O modelo considera que a ligação entre os átomos é feita por uma mola, em que a frequência de vibração da mola (ν) é descrita pela lei de Hooke e representada pelas seguintes equações (Siesler *et al.*, 2002):

$$(1) \nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad (2) \mu = \frac{m \cdot M}{m + M}$$

ν – Frequência de ligação da banda de absorção

k – Constante da força da ligação

μ – Massa reduzida do oscilador

m e M – Massas dos átomos presentes na ligação

Este modelo só permite a transição entre níveis vibracionais adjacentes, dado que todos os níveis estão igualmente espaçados e estas transições têm de respeitar os critérios de simetria (Siesler *et al.*, 2002).

No espectro eletromagnético (Figura 1), a região IV encontra-se entre as gamas do visível e micro-ondas e subdivide-se entre infravermelhos próximo (NIR), médio (MIR) e longínquo (FIR), cujos intervalos de números de onda são, respetivamente, 4000-14000 cm^{-1} ; 400-4000 cm^{-1} e 10-400 cm^{-1} (Siesler *et al.*, 2002; Polshin *et al.*, 2010).

A maioria das moléculas conhecidas absorve radiação da zona média do IV (MIR), em frequências que correspondem aos modos fundamentais próprios das mesmas, o que explica a utilização desta na identificação de grupos moleculares. Assim, a relação entre a estrutura química das moléculas e a radiação IV faz com que a espectroscopia IV seja uma ferramenta essencial na análise química das substâncias (McCarthy & Kemeny, 2008). Uma das maiores vantagens associadas à espectroscopia de infravermelho é o facto de poder ser utilizada em qualquer tipo de amostra e em praticamente qualquer estado, o que se deve à panóplia de diferentes adereços disponíveis presentemente para diferentes propósitos (Stuart, 2004).

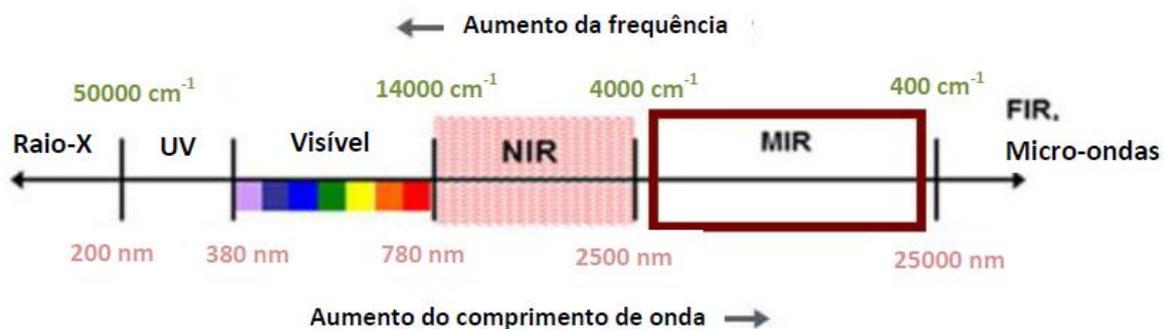


Figura 1-Representação do Espectro Eletromagnético (adaptado de Mills, 2016).

2.1.3. Intervalos Espectrais

A radiação infravermelha, ao incidir numa molécula provoca a excitação dos seus modos vibracionais, que é devida à absorção de radiação de energia correspondente à frequência deste modo vibracional. Apenas os modos que alteram o momento dipolar da molécula são detetados através de um espectro de infravermelho (Stuart, 2004).

Um espectro de absorção infravermelha não é mais que um registo do número e tipos de movimentos vibratórios possíveis e próprios de um composto, obtido pela passagem da radiação IV por uma amostra, sendo que uma molécula não-linear possui $(3N-6)$ modos fundamenais, sendo 'N' o número de átomos da mesma. Assim cada molécula possui um espectro de absorção único, tal como uma “impressão digital”, o que se deve, não só ao número de modos ativos e frequências dos mesmos, mas também à intensidade relativa do pico correspondente a cada um (Stuart, 2004). Consequentemente, a partir do conhecimento da localização dos picos de absorção de cada grupo funcional ou elemento, é possível caracterizar amostras e, se conhecida a intensidade dos mesmos, determinar a concentração dos seus constituintes. No entanto, devido às sobreposições, a interpretação torna-se mais complexa, sendo por vezes necessária a decomposição destes sinais nas diferentes contribuições devidas a distintos compostos individuais, para esse efeito (McCarthy & Kemeny, 2008).

- NIR

A região NIR é a região do infravermelho situada entre os 780 e 2500 nm (Blanco & Villarroya, 2002). A maioria dos materiais orgânicos possui propriedades de absorção nesta gama (Siesler *et al.*, 2002). A espectroscopia de infravermelho próximo gera espectros onde

se registam sobretons de modos fundamentais (*overtones*, correspondentes a múltiplos da frequência dos modos fundamentais) e combinações, cuja frequência corresponde à soma das frequências dos modos fundamentais combinados (Siesler *et al.*, 2002).

A absorção da radiação NIR pelas moléculas orgânicas acontece primeiramente devido a estes modos de combinação e *overtones* dos grupos O-H, C-H, N-H, ligações às quais a espectroscopia NIR é particularmente sensível, devido ao facto de corresponderem a grupos fundamentais com forte carácter dipolar (Stuart, 2004). O facto de as absorções serem menos intensas, no que diz respeito aos *overtones*, e ocorrerem sobreposições e combinações das ligações dos modos vibracionais dos vários grupos funcionais, torna o espectro NIR particularmente complexo, ao contrário do que acontece com as espectroscopias de MIR e FIR, onde cada pico pode ser linearmente relacionado com um grupo funcional específico (Ziegel, 2004).

Assim, a espectroscopia NIR, tal como já foi referido, baseia-se em absorções de energia por parte das ligações existentes nas moléculas de uma amostra que são causadas por três mecanismos diferentes: sobreposições de vibrações fundamentais; combinações de vibrações fundamentais e ainda absorções eletrónicas, gerando no espectro NIR picos de absorção com baixa seletividade. Estes picos possuem uma menor absorvidade quando comparadas com a espectroscopia MIR, tornando este método menos sensível, contudo apresenta a vantagem de não ser necessário, na maioria dos casos, qualquer preparação da amostra, não necessitando de diluições, realizando-se assim a leitura direta da amostra (Ziegel, 2004).

Os espectros NIR, além de conterem informação sobre a composição química da amostra, também relacionam a informação física da mesma. Um exemplo é o tamanho das partículas, quanto mais grosseiras forem maior será a penetração de luz, logo maior será a absorção, ao passo que o tamanho de partícula terá também influência noutros fenómenos de difração de luz, tais como a dispersão *Mie* (Antunes *et al.*, 2010).

A espectroscopia de infravermelho próximo apresenta outras vantagens, como ser uma metodologia não destrutiva nem invasiva quer para sólidos quer para líquidos; ser rápida na obtenção de espectros, cálculos e apresentação de resultados; não necessitar de uso de reagentes, ou seja, não representa um método poluente e a manutenção dos aparelhos ser reduzida. Adicionalmente, a informação contida no espectro NIR é capaz de detetar alterações ou impurezas no produto, não detetáveis por métodos analíticos convencionais (Siesler *et al.*, 2002).

Como todas as técnicas, esta também apresenta desvantagens entre as quais o facto dos espectros obtidos serem 1) pouco seletivos, complexos e não serem de interpretação direta, 2) não existirem modelos precisos que relacionem a interação entre a luz infravermelha e a matéria, pelo que a calibração é muitas vezes empírica, 3) a construção de modelos de calibração robustos e precisos é por vezes difícil, implicando a utilização de um número razoavelmente grande de amostras para que se possam abranger todas as variações das propriedades químicas e/ou físicas, para além do facto da construção de modelos NIR implicar um investimento substancial (Blanco & Villarroya, 2002).

- MIR

A região do MIR (do inglês, *Mid-infrared*) é uma região do infravermelho situada entre 2500 e 25000 nm (Rossel *et al.*, 2006). A absorção de radiação observada nesta região corresponde a transições de vibração fundamental. Estas bandas de absorção na gama MIR são intensas e o espectro resultante é muito rico em informação relativa à estrutura química do composto, ainda que a interpretação da informação nem sempre seja simples (McCarthy & Kemeny, 2008). A região MIR é largamente utilizada para fins qualitativos dada a informação de estrutura no espectro. No entanto, as análises quantitativas são mais limitadas dada a necessidade de diluição das amostras e a dificuldade em encontrar solventes que não absorvam nas regiões de interesse, limitações essas que foram ultrapassadas com a introdução do acessório ATR (Stuart, 2004).

É uma região muito robusta e reprodutível, o que permite a medição de pequenas variações dos componentes da amostra. As moléculas que absorvem na região MIR apresentam vibrações em uma ou mais regiões do espectro, dependendo de diversos fatores, tais como a configuração, posição das ligações e comprimento das mesmas (Pasquini, 2003). Outra das preeminências da espectroscopia MIR é fornecer informações estruturais de moléculas. As absorções de cada tipo de ligação são encontradas, geralmente, apenas em regiões específicas do espectro de infravermelho médio. Picos de absorção característicos podem ser associados a compostos presentes em maior quantidade na amostra (Karoui *et al.*, 2010).

A ampliação da aplicabilidade do MIR veio com o desenvolvimento de novos métodos de aquisição de espectros, mais rápidos, práticos e versáteis como é o caso da refletância total atenuada (ATR), sendo a mais comumente utilizada (Karoui *et al.*, 2010). Neste âmbito, a água é um composto com absorção acentuada na região do MIR, interferindo na determinação

de outros componentes presentes na amostra em causa, o que representa uma limitação histórica, que tem sido ultrapassada pela utilização do acessório ATR (Polshin *et al.*, 2010).

Quando comparado com o NIR, o MIR possui sinais mais seletivos e de maior intensidade, explicando a sua aplicação em análises qualitativas, principalmente de compostos orgânicos. O facto de também se revelar mais sensível permite a deteção de componentes em concentrações mais reduzidas (Karoui *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de espectrómetros com Transformada de Fourier renovou o interesse no potencial do MIR para análise de amostras orgânicas. Atualmente maior parte dos espectros MIR são medidos com espectrómetros FTIR, uma vez que estes permitem uma aquisição mais rápida de espectros e espectros com relações sinal-ruído mais aceitáveis, devido à vantagem “multiplex” (Dias, 1986; Polshin *et al.*, 2010). A espectroscopia FTIR fornece informações químicas mais detalhadas sobre a composição da amostra do que a espectroscopia NIR, pois mede vibrações moleculares fundamentais, diretamente correlacionadas com grupos funcionais em vez de *overtones* e bandas de combinações (Lyons *et al.*, 2016).

2.1.4. Fatores que afetam os espectros

De acordo com Dias (1986), existem várias variáveis que podem influenciar os espectros, tanto física como quimicamente. Não sendo possível nomeá-las todas, as mais comuns são designadamente:

- **Temperatura da amostra:** é importante, pois uma diferença de alguns graus pode produzir alterações substanciais nos espectros. Aplicável, não só a soluções, mas também a amostras sólidas e pós que contenham água;

- **Solventes e Humidade:** na medida em que as ligações de hidrogénio podem ocorrer entre as amostras e os solventes/excipientes podem influenciar o espectro, assim como a contribuição direta devido à absorção dos últimos;

- **Espessura da Amostra:** é um fator que deve ser controlado, quer no modo de transmitância, usando um comprimento ótico fixo, bem como no modo de refletância, onde se deve controlar a profundidade de penetração da luz, para que não altere o espectro se a espessura da amostra aumentar, este fator é mais importante no caso do IV clássico com recurso a pastilhas, ao passo que é muito debelado pelo acessório ATR.

- **Propriedades Óticas da Amostra:** no caso dos sólidos, a superfície e espalhamento da amostra devem ser tomadas em conta, pois a morfologia da superfície e o índice de

refração afetam as propriedades de dispersão de materiais sólidos. O grau de compactação ou dimensões variáveis das partículas ou acabamento da superfície podem causar diferenças significativas entre os espectros;

- **Polimorfismo:** as variações da estrutura cristalina de amostras com a mesma composição química influenciam o espectro obtido. Diferentes polimorfos ou formas sólidas amorfas podem ser distinguidos pelos espectros obtidos, bem como diferentes estados de hidratação cristalina ou estados de solvatação do mesmo material podem resultar em espectros próprios;

- **Idade das Amostras:** pode manifestar alterações físicas, químicas e óticas, pelo que se deve dar atenção às amostras e padrões utilizados, pois estes podem não ser adequados a uma correta análise espectral ou não representar o material que se pretende analisar devido às alterações sofridas.

Estas variáveis dão origem a mudanças na forma dos picos por alterações nas forças intermoleculares e intramoleculares fracas. Os efeitos mais acentuados podem ser observados para picos de grupos funcionais com ligações de hidrogénio, tais como grupos hidroxilo, devido ao facto das forças intermoleculares terem efeitos mais fortes nestes (Swierenga *et al.*, 2000). Adicionalmente, os fatores apontados podem também levar à introdução de *baselines* nos espectros, que são devidas a outras contribuições, que não vibracionais, representando assim uma contribuição indesejável para os mesmos, dado que não se relacionam com a estrutura dos compostos ou composição da amostra (Dias, 1986).

2.2. Métodos de Análise de Amostras

A radiação, ao incidir numa amostra pode ser absorvida, transmitida ou refletida (Stuart, 2004). Assim, existem vários modos de aquisição de espectros de infravermelho. A seleção do modo de aquisição mais adequado depende de diversos fatores como o tipo da amostra e as condições do equipamento (Pasquini, 2003).

A transmitância mede o decréscimo na intensidade da radiação, em função do número de onda, quando esta passa através da amostra e é absorvida. A amostra deve então ser minimamente transparente à radiação e colocada entre a fonte e o detetor, de forma a evitar o fenómeno de saturação (McCarthy & Kemeny, 2008). Normalmente, os espectros dos materiais transparentes são medidos em transmitância, já os líquidos túrbidos e os sólidos,

podem ser por transmitância difusa, refletância difusa ou transletância, dependendo das suas absorções características de dispersão (Arnold *et al.*, 2002).

A espectroscopia de refletância mede a luz refletida pela superfície da amostra, que é composta por um componente especular e um difuso. Os métodos de refletância podem ser usados em amostras que são difíceis de analisar por métodos de transmitância. A refletância pode dividir-se em duas categorias: refletância interna, que envolve uma célula ATR em contacto com a amostra e a refletância externa que envolve um feixe de infravermelhos refletido diretamente da superfície da amostra. Nesta última, quando a radiação incide na amostra, pode ser refletida sob a forma de refletância especular ou difusa (DRIFT) (Osborne *et al.*, 1993).

2.2.1. ATR

O modo de refletância total atenuada é usado na análise da superfície de materiais sólidos ou líquidos. É adequada também para a caracterização de materiais que sejam demasiado finos ou que absorvam demasiado intensamente quando analisados por espectroscopia de transmitância, de modo a evitar o fenómeno de saturação (Kellner *et al.*, 2004).

Na espectroscopia de infravermelhos por ATR, a superfície da amostra é colocada em contacto com a superfície de um cristal ótico (com elevado índice de refração), incidindo a radiação várias vezes na amostra. Quando o ângulo de incidência na interface amostra/cristal excede o ângulo crítico, a reflexão total interna da radiação ocorre e uma onda evanescente é estabelecida na interface. A radiação é refletida através do cristal (Figura 2) penetrando na amostra a cada reflexão, ao longo da superfície do mesmo (Kellner *et al.*, 2004).

Após este processo, a radiação atenuada resultante é direcionada do cristal para o percurso normal do feixe no espectrofotómetro sendo medida pelo detetor, de forma a registar o espectro da amostra. Esta configuração experimental cria a capacidade de analisar amostras biológicas ou mesmo soluções aquosas, evitando completamente a questão da saturação (Kellner *et al.*, 2004).

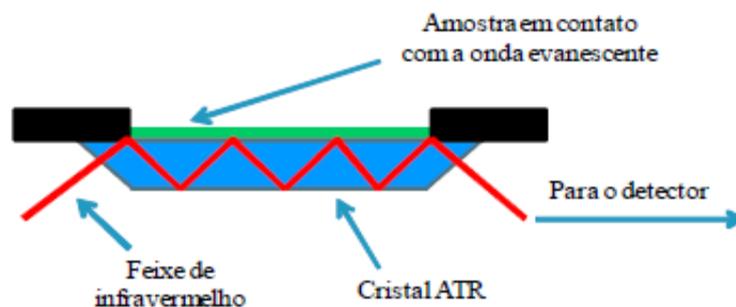


Figura 1-Esquema de um sistema ATR (PerkinElmer, 2005).

Num espectrofotómetro ATR tem de existir um contacto muito próximo entre a amostra e a superfície do cristal, uma vez que o efeito ATR tem lugar nesta, daí se utilizar por vezes uma prensa de modo a garantir um perfeito contacto entre a superfície da amostra e o cristal, como no caso de sólidos particulados (Stuart, 2004).

O ATR é um dos mais poderosos e versáteis métodos de infravermelho médio, devido à flexibilidade em termos de amostras passíveis de ser analisadas (Polshin *et al.*, 2010). A técnica de refletância total atenuada tem revolucionado análises de amostras líquidas e sólidas, uma vez que permite colmatar os aspetos mais desafiadores da análise em infravermelho, nomeadamente a preparação de amostras e a reprodutibilidade espectral, assim como o fenómeno de saturação, permitindo mesmo a aquisição de espectros de soluções aquosas, o que se torna muito importante para a análise de sistemas biológicos através desta técnica (Stuart, 2004).

2.2.2. DRIFT

Inicialmente, o uso da refletância difusa era restrito às regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo (Chalmers & Mackenzie, 1985). Com o aperfeiçoamento dos equipamentos e acessórios de refletância difusa, a técnica tem sido utilizada como prática de rotina na região do infravermelho próximo, oferecendo inúmeras vantagens (Coleman, 1993).

O potencial da técnica foi reconhecido como um novo método de análise para aplicações quantitativas. A aplicação desta requer um entendimento teórico das suas limitações para obtenção de espectros de boa qualidade, ainda que os instrumentos atuais permitam a aquisição de espectros com grande reprodutibilidade, através da mesma, sem requerer demasiados cuidados (Coleman, 1993).

Na refletância difusa, a energia que penetra numa partícula ou num aglomerado de partículas é refletida em todas as direções. Esta refletância mede a razão entre a intensidade da luz refletida a partir da amostra e a intensidade de luz incidente (Kellner *et al.*, 2004).

A espectroscopia de infravermelhos de refletância difusa por transformada de Fourier, designada de DRIFT (do inglês, *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*), é particularmente útil na análise de partículas finas e pós, que dispersam bem a radiação incidente e a absorvem em menor quantidade (Stuart, 2004). Assim a espectroscopia DRIFT envolve uma mínima preparação da amostra tanto em termos de tempo como de manipulação da mesma (Mitchell, 1993). Nesta técnica, a amostra é colocada no equipamento, num porta-amostras de quartzo, ou outro material transparente à radiação infravermelho (Osborne, 2000), sendo que quando a radiação penetra na mesma pode ser refletida da superfície de uma partícula ou ser transmitida através desta. A radiação refletida da superfície é tipicamente perdida. A radiação infravermelha que passa através da partícula pode ser refletida na próxima partícula ou transmitida através desta. Assim, a radiação incidente é dispersa em todas as direções num largo ângulo e este efeito de transmissão-reflexão pode ocorrer várias vezes na amostra, como sucede no caso das esferas de reflexão difusa. Por último, a energia da radiação infravermelha dispersa é convergida toda para um detetor, após ter sofrido interferências construtivas nas múltiplas reflexões dentro da esfera (Kellner *et al.*, 2004).

A espectroscopia DRIFT fornece, geralmente, boas relações sinal-ruído para a maioria das amostras, mas é também bastante sensível à morfologia das mesmas. Neste caso, os espectros dependem significativamente do tamanho das partículas das amostras (menor tamanho de partícula, melhor espectro) (Mitchell, 1993).

2.3. Análise Multivariada

A aplicação das técnicas de espectroscopia de infravermelho, apesar de todas as vantagens, depende decisivamente de uma calibração prévia bem conseguida, para que seja possível realizar análises quantitativas através dos espectros obtidos (Andueza *et al.*, 2011), uma vez que estes são complexos e não é possível a interpretação direta dos mesmos (McCarthy & Kemeny, 2008). Várias estratégias foram já sugeridas para o processo de calibração, que é particularmente complicado na análise de forragens, já que estas matrizes apresentam grande heterogeneidade. Como resultado destas dificuldades, as estratégias propostas dependem, tipicamente, de uma grande proximidade entre o conjunto de calibração e as amostras a serem testadas (Andueza *et al.*, 2011).

Um processo de calibração, normalmente, envolve uma análise de todas as amostras para os componentes de interesse, através de métodos de referência convencionais. As amostras devem ser representativas da população e com a maior variação possível, mas limitada à região de interesse (Porep *et al.*, 2015). Posteriormente procede-se a aquisição de espectros, pré-tratamento dos mesmos e validação estatística do método desenvolvido. Por fim, utiliza-se um modelo matemático que relacione os dados espectrais com os dados de referência obtidos, sendo que uma variedade de pré-processamentos e zonas espectrais podem ser usadas para desenvolver o modelo ideal de determinação dos parâmetros em estudo nas amostras (McCarthy & Kemeny, 2008).

O pré-tratamento espectral é relevante, uma vez que, os dados espectrais, por sofrerem inúmeras interferências, devem ser corrigidos. Variações nos espectros devido à temperatura, ruídos no detetor, deslocamentos de linha de base e de comprimentos de onda, são algumas dessas interferências. O pré-tratamento consiste em técnicas para reduzir, eliminar ou padronizar o impacto de fatores não desejáveis nos espectros, sem alterar a informação contida nos mesmos (Siesler *et al.*, 2002). É uma etapa importante para decidir quais os tratamentos que melhor responderão aos resultados pretendidos, sem distorcer, comprometer ou até mesmo inutilizar os dados obtidos (Leung *et al.*, 1998).

Um exemplo de pré-tratamento mais utilizado é a derivada, que segundo Martens & Geladi (2004), melhora a definição dos picos que se encontram sobrepostos na mesma região espectral e corrige a linha de base. Também o SNV (do inglês, *Standard Normal Variate*) pode ser utilizado como pré-tratamento, uma vez que tem a função de minimizar os efeitos do espalhamento da luz e interferências causadas pelo tamanho da partícula (McCarthy & Kemeny, 2008). A centralização e normalização são também comumente utilizados (Porep *et al.*, 2015).

O processo de calibração tem por finalidade o desenvolvimento de um modelo de regressão (Figura 3) pelo qual é feita uma relação entre os espectros e os valores de referência (McCarthy & Kemeny, 2008).

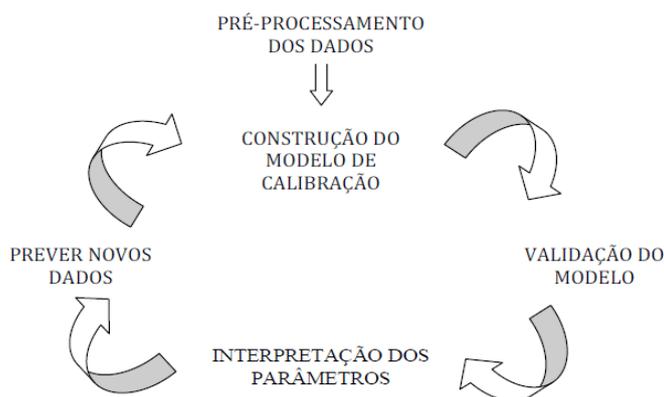


Figura 2-Processo geral de construção de modelos de regressão (Monteiro, 2011).

Existem vários métodos de calibração multivariada que incluem a regressão linear múltipla (MSR), mínimos quadrados parciais (PLS), mínimos quadrados parciais modificados (MPLS) e análise dos componentes principais (PCA) (Blanco *et al.*, 1997). Os mais utilizados são MPLS (Shenk *et al.*, 1979) e PLS (Manne, 1987). A calibração multivariada tem por objetivos medir, explicar, e prever o grau de relação entre as variáveis (McCarthy & Kemeny, 2008). A calibração divide-se em duas etapas, a primeira é a calibração propriamente dita, onde se estabelece uma função matemática que relaciona informação química contida nas propriedades espectrais de uma substância com informação física ou química avaliada por métodos laboratoriais de referência (Stuth *et al.*, 2003) para um conjunto de amostras, seguindo-se a validação externa, que é a maneira de validar analiticamente a capacidade do modelo desenvolvido para prever as propriedades de interesse de amostras desconhecidas (McCarthy & Kemeny, 2008). À *posteriori* da construção do modelo de calibração, é necessário que se teste a sua capacidade preditiva, e assim sendo, é analisado um novo conjunto de amostras (conjunto de validação) que deve corresponder a 1/3 do conjunto utilizado na calibração (Dias, 1986).

Em suma, um bom modelo de calibração prima-se por ser preciso, exato e robusto, e acima de tudo, ter capacidade de extrapolar valores para amostras que não foram utilizadas no conjunto de calibração (Dias, 1986).

2.3.1. Regressão PLS

De todos os métodos de regressão multivariada, o PLS (do inglês, *Partial Least Square*), é talvez, o mais utilizado. É uma técnica de análise de dados multivariados, desenvolvida em 1960 por Herman Wold (Tobias, 1995) e utilizada para relacionar uma ou mais variáveis resposta, correlacionando-as de modo a obter uma relação linear, baseada no uso de fatores (componentes principais) estatisticamente significantes, obtidos com o auxílio de validação cruzada (Purcell *et al.*, 2007). O método é usado principalmente em determinações quantitativas, obrigando à análise de um elevado número de amostras para se conseguir estabelecer uma relação útil entre a informação retirada do espectro e as concentrações obtidas experimentalmente (McCarthy & Kemeny, 2008). Um fator a ter em consideração é a seleção apropriada da região espectral, uma vez que parte da informação contida num espectro NIR pode ser redundante, e os sinais medidos em certos comprimentos de onda podem ser não lineares, constituir ruído ou conter informação inútil para a previsão do valor analítico (Lavine, 2000).

O PLS é usado para desenvolver calibrações, ao passo que alguns parâmetros permitem avaliar a qualidade do modelo, estes englobam a exatidão, linearidade e precisão (McCarthy & Kemeny, 2008). A exatidão é a concordância entre o valor previsto pelo modelo e os valores de referência. A sua estimativa é dada pela raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP), calibração (RMSEC) e validação (RMSEV).

A precisão é a correlação entre os valores previstos através de medições sucessivas e quanto mais próximos esses valores, maior a precisão do modelo de calibração (McCarthy & Kemeny, 2008). Por último, a linearidade é a capacidade do modelo de prever valores diretamente proporcionais aos valores de referência. É dada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), que quanto mais próximo a um, mais linear é o modelo e portanto, maior a proximidade entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo (Martens & Naes, 1990), e assim, melhor qualidade das calibrações (Landau *et al.*, 2015).

O método PLS domina as aplicações de espectroscopia MIR e NIR (McCarthy & Kemeny, 2008). Uma das desvantagens deste tipo de regressão é a necessidade de uma adequada seleção de amostras para a calibração (Geladi & Kowalski, 1986). O processamento do modelo matemático consiste na determinação de duas matrizes que irão traduzir as variações espectrais e os valores de referência, gerando vetores próprios, designados de componentes principais ou fatores, que podem ser utilizados na previsão da concentração do

componente pretendido. A vantagem é a informação mais relevante ficar comprimida e poder ser utilizada na calibração (McCarthy & Kemeny, 2008).

A seleção do número ótimo de fatores é de grande relevo para a determinação da qualidade do modelo PLS obtido. Quando é feita uma escolha de um número de fatores menor do que os necessários, pode corresponder a uma calibração que origine resultados pouco precisos, pois possui menos informação do que a necessária na realidade (*Underfitting*), pelo contrário, com um elevado número de fatores a análise é deteriorada, uma vez que é incorporado mais ruído e variações sistemáticas, e o modelo fica demasiado ajustado ao conjunto de calibração, não tendo capacidade preditiva (*Overfitting*). Assim sendo, no processo de construção da calibração é da máxima importância encontrar o número ideal de fatores, que irão fornecer uma melhor previsão relativamente às novas amostras, com menor erro, sendo os métodos com um menor número de fatores os mais desejados, uma vez que são os mais simples e, supostamente, os mais robustos (Gowen *et al.*, 2011).

2.4. Aplicação de técnicas FTIR na nutrição animal

A espectroscopia de infravermelho, principalmente no intervalo NIR, tem vindo a ser utilizada com sucesso para a avaliação da composição química dos alimentos (Aufrère *et al.*, 1996; Dixon & Coates, 2009), mas também de alguns parâmetros nutricionais, nomeadamente, a ingestão voluntária (Keli *et al.*, 2008), a digestibilidade (Aufrère *et al.*, 1996) e a composição da dieta ingerida pelos animais (Keli *et al.*, 2008).

Vários são os estudos conhecidos que aplicam as técnicas FTIR à nutrição animal, incidindo particularmente na análise de diferentes parâmetros químicos em amostras fecais e de diferentes tipos de alimentos (Decruyenaere *et al.*, 2009). Aufrère *et al.* (1996) avaliou o potencial das metodologias NIR para avaliação de diferentes parâmetros químicos (PB, GB, FB, NDF, ADF, ADL), digestibilidade da matéria orgânica (DMO), energia bruta (EB), energia digestível (ED) e energia metabolizável (EM) de 87 e 80 alimentos compostos normalmente utilizados na alimentação de suínos e ruminantes, respetivamente. Para cada parâmetro, as calibrações foram realizadas usando pré-tratamentos com a primeira e segunda derivada dos espectros, juntamente com o SNV. O método de regressão utilizado foi o MPLS. Os resultados obtidos indicam que a precisão da estimativa (expressa como erro padrão da calibração, RMSEC) variou com o parâmetro avaliado e o tipo de alimento. De facto, a título de exemplo, para os alimentos utilizados na alimentação de suínos, a precisão foi baixa para a PB (RMSEC=7,96), amido (RMSEC=13,36) e constituintes da parede celular (RMSEC de

13,19; 6,17 e 2,85 para o NDF, ADF e ADL, respetivamente), sendo elevada para a EB (0,24), DMO (1,17) e EM (0,38). Uma das importantes conclusões deste estudo foi que as equações desenvolvidas para os alimentos de suínos não poderem ser utilizadas para estimar a composição química dos alimentos ruminantes (e vice-versa), como resultado das diferenças na natureza e proporções dos ingredientes utilizados nos alimentos. Mais recentemente, Lyons *et al.* (2016) avaliaram a aplicação de FTIR para o desenvolvimento de equações para avaliação da composição química de silagens de erva e amostras fecais de ovinos, a ingestão voluntária e digestibilidade da matéria seca. Para a análise dos dados, estes autores utilizaram a análise de componentes principais (PCA) e regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) para calibrar equações para a determinação destas composições. Com base nas estatísticas de calibração e desempenho, as equações de regressão PLS desenvolvidas para as cinzas e NDF foram boas e poderiam ser usadas para a sua quantificação (R^2 *cross validation* = 0,80-0,90). Para o ADF, lenhina e digestibilidade da matéria seca, o R^2 *cv* foi adequado para análise qualitativa (0,70-0,80). No entanto, para as equações de calibração para a matéria seca, azoto, energia bruta, ingestão voluntária e digestibilidade de energia bruta revelaram-se inadequadas para a sua estimativa (R^2 *cv* \leq 0,70). Os autores admitem que o desempenho das equações desenvolvidas poderá ser melhorado através do estabelecimento de uma base de dados mais alargada e diversificada de espectros de amostras, tanto de fezes como de alimentos. De facto, conjuntos de dados de maior dimensão e mais abrangentes tendem a produzir modelos de estimativa com melhor desempenho e maior robustez. Apesar disso, Lyons *et al.* (2016) consideram que o desenvolvimento destas equações de calibração poderá constituir uma mais-valia para o setor da produção animal, especialmente no que diz respeito à digestibilidade da matéria seca, pois este é um parâmetro nutricional cuja avaliação é difícil e complexa.

Decruyenaere *et al.* (2009) também se debruçou sobre avaliação do potencial do NIR aplicado às forragens e/ou fezes para estimar a digestibilidade *in vivo* da matéria orgânica e a ingestão voluntária. Os modelos foram desenvolvidos recorrendo também à regressão PLS e a precisão por eles alcançada foi semelhante à obtida por outros métodos. O melhor modelo preditivo neste estudo foi obtido usando a segunda derivada dos espectros com correção de dispersão SNV. As estimativas para digestibilidade através deste método foram suficientemente robustas e aceitáveis ($R^2 > 0,85$), já para a ingestão voluntária não foi possível desenvolver calibrações com igual robustez, principalmente nas amostras de forragens ($R^2 < 0,52$). Este facto pode ter ficado a dever-se aos efeitos de matriz, decorrentes da heterogeneidade destes alimentos.

No estudo de Landau *et al.* (2005) foi testada a utilização de NIR nas fezes para a previsão do teor da proteína bruta da dieta e digestibilidade *in vitro* da matéria seca em caprinos. Neste caso, os dados espectrais brutos foram tratados com SNV, e as equações foram desenvolvidas com recurso à regressão PLS. A qualidade dos modelos foi avaliada pelo R^2c e pelo erro padrão de calibração. Foram utilizados dois conjuntos de dados que consistiam em pares de dietas/fezes. Para o conjunto de dados de previsão da proteína bruta da dieta foram obtidos valores de R^2c que variaram entre 0,90-0,98, sendo os valores obtidos na validação externa (R^2v) compreendiam-se entre 0,55-0,85. Para o conjunto de dados de previsão de digestibilidade de matéria seca, observaram-se R^2c de 0,85-0,97 e R^2v de 0,40-0,73. Adicionalmente, a precisão, avaliada com o auxílio da validação cruzada (com o erro associado) e o R^2v foram menores na estimativa da digestibilidade *in vitro* do que para a proteína bruta da dieta.

Para além do NIR, também o intervalo MIR tem sido utilizado para semelhantes determinações mencionadas acima. Assim, Cleland *et al.* (2018) testaram o uso do FTIR na região MIR como ferramenta para prever a composição química (matéria seca, proteína, NDF, ADF, hemicelulose), digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica e energia metabolizável de forragens. De acordo com estes autores, o desempenho dos modelos na região MIR poderá ser superior à região NIR em misturas complexas de forragens. Neste estudo, foram testados vários pré-tratamentos (entre os quais SNV e a primeira derivada) e foram criados modelos de previsão, por exemplo, para a hemicelulose e a fração NDF que revelaram alta qualidade e robustez (R^2c de 0,92 e 0,86, respetivamente). Estes resultados indicam que a utilização do MIR, juntamente com um pré-tratamento de dados adequado, proporciona um bom desempenho na previsão de parâmetros químicos e nutricionais. Isto deve-se ao facto das características espectrais na região MIR serem mais passíveis de ser associadas a um componente específico, em comparação com a região NIR, daí os modelos serem mais robustos a prever a composição em misturas complexas.

3. Materiais e Métodos

O objetivo deste trabalho incidiu em avaliar a utilização das tecnologias FTIR para a determinação da concentração em n-alcanos e LCOH em amostras de diferentes espécies vegetais e amostras fecais de herbívoros domésticos em regime de pastoreio em áreas desfavorecidas de montanha.

As amostras utilizadas neste estudo foram recolhidas durante os anos de 2011 a 2013 no âmbito do projeto intitulado “*Conducta de pastoreo y respuestas productivas del vacuno y equino cuando son manejados en brezales com diferente disponibilidad de superficie de pradera, e impacto en la flora y fauna*” coordenado pelo Dr. Koldo Osoro com a colaboração de alguns investigadores do Departamento de Zootecnia da UTAD. Este projeto teve como objetivo conhecer o comportamento alimentar destas espécies animais em comunidades vegetais de montanha, informação necessária para o desenvolvimento de sistemas de produção animal sustentáveis nestas áreas consideradas desfavorecidas.

Este estudo foi realizado na estação experimental do Carbayal, Sierra de San Isidro, Illano, oeste das Astúrias (NO Espanha, 43° 19' N; 6° 54' O) localizada a 900-1000 metros acima do nível do mar em duas parcelas com distinta disponibilidade (80% e 25%) em pastagem melhorada (*L. perenne* e *T. repens*) e vegetação arbustiva natural. A comunidade vegetal característica desta área de montanha é caracterizada por um mato natural de ericáceas (*Erica umbellata*, *Erica cinerea*, *Calluna vulgaris*, *Erica australis* e *Erica arborea*) e tojo (*Ulex gallii*). As espécies de herbáceas naturais são em geral gramíneas, nomeadamente *Pseudarrhenatherum longifolium*, *Agrostis capillaris* e *Agrostis curtissi*. Durante a estação de pastoreio (finais de abril e meados de novembro) foram utilizados 12 bovinos de carne da raça Asturiana de los Valles, com peso vivo (PV) de 512 ± 11.6 kg e 12 equinos cruzados, principalmente Galego de Monte, com PV de 320 ± 7.4 kg.

No presente trabalho, foram utilizadas 33 amostras de alimentos (*Trifolium repens*, *Erica* spp., *Lolium perenne*, *Ulex gallii*, herbáceas, herbáceas do monte e gramíneas), recolhidas em junho, agosto e outubro, e 181 amostras de fezes (90 de vaca e 91 de cavalo) também recolhidas em simultâneo e por cada animal. Estas amostras vegetais e fecais (Figura 4 e 5) foram previamente analisadas quimicamente de modo a estimar a qualidade nutritiva dos alimentos. Foram preparadas para a análise de n-alcanos e álcoois de cadeia longa, congeladas a -20°C, posteriormente liofilizadas e moídas por um crivo de 1mm. Seguidas estas análises, as amostras foram armazenadas em sacos de plástico sob vácuo.



Figura 3-Exemplo de amostra de brejo utilizada para análise.



Figura 4-Exemplo de amostra de fezes de cavalos utilizada na análise.

3.1. Aquisição de espectros

Os espectros infravermelhos NIR e MIR foram registados recorrendo a um espectrómetro FTIR *Thermo Scientific Nicolet iS50*, equipado com um acessório ATR, para aquisição dos espectros MIR, e DRIFT para aquisição dos espectros no intervalo NIR (Figura 6). O instrumento é controlado pelo software Omnic, versão 9.2.28, de Thermo Fisher Scientific Inc.



Figura 6-Espectrômetro FTIR Thermo Scientific Nicolet iS50 equipado com acessório ATR e DRIFT (Thermo Scientific, 2012).

Testes preliminares foram realizados aos espectros, de forma a otimizar a relação entre a qualidade espectral suficiente para desenvolver o presente trabalho, e o tempo necessário para o levar a cabo. Assim sendo os espectros MIR foram registados num intervalo de número de onda de 400-4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 *scans* registados para cada espectro. Os espectros NIR foram recolhidos no intervalo de número de onda de 4000-14000 cm^{-1} , com uma resolução de 8 cm^{-1} , sendo registadas 128 aquisições para cada espectro. Entre diferentes amostras foi sempre registado um espectro de *background*, sem colocação de amostra, que foi automaticamente subtraído do espectro final obtido; este foi sempre obtido com as mesmas condições de registo do espectro final. Após aquisição dos espectros, estes foram guardados em formato “.csv”.

O número de aquisições ‘*scans*’ é importante para a determinação do número de vezes que é registada a energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda. Quanto mais *scans*, maior é a sensibilidade do equipamento para minimizar os ruídos, que provêm de contribuições aleatórias (Marten *et al.*, 1989).

A resolução determina o intervalo mínimo de número de onda em que dois picos diferentes podem ser discernidos. Resoluções mais baixas (intervalos maiores) levam a que seja menor o tempo necessário para que todo o comprimento de onda seja medido, mas também a uma pior relação sinal-ruído, para além da menor quantidade de picos que podem ser distinguidos. O aumento do número de *scans* contribui para o aumento da resolução, dado

que o ruído pode, por vezes, impedir o discernimento de diferentes contributos espectrais que formam picos (McCarthy & Kemeny, 2008).

Na aquisição dos espectros NIR, antes da colocação da amostra no detetor procedeu-se à limpeza da superfície do mesmo com álcool etílico, e colocou-se uma pequena porção de amostra em pó em cima do detetor de modo a abranger a totalidade da superfície do mesmo.

Na aquisição de espectros MIR, o procedimento de limpeza foi idêntico ao do NIR, procedeu-se à limpeza da superfície do cristal ótico com etanol (de modo a evitar efeitos de memória), e efetuou-se também a limpeza da ponta de aço do acessório ATR que contactava com a amostra. A quantidade de amostra utilizada neste equipamento foi menor que a utilizada no NIR, sendo esta colocada na superfície do cristal, e o acessório ATR fechado, para que não houvesse contato direto entre a amostra e a superfície do cristal. Neste equipamento o background foi realizado entre cada espectro da mesma amostra e entre amostras, assim como a limpeza com etanol. Em ambos os intervalos NIR e MIR, os registos espectrais foram realizados à temperatura ambiente e no modo de absorvância e para cada amostra foi registada no mínimo em triplicado para que se conseguisse um espectro médio representativo a ser usado posteriormente na calibração.

3.2. Processamento dos espectros

Antes do desenvolvimento dos modelos de calibração, foram efetuados e testados alguns pré-tratamentos aos dados espectrais, de modo a reduzir interferências, e surgimento de artefactos espectrais nos mesmos. Inicialmente, procedeu-se à normalização dos espectros, tanto no NIR como no MIR, para que os mesmos sejam comparáveis. Este processo permite a correção de acordo com uma determinada intensidade. Todas as intensidades do espectro são divididas pela intensidade ou área de pico selecionada, ou a intensidade média dos picos espectrais existentes no intervalo em causa, que foi a abordagem utilizada (Labcognition, 2018). Isto permite destacar as diferenças de intensidade observadas nos picos, em várias regiões espectrais, permitindo a extração de informações não acessíveis a partir de dados em bruto (Kwaśniewicz & Czarnecki, 2018).

Posteriormente procedeu-se à subtração da *baseline* dos espectros obtidos pelo MIR para remover contribuições não vibracionais, e para isso recorreu-se a polinómios de 4º grau, com 50 iterações para convergência. O uso da primeira derivada dos espectros foi também testada como pré-tratamento, permitindo superar artefactos espectrais, como os desvios de linha de base que podem permanecer após os tratamentos espectrais anteriores, além de exibir

melhor desempenho em trabalhos anteriores em relação ao uso dos espectros, para fins de desenvolvimento de modelos de calibração através análise estatística multivariada. Este tipo de tratamento permite expor as diferenças e isolar os diferentes picos de interesse (De Luca *et al.*, 2011).

A utilização do processamento SNV foi também testada, de forma a colmatar as diferenças de percurso/amostras, assim como produzir uma *baseline* mais uniforme e melhorar a estrutura dos picos importantes. É um processo de normalização mais completo que tem em conta o desvio padrão dos dados. Os intervalos de desvio padrão selecionados foram os mesmos correspondentes às pré-seleções das regiões do NIR e MIR. Embora melhore a precisão dos resultados, não simplifica o modelo matemático e não reduz as interferências sistemáticas (Naes *et al.*, 2002).

A pré-seleção dos comprimentos de onda usados no processamento dos espectros é uma das formas de melhorar a precisão, aumentar a capacidade de previsão dos modelos e diminuir a complexidade dos mesmos (Xiaobo *et al.*, 2010). Assim, no NIR foram usadas duas regiões distintas para proceder à análise multivariada e para testar a sua performance. Usou-se o intervalo completo de 4001-14000 cm^{-1} e o intervalo de 4000-9000 cm^{-1} onde se localizam os modos de combinação e sobretons. No MIR as regiões usadas foram de 770-1800 cm^{-1} (região de baixa frequência) e de 2770-3700 cm^{-1} (região de alta frequência), correspondentes a modos vibracionais fundamentais de interesse. O uso de duas regiões distintas foi aplicado tanto para as amostras das fezes como dos alimentos.

3.3. Desenvolvimento de modelos de calibração

O desenvolvimento de um modelo de calibração e o seu sucesso dependem de várias etapas. Uma delas é a seleção de amostras para calibração, pois estas devem ser representativas da variabilidade dos parâmetros em causa na matriz a ser utilizada. Outra das etapas debruça-se nos métodos de referência, uma vez que o desenvolvimento de modelos quantitativos requer um conhecimento prévio dos valores dos parâmetros em estudo (Dias, 1986).

Para a determinação das equações de calibração foram testados os vários pré-processamentos mencionados, assim como os diferentes intervalos, de modo a desenvolver um modelo viável para determinação das concentrações de n-alcenos e LCOH das amostras selecionadas. A construção do modelo de calibração foi desenvolvida com recurso ao método de regressão multivariada PLS. Este processo foi aplicado para reduzir os dados espectrais a

fatores latentes e ocorre até que o erro mínimo entre os dados experimentais e a resposta prevista seja alcançado. Dado que este se trata de um processo iterativo, as regressões levadas a cabo podem ser direcionadas para uma variável dependente, levando à extração de fatores correlacionados com a mesma, cujos valores foram previamente introduzidas no conjunto de calibração (Wold *et al.*, 2001). A grande vantagem do uso deste método é a sua robustez, que permite que os parâmetros do modelo não se alterem de maneira significativa quando novas amostras são acrescentadas ou retiradas ao conjunto de calibração (Geladi & Kowalski, 1986).

Inicialmente foram introduzidos os valores de referência dos n-alcenos e LCOH no programa Omnic em cada espectro de cada animal ou alimento. Em testes preliminares foi avaliado o uso da subtração de *baseline*, mas devido ao fraco desempenho observado, na calibração foram usados espectros sem subtração de *baseline*, e os três espectros com maior similaridade entre si, para cada amostra.

Para a escolha do método de seleção foram tidos em conta os melhores valores de R^2 e os menores valores de RMSEP (entre a utilização do espectro e da derivada) das concentrações previstas dos n-alcenos e LCOH, nas várias regiões pré-definidas de NIR e ATR. Todos os testes anteriores levados a cabo foram também aplicados aos dados espectrais provenientes do pré-processamento dos espectros com SNV. O RMSEP e o R^2 de validação externa foram usados para analisar e aferir quais os melhores modelos construídos.

3.4. Validação de modelos analíticos

Para otimização dos modelos PLS é realizada uma validação interna (*cross validation* ou *leave-one-out*), onde uma amostra é removida do conjunto de dados e um modelo de calibração desenvolvido para o subconjunto que sobra, sendo utilizado para aferir e prever o valor do parâmetro em causa para a amostra excluída. Este processo é realizado até que todas as amostras tenham sido removidas pelo menos uma vez do conjunto de calibração para a validação (Wold *et al.*, 2001). Deste processo foi extraído o RMSEP.

Uma vez construídos os modelos de calibração, foi testada a sua capacidade preditiva e *performance* para as condições nas quais será aplicado, e para tal, os espectros recolhidos foram utilizados para a construção de conjuntos de dados maiores a serem usados para procedimentos de validação externa, onde se utiliza um *set* externo de amostras (1/3) para proceder à validação dos modelos ótimos já conseguidos, e 2/3 das amostras para calibração (conjunto de *training* para re-calibrar os modelos para previsão dos valores para as amostras do conjunto externo de validação).

Tanto no NIR como no MIR foram escolhidos aleatoriamente 184 espectros para calibração e 92 para validação referentes aos equinos, em relação aos bovinos, 182 para calibração e 93 para validação, nos alimentos foram utilizados 66 espectros para calibrar e 33 para validar (estas quantidades englobam os espectros em triplicado).

As amostras de fezes e alimentos usadas na validação foram analisadas nas mesmas condições das utilizadas no conjunto de calibração. Após a recolha dos espectros, foram calculados, a partir dos modelos de calibração, os valores previstos para as amostras do conjunto externo de validação. O R^2 entre os valores analíticos previamente observados para as amostras de calibração, e os valores previstos através dos modelos calibrados para amostras de um *set* externo, foi usado para analisar a capacidade do modelo de prever valores para amostras fora do conjunto de calibração, no que diz respeito aos parâmetros em causa (n-alcanos e LCOH).

4. Resultados e Discussão

4.1. Valores analíticos

As concentrações em LCOH e n-alcanos determinadas anteriormente por métodos químicos apresentam-se nos Quadros 1, 2 e 3. Em média, as concentrações de LCOH revelaram-se, tanto nas amostras vegetais como fecais, mais elevadas comparativamente às concentrações de n-alcanos. Estes resultados são consistentes com os reportados por Bugalho *et al.* (2004), onde afirmam que os LCOH podem ser frequentemente encontrados em maiores concentrações que os n-alcanos. A destacar temos o LCOH O26, com concentrações médias entre amostras utilizadas, de 1139,29 mg/kg MS em amostras vegetais e 4451,9 vs. 3484,1 mg/kg MS em amostras fecais de bovinos e equinos, respetivamente. Este LCOH aparece em elevadas quantidades principalmente em gramíneas (Ferreira *et al.*, 2017). No entanto, alguns valores de n-alcanos apresentam também concentrações elevadas principalmente os n-alcanos de cadeia ímpar C29, C31 e C33, tanto em amostras vegetais como fecais, sendo tal facto reportado por Ferreira *et al.* (2007; 2017) e Dove & Mayes (2005).

Quadro 1 – Concentrações (mg/kg MS) em LCOH e n-alcenos nos alimentos utilizados neste estudo provenientes de uma pastagem de montanha.

Parâmetros	Min	Máx	Média	DP
O20	12,90	188,96	64,50	124,49
O22	31,20	675,34	184,14	455,48
O24	51,53	495,84	179,53	314,17
O26	96,03	4436,75	1139,29	3069,35
O28	53,32	395,28	191,69	241,80
O30	42,89	1420,05	335,59	973,80
C25	3,36	46,61	13,91	30,58
C26	0,00	6,93	3,11	4,90
C27	14,35	64,77	32,75	35,65
C28	3,78	70,38	11,60	47,09
C29	54,06	344,55	135,22	205,41
C30	4,54	45,39	18,74	28,89
C31	70,72	1141,14	396,45	756,90
C32	3,16	76,60	22,01	51,93
C33	3,44	593,70	160,25	417,38

Quadro 2 – Concentrações (mg/kg MS) em LCOH e n-alcenos nas fezes de bovinos em pastoreio em áreas de montanha.

Parâmetros	Min	Máx	Média	DP
O20	8,88	131,72	53,51	86,86
O22	113,43	473,28	197,94	254,45
O24	187,53	397,79	273,89	148,68
O26	2275,83	7202,05	4451,9	3483,36
O28	388,99	946,64	605,18	394,32
O30	298,11	4180,75	1265,34	2745,44
C25	14,69	69,90	32,32	39,04
C26	0,00	13,51	5,57	9,55
C27	22,72	120,40	58,26	69,07
C28	7,34	29,97	15,50	16,00
C29	134,56	561,57	293,76	301,94
C30	13,97	55,28	31,22	29,21
C31	299,66	3242,84	643,22	2081,14
C32	10,72	63,24	26,83	37,14
C33	116,16	442,29	224,79	230,61

Quadro 3 – Concentrações (mg/kg MS) de LCOH e n-alcenos nas fezes de equinos em pastoreio em áreas de montanha.

Parâmetros	Min	Máx	Média	DP
O20	10,66	114,32	54,17	73,30
O22	101,25	315,46	172,35	151,47
O24	154,68	326,92	237,01	121,79
O26	1025,01	6818,47	3484,05	4096,59
O28	251,59	933,66	470,28	482,30
O30	235,14	1555,59	713,28	933,70
C25	10,67	97,91	38,35	61,69
C26	2,29	20,06	5,74	12,57
C27	19,49	136,09	57,99	82,45
C28	7,81	27,52	14,76	13,94
C29	108,24	557,26	249,35	317,51
C30	11,89	49,20	24,65	26,38
C31	239,25	804,65	432,93	399,80
C32	8,99	47,92	15,43	27,53
C33	66,27	364,32	112,76	210,75

4.2. Atribuições Espectrais

Das amostras vegetais e fecais (bovinos e equinos) utilizadas neste trabalho, foram feitas aquisições espectrais tanto no intervalo NIR como em MIR. Estes espectros são apresentados nas Figura 7 e 8, respetivamente.

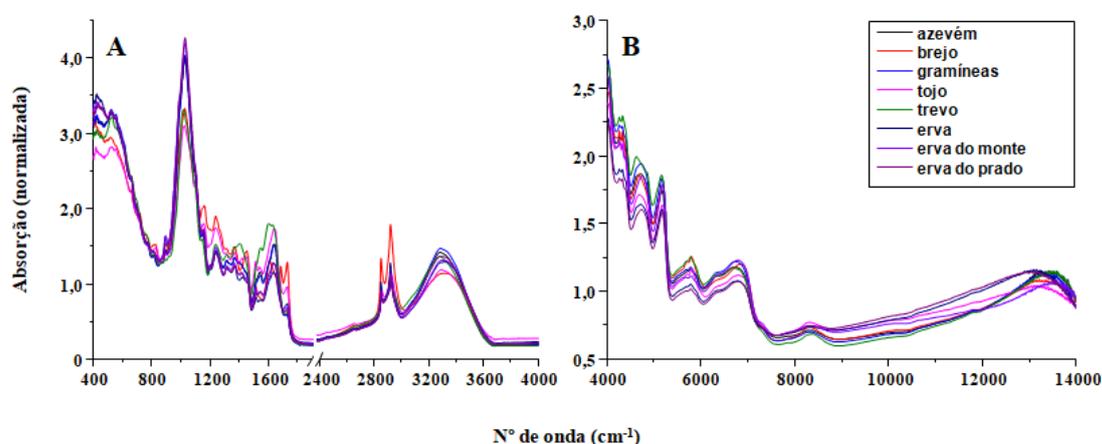


Figura 7-Espectros representativos de alimentos registados nos intervalos MIR (A) e NIR (B).

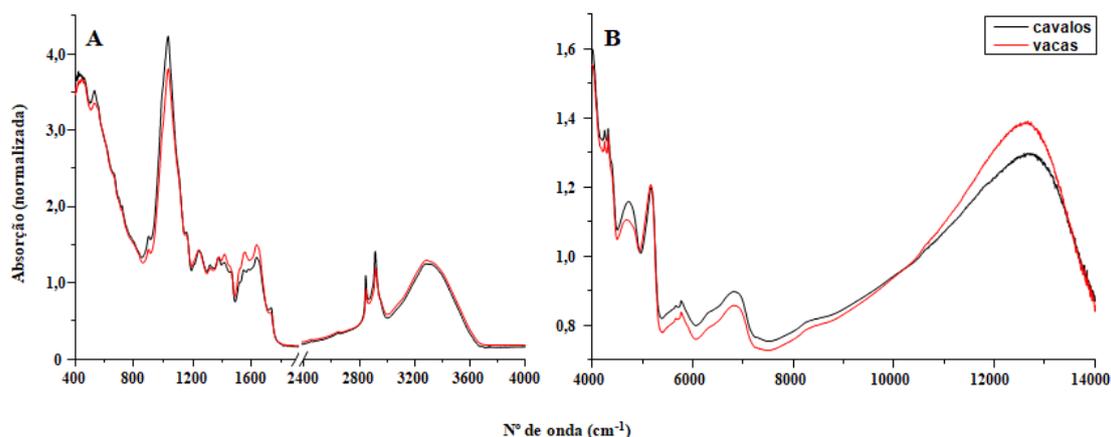


Figura 8-Espectros representativos de fezes de bovinos e equinos registados nos intervalos MIR (A) e NIR (B).

Em relação aos espectros registados no intervalo MIR (Figura 7 e 8 A) é visível uma zona de forte absorção, de 400-850 cm^{-1} , atribuída aos modos roto-vibracionais da água, devido à forte contribuição da mesma (Elton & Fernández-Serra, 2016). Na região de 915-1135 cm^{-1} , encontra-se um pico muito intenso, onde o modo vibracional dominante é o alongamento (C-O). Este pico está relacionado com um grupo funcional presente em diversas moléculas biológicas, tais como proteínas, lípidos, metabolitos secundários e açúcares. Este poderá ser determinante nos modelos para avaliação de LCOH, dados que estes compostos contêm na sua estrutura pelo menos uma ligação (C-O). Neste intervalo, também deve ser considerada a presença de contribuições relacionadas com a celulose (Nogales-Bueno *et al.*, 2017).

No intervalo de 1190-1485 cm^{-1} ocorrem, simultaneamente, vários alongamentos como (C-C), (C-O) acoplados a deformações (CH) e (OH) no plano. Alguns desses alongamentos são associados à presença de n-alcanos, assim como de álcoois. De facto, de acordo Dias (1986), muitos dos modos vibracionais, neste intervalo, contêm distintas contribuições de modos vibracionais correspondentes a diferentes grupos funcionais.

Na região compreendida entre 1480-1760 cm^{-1} , situam-se picos relacionados com os alongamentos (C=C) e (C=O), que no caso deste estudo não tem relação direta com os n-alcanos e LCOH a analisar (Dias, 1986).

Outros dos picos com importância para a determinação de n-alcanos situam-se na região de alta frequência (2800-3000 cm^{-1}), no modo de alongamento (C-H). Este intervalo corresponde maioritariamente a este tipo de compostos, mas também a açúcares. Já o pico

observado na região de 3000-3700 cm^{-1} é atribuído ao modo de alongamento (O-H) referente às moléculas de água, e outros sistemas contendo grupos hidroxilo. Deste modo, os dados obtidos neste intervalo tem interesse na determinação de LCOH (Auer & Skinner, 2008).

Relativamente aos espectros recolhidos pelo NIR (Figuras 7 e 8 B), a atribuição de picos de interesse a grupos funcionais específicos é mais complexa, uma vez que não existe uma associação direta dos picos observados a modos vibracionais específicos. Ainda assim, este intervalo tem revelado sucesso na estimativa de n-alcenos e LCOH, uma vez que se conseguem calibrações empíricas para a avaliação dos mesmos tirando partido das suas contribuições para os espectros. Estes podem ser também avaliados indiretamente por estarem consistentemente correlacionados com outros constituintes, que podem até ser maioritários (Dixon & Coates, 2009). No que diz respeito à atribuição espectral do intervalo NIR, de 4000-5500 cm^{-1} observam-se modos de combinação, de 5500-7500 cm^{-1} o primeiro *sobretono* (correspondente ao dobro da frequência do modo fundamental na sua origem), o segundo *sobretono* é dominante de 7500-11000 cm^{-1} , e o terceiro de 11000-14000 cm^{-1} . Todos eles correspondem a múltiplos das frequências dos modos vibracionais fundamentais. No entanto, a sobreposição em cada intervalo de *sobretons* de níveis diferentes, corresponde a distintos modos fundamentais e impede a atribuição destes picos espectrais a grupos fundamentais específicos (Xiaobo *et al.*, 2010).

4.3. Equações de calibração

4.3.1. Previsão de parâmetros para amostras vegetais

Para o intervalo NIR, os melhores resultados de calibração para os alimentos foram os obtidos com o pré-tratamento dos espectros com SNV no desvio-padrão de 4000-9000 cm^{-1} com tendência para a derivada neste intervalo. Relativamente às calibrações criadas para os alimentos utilizados no estudo com recurso ao espectro NIR (Quadro 4), os dados obtidos apresentaram para os LCOH coeficientes de determinação para a validação cruzada (R^2_{cv}) acima de 0,77. Nos n-alcenos obtiveram-se valores para o mesmo coeficiente acima de 0,71, com tendência para estes serem mais elevados para os n-alcenos de cadeia ímpar de mais elevadas concentrações, nomeadamente os C31 e C33. O valor de previsão mais baixo verificou-se para o n-alceno C28, que apresentou um R^2_{cv} e coeficiente de determinação de validação externa (R^2_v) de 0,03. O erro de previsão (RMSEP) associado a este n-alceno foi também o mais elevado (93,1%). Este facto pode ficar a dever-se à estrutura não linear deste

n-alcano correspondente a um espectro específico coincidente com o das matrizes utilizadas (alimentos) sofrendo, assim, maior efeito de interferência das mesmas (Dias, 1986; Luttschwager *et al.*, 2013). Isto verifica-se na forte absorção na região de 2850-3000 cm^{-1} observada para este composto, e correspondente ao alongamento (C-H). Aqui, o n-alcano C28 pode estar a ser “camuflado” por todos os outros picos sobrepostos nesta região. Picos referentes a outros n-alcenos medidos e outros compostos presentes nas matrizes, fazendo com que os modelos para a determinação deste n-alceno não tenham qualidade suficiente (Dias, 1986; NIST, 2018).

De forma a avaliar a qualidade dos modelos desenvolvidos no presente trabalho, estes foram comparados com os resultados obtidos por Ru *et al.* (2002), utilizando os R^2_{cv} . Neste trabalho avaliaram-se apenas concentrações em n-alcenos, tanto em pastagens como em fezes de veados. Nas calibrações desenvolvidas no NIR para as pastagens (à base de azevém e luzerna), estes autores obtiveram, em geral, coeficientes de determinação ligeiramente mais elevados ($R^2_{cv} \geq 0,79$), comparativamente aos obtidos no presente estudo. Este facto pode estar diretamente relacionado com o número superior (119) de amostras vegetais utilizadas por estes autores. Para além disso também se observou uma tendência para os valores de R^2_{cv} serem mais elevados nos n-alcenos de cadeia ímpar (C31 e C33) que estavam presentes em maiores concentrações. Estes resultados são consistentes com os observados no presente estudo, em que se verificaram, tal como referido anteriormente, R^2_{cv} mais elevados para os n-alcenos presentes em concentrações mais elevadas nas espécies vegetais. No entanto, é de referir que a mesma relação (maior concentração/maior precisão) não foi observada para os LCOH. De facto, o menor R^2_{cv} (0,77) foi observado no LCOH com concentração mais elevada (O26). Uma das possíveis explicações para este facto, poderá ser a grande variabilidade das concentrações deste LCOH nas amostras que foram utilizadas para o *set* de calibração das equações. De facto, embora o valor médio de concentração seja elevado (1139,3 mg/kg MS), as concentrações variaram entre um mínimo de 96,0 e 4436,8 mg/kg MS.

Quadro 4 – Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras vegetais obtidos pelo NIR.

	Calibração			Validação Cruzada			Validação externa
	Coef. Det.	RMSEC		Coef. Det.	RMSEP		Coef. Det.
	R^2_c	Erro	% Erro	R^2_{cv}	Erro	% Erro	R^2_v
O20	0,89	16,80	26,00	0,90	16,40	25,40	0,90
O22	0,92	56,60	30,70	0,92	54,40	29,50	0,92
O24	0,90	37,00	20,60	0,90	36,60	20,40	0,90
O26	0,78	569,00	49,90	0,77	573,00	50,30	0,77
O28	0,93	26,00	13,60	0,91	29,50	15,40	0,91
O30	0,99	41,20	12,30	0,97	60,80	18,10	0,97
C25	0,89	2,60	18,60	0,90	3,70	26,20	0,90
C26	0,87	0,70	21,00	0,88	0,70	21,70	0,88
C27	0,94	3,70	11,30	0,87	5,90	17,90	0,87
C28	0,04	11,70	100,90	0,03	10,80	93,10	0,03
C29	0,77	36,90	27,30	0,78	33,40	24,70	0,78
C30	0,85	4,90	25,90	0,71	7,20	38,20	0,71
C31	0,97	66,90	16,90	0,97	65,70	16,60	0,97
C32	0,98	3,50	15,90	0,98	3,50	16,00	0,98
C33	0,98	29,60	18,50	0,98	29,70	18,50	0,98

R^2_c – Coeficiente de determinação de calibração; R^2_{cv} – Coeficiente de determinação de validação cruzada; R^2_v – Coeficiente de determinação de validação externa; RMSEC – Erro médio quadrático de calibração; RMSEP – Erro médio quadrático de previsão

Para o intervalo MIR, o processo que deu origem a calibrações com melhor qualidade para a previsão dos compostos foi a utilização da primeira derivada como pré-tratamento. Esta apresentou melhores resultados quando somente utilizada a região de baixa frequência (770-1800 cm^{-1}). As calibrações desenvolvidas neste intervalo, registado através do ATR (Quadro 5), apresentaram na generalidade valores de R^2_{cv} mais baixos que os obtidos através do NIR (0,71 vs. 0,83, respetivamente) tanto para os n-alcenos (0,61 vs. 0,79, respetivamente) como para os LCOH (0,86 vs. 0,90, respetivamente). Uma vez que no ATR é utilizada uma menor quantidade de amostra a ser analisada, este fator tem como desvantagem a obtenção de menor visibilidade da mesma quando o feixe de luz a atravessa, podendo estar desta maneira a “camuflar” os resultados obtidos (Dias, 1986). Desta forma pode resultar numa menor reprodutibilidade e consequentemente resultados menos bons. Isto, também poderá dever-se ao efeito de matriz (maior heterogeneidade física das amostras).

A relação observada anteriormente para o NIR, entre concentração do composto e a precisão da sua estimativa, foi também observada para o intervalo MIR. De facto, para os LCOH os valores de R^2_{cv} mais elevados, foram observados para os LCOH O26, O28 e O30 (a variar entre 0,85 e 0,90) cujas concentrações são as mais elevadas. Da mesma forma, a precisão mais elevada foi observada para os n-alcenos C31 ($R^2_{cv}=0,90$) e C33 ($R^2_{cv}=0,93$),

que apresentaram as concentrações mais elevadas (396,5 e 160,3 mg/kg MS, respetivamente). No entanto, é de salientar que esta relação entre concentração do composto e a precisão da sua estimativa não se constitui como uma “regra”. De facto, num estudo realizado por Ru *et al.* (2002), o n-alcano C35 com concentração média de 4,30 mg/kg MS foi um dos n-alcenos que apresentaram um R^2_{cv} mais elevado (0,89).

Quadro 5 – Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras vegetais obtidos pelo MIR.

	Calibração			Validação Cruzada			Validação externa
	Coef. Det.	RMSEC		Coef. Det.	RMSEP		Coef. Det.
	R^2_c	Erro	% Erro	R^2_{cv}	Erro	% Erro	R^2_v
O20	0,67	29,10	45,10	0,87	19,40	30,10	0,87
O22	0,69	109,00	59,20	0,87	74,10	40,20	0,87
O24	0,63	68,60	38,20	0,83	48,70	27,10	0,83
O26	0,96	246,00	21,60	0,90	366,00	32,10	0,91
O28	0,92	27,90	14,60	0,85	38,70	20,20	0,85
O30	0,89	116,00	34,60	0,87	124,00	36,90	0,87
C25	0,15	8,10	57,90	0,12	8,20	58,80	0,12
C26	0,93	0,50	15,30	0,74	1,00	32,10	0,73
C27	0,30	12,70	38,80	0,31	13,00	39,70	0,31
C28	0,31	9,70	83,70	0,26	9,70	83,90	0,26
C29	0,57	48,10	35,60	0,58	50,50	37,30	0,58
C30	0,69	7,10	37,90	0,73	6,70	35,60	0,73
C31	0,79	165,00	41,60	0,90	122,00	30,80	0,90
C32	0,80	11,90	54,10	0,92	8,30	37,60	0,92
C33	0,79	93,50	58,30	0,93	60,30	37,60	0,93

R^2_c – Coeficiente de determinação de calibração; R^2_{cv} – Coeficiente de determinação de validação cruzada; R^2_v – Coeficiente de determinação de validação externa; RMSEC – Erro médio quadrático de calibração; RMSEP – Erro médio quadrático de previsão

4.3.2. Previsão de parâmetros para amostras fecais

Os resultados das equações de calibração NIR referentes aos n-alcenos e LCOH nas fezes de bovinos e equinos estão apresentados nos Quadros 6 e 7, respetivamente. Para este intervalo e para ambas as espécies animais, os melhores resultados foram obtidos através do pré-tratamento dos espectros com a 1ª derivada, em particular no intervalo de 4000-9000 cm^{-1} . Os resultados indicam previsões na validação externa (R^2_v) similares para as duas espécies (0,64). Para além disso, não se observou uma tendência para a superioridade dos valores de R^2_v de um tipo de marcador em relação ao outro (n-alcenos e LCOH) entre as espécies animais. De facto, os valores médios de R^2_v obtidos para os n-alcenos foram 0,67 vs. 0,65 e

para os LCOH 0,60 vs. 0,62, para as fezes de bovinos e de equinos, respetivamente. Nos LCOH, os valores de R^2v mais elevados foram observados para os LCOH O26 (0,92 vs. 0,90), O28 (0,64 vs. 0,83) e O30 (0,85 vs. 0,72), nas fezes bovinos e equinos, respetivamente, sendo estes os LCOH que apresentaram as concentrações mais elevadas nas amostras (Quadro 2). Da mesma forma, os valores de R^2v mais elevados para os n-alcenos no intervalo NIR foram, em geral, observados para o C25 (0,90 vs. 0,90), C27 (0,89 vs. 0,85), C29 (0,90 vs. 0,91), em geral presentes em concentrações elevadas. No entanto, é de referir que a mesma tendência não se observou para os n-alcenos C31 (0,20 vs. 0,88) e C33 (0,90 vs. 0,68), nas fezes bovinos e equinos, respetivamente. Apesar destes n-alcenos apresentarem elevadas concentrações (643,22 e 112,8 mg/kg MS), não foi possível uma boa previsão. Este facto pode ser devido ao elevado RMSEP associado (45,6%) à sua previsão. Uma outra possibilidade poderá ser a coincidência dos espectros destes compostos com as matrizes, podendo estar a sofrer as interferências das mesmas (Dias, 1986).

Quadro 6 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de bovinos obtidos pelo NIR.

	Calibração			Validação Cruzada			Validação externa
	Coef. Det.	RMSEC		Coef. Det.	RMSEP		Coef. Det.
	R^2c	Erro	% Erro	R^2cv	Erro	% Erro	R^2v
O20	0,64	20,00	37,40	0,37	23,90	44,70	0,35
O22	0,50	60,70	30,70	0,42	56,40	28,50	0,60
O24	0,54	35,80	13,10	0,21	44,20	16,10	0,25
O26	0,97	266,00	6,00	0,93	399,00	9,00	0,92
O28	0,79	64,20	10,60	0,70	81,80	13,50	0,64
O30	0,91	249,00	19,70	0,85	331,00	26,20	0,85
C25	0,95	3,30	10,10	0,91	5,10	15,80	0,90
C26	0,13	1,90	34,60	0,08	1,90	33,80	0,06
C27	0,93	6,60	11,30	0,90	8,50	14,60	0,89
C28	0,41	4,00	25,70	0,57	3,50	22,60	0,60
C29	0,95	23,60	8,00	0,90	38,70	13,20	0,90
C30	0,90	2,90	9,20	0,84	3,20	10,10	0,81
C31	0,14	298,00	46,30	0,14	293,00	45,60	0,20
C32	0,66	7,40	27,50	0,56	7,70	28,70	0,77
C33	0,94	19,10	8,50	0,91	22,90	10,20	0,90

R^2c – Coeficiente de determinação de calibração; R^2cv – Coeficiente de determinação de validação cruzada; R^2v – Coeficiente de determinação de validação externa; RMSEC – Erro médio quadrático de calibração; RMSEP – Erro médio quadrático de previsão

Quadro 7 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de equinos obtidos pelo NIR.

	Calibração			Validação Cruzada			Validação externa
	Coef. Det.	RMSEC		Coef. Det.	RMSEP		Coef. Det.
	R^2c	Erro	% Erro	R^2cv	Erro	% Erro	R^2v
O20	0,49	22,10	40,80	0,38	22,60	41,70	0,38
O22	0,64	28,00	16,20	0,24	38,50	22,30	0,24
O24	0,75	21,30	9,00	0,63	24,10	10,20	0,63
O26	0,93	389,00	11,20	0,90	467,00	13,40	0,90
O28	0,87	51,80	11,00	0,83	54,80	11,70	0,83
O30	0,90	102,00	14,30	0,72	187,00	26,20	0,72
C25	0,93	6,70	17,40	0,90	8,30	21,70	0,90
C26	0,49	2,20	38,70	0,29	2,40	41,80	0,29
C27	0,87	11,00	19,00	0,84	12,40	21,40	0,85
C28	0,69	2,70	18,20	0,43	3,80	26,00	0,43
C29	0,93	36,60	14,70	0,91	42,80	17,20	0,91
C30	0,76	3,60	14,60	0,74	4,30	17,30	0,74
C31	0,83	52,40	12,10	0,88	49,60	11,50	0,88
C32	0,17	5,00	32,10	0,18	3,30	21,50	0,18
C33	0,41	30,70	27,20	0,68	14,00	12,40	0,68

R^2c – Coeficiente de determinação de calibração; R^2cv – Coeficiente de determinação de validação cruzada; R^2v – Coeficiente de determinação de validação externa; RMSEC – Erro médio quadrático de calibração; RMSEP – Erro médio quadrático de previsão

Tal como o referido anteriormente para o intervalo NIR, os modelos MIR para os quais se observaram os melhores resultados para a avaliação das concentrações de n-alcenos e LCOH, foram os desenvolvidos com recurso à utilização da primeira derivada dos dados espectrais, essencialmente na região de baixa frequência (770-1800 cm^{-1}). Nos Quadros 8 e 9 são apresentados os resultados das equações de calibração MIR referentes à determinação das concentrações de n-alcenos e LCOH nas fezes de bovinos e equinos, respetivamente. Os resultados obtidos indicam diferenças de R^2v para as amostras fecais de bovinos (0,70) e equinos (0,57). Estas diferenças podem ficar a dever-se ao diferente tipo de matriz. De facto, a maior homogeneidade das amostras de fezes de bovino relativamente às de equino facilitam a leitura dos seus espectros neste modo de aquisição. De acordo com Dias (1986), a radiação utilizada no intervalo MIR é menos penetrante na amostra que a radiação NIR. Deste modo, quanto mais homogénea for a amostra melhor será a determinação dos seus constituintes. Tal facto verifica-se para os n-alcenos (R^2v de 0,69 e 0,53) e os LCOH (R^2v de 0,71 e 0,63) nas fezes de bovinos e equinos, respetivamente.

Para ambas as espécies animais, no intervalo MIR os valores mais elevados de R^2v foram observados para os n-alcenos de cadeia ímpar que apresentaram concentrações mais

elevadas, designadamente o C25 (0,88 vs. 0,88 para fezes de bovinos e equinos, respetivamente), o C27 (0,90 vs. 0,82 para fezes de bovinos e equinos, respetivamente) e o C29 (0,90 vs. 0,92 para fezes de bovinos e equinos, respetivamente). No entanto, tal como observado para o intervalo NIR, o R^2v observado para os outros n-alcenos presentes em elevadas concentrações (i.e. C31 e C33) foi relativamente baixo e variou com a espécie animal. De facto, os valores de R^2v para os n-alcenos C31 e C33 nas fezes de bovinos foram de 0,19 e 0,83, respetivamente, e, pelo contrário, para as fezes de equinos foram de 0,76 e 0,29, respetivamente. Tal como referimos anteriormente para o intervalo NIR, esta menor precisão poderá resultar da coincidência dos espectros destes compostos com as matrizes, podendo estar a sofrer as interferências das mesmas (Dias, 1986). À semelhança do observado para a generalidade dos n-alcenos, os valores mais elevados de R^2v foram observados para os LCOH que apresentavam concentrações mais elevadas, nomeadamente o O26 (0,90 vs. 0,85), o O28 (0,86 vs. 0,80) e O30 (0,95 vs. 0,73) para fezes de bovinos e equinos, respetivamente.

Quadro 8 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de bovinos obtidos pelo MIR.

	Calibração			Validação Cruzada			Validação externa
	Coef. Det.	RMSEC		Coef. Det.	RMSEP		Coef. Det.
	R^2c	Erro	% Erro	R^2cv	Erro	% Erro	R^2v
O20	0,61	19,90	37,20	0,48	21,50	40,20	0,48
O22	0,56	51,00	25,80	0,60	46,50	23,50	0,60
O24	0,55	28,10	10,30	0,46	30,60	11,20	0,46
O26	0,93	366,00	8,20	0,90	436,00	9,80	0,90
O28	0,89	43,40	7,20	0,86	47,40	7,80	0,86
O30	0,94	199,00	15,70	0,95	190,00	15,00	0,95
C25	0,91	4,60	14,20	0,88	5,00	15,40	0,88
C26	0,28	1,70	30,20	0,23	1,70	29,60	0,23
C27	0,92	7,50	12,90	0,90	8,20	14,10	0,90
C28	0,65	3,10	19,70	0,66	2,80	18,10	0,66
C29	0,90	34,30	11,70	0,90	35,00	11,90	0,90
C30	0,89	2,70	8,60	0,78	3,80	12,20	0,78
C31	0,19	279,00	43,40	0,19	282,00	43,80	0,19
C32	0,84	4,60	17,30	0,82	5,10	18,90	0,82
C33	0,84	29,20	13,00	0,83	30,30	13,50	0,83

R^2c – Coeficiente de determinação de calibração; R^2cv – Coeficiente de determinação de validação cruzada; R^2v – Coeficiente de determinação de validação externa; RMSEC – Erro médio quadrático de calibração; RMSEP – Erro médio quadrático de previsão

Quadro 9 - Coeficientes de determinação e erros associados a valores previstos de concentrações de n-alcenos e LCOH em amostras fecais de equinos obtidos pelo MIR.

	Calibração			Validação Cruzada			Validação externa
	Coef. Det.	RMSEC		Coef. Det.	RMSEP		Coef. Det.
	R^2c	Erro	% Erro	R^2cv	Erro	% Erro	R^2v
O20	0,31	22,40	41,40	0,36	22,60	41,70	0,36
O22	0,58	29,00	16,80	0,37	38,20	22,20	0,37
O24	0,75	21,80	9,20	0,59	24,00	10,10	0,59
O26	0,86	562,00	16,10	0,85	596,00	17,10	0,85
O28	0,84	55,30	11,80	0,86	54,90	11,70	0,86
O30	0,77	160,00	22,40	0,73	186,00	26,10	0,73
C25	0,93	7,00	18,20	0,88	8,70	22,60	0,88
C26	0,26	2,40	42,00	0,24	3,30	57,30	0,24
C27	0,88	10,80	18,60	0,82	12,80	22,10	0,82
C28	0,44	3,50	23,40	0,39	4,20	28,30	0,39
C29	0,95	29,60	11,90	0,92	38,10	15,30	0,92
C30	0,69	4,30	17,60	0,50	5,20	21,10	0,50
C31	0,84	53,50	12,40	0,76	61,40	14,20	0,76
C32	0,06	4,70	30,70	0,01	4,90	31,80	0,01
C33	0,34	28,90	25,60	0,29	30,10	26,70	0,29

R^2c – Coeficiente de determinação de calibração; R^2cv – Coeficiente de determinação de validação cruzada; R^2v – Coeficiente de determinação de validação externa; RMSEC – Erro médio quadrático de calibração; RMSEP – Erro médio quadrático de previsão

Nos estudos de Ru *et al.* (2002) e Keli *et al.* (2008) é notória a tendência para os n-alcenos de cadeia ímpar apresentarem melhores valores de R^2c e posteriormente R^2cv , uma vez que apresentam maiores concentrações nas amostras. Estes resultados foram consistentes com os obtidos neste presente trabalho. Apesar dos autores não utilizarem um *set* de amostras externas para validar o modelo, é possível comparar os seus valores de validação interna (R^2cv) com os obtidos pelo nosso trabalho. Ru *et al.* (2002) obteve um R^2cv para os n-alcenos C25, C27 e C29 de 0,90 e Keli *et al.* (2008), para os mesmos constituintes um R^2cv de 0,92. No presente trabalho os valores de R^2cv que obtivemos foram similares para os mesmos marcadores, 0,90 e 0,89 nas fezes de vacas no intervalo NIR vs. MIR, respetivamente e 0,88 e 0,87 nas fezes de cavalos no intervalo NIR vs. MIR, respetivamente. Apesar de termos utilizado um *set* de amostras externo para validar os modelos, as diferenças que obtivemos entre os R^2cv e R^2v não foram consideráveis.

5. Conclusões

A técnica FTIR é uma técnica versátil que permite avaliar vários parâmetros químicos e nutricionais de dietas, através de diferentes matrizes (alimentos e fezes). É um método simples, preciso, não destrutivo das amostras, de determinação rápida e com um custo significativamente mais baixo que as análises convencionais.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o melhor modelo para prever as concentrações em LCOH e n-alcenos nas amostras vegetais foi o NIR. Apesar de não ter sido possível o desenvolvimento de um modelo de calibração para um n-alceno, o C28, todos os coeficientes de determinação obtidos para um conjunto externo de amostras (R^2_v), revelaram ser bastante promissores, com valores a variar entre os 0,71 e 0,98.

Comparando técnicas (MIR/NIR), observámos que o seu desempenho variou com as matrizes utilizadas (amostras fecais de bovinos vs. equinos). Para as amostras fecais de bovinos, as melhores estimativas para as concentrações de n-alcenos e LCOH foram registadas no intervalo MIR, possivelmente devido ao facto da matriz ser mais homogénea. Já para o intervalo NIR, não se observou o efeito da matriz, sendo o valor de R^2_v médio destes marcadores igual nas duas matrizes. Em geral, houve uma tendência para as melhores estimativas obtidas pelas duas técnicas serem observadas nos LCOH O26, O28 e O30, e nos n-alcenos de cadeia ímpar C25, C27, C29, C31 e C33, que nas amostras apresentavam as concentrações mais elevadas.

Com base nos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que a seleção da técnica a utilizar poderá depender do tipo de matriz, sendo a homogeneidade física das matrizes um dos fatores mais importantes para o seu sucesso. No entanto, de modo a melhorar a precisão e robustez dos modelos criados para as estimativas das concentrações destes marcadores, terá de ser aumentada a base de dados (maior variabilidade de amostras) usada para as calibrações destes modelos.

6. Bibliografia

- Andueza, D., Picard, F., Jestin, M., Andrieu, J., & Baumont, R. (2011). NIRS prediction of the feed value of temperate forages: Efficacy of four calibration strategies. *Animal*, 5, 1002–1013. <http://doi.org/10.1017/S1751731110002697>
- Antunes, E., Ferreira, P., Rasteiro, M. G., & Garcia, F. A. P. (2010). Evaluation of polyelectrolyte performance on PCC flocculation using the LDS technique. *Particulate Science and Technology*, 28(5), 426–441. <http://doi.org/10.1080/02726351.2010.504128>
- Arnold, S. A., Harvey, L. M., McNeil, B., & Hall, J. W. (2002). Employing Near-Infrared Spectroscopic Methods of Analysis for Fermentation Monitoring and Control. *BioPharm International*, 26–34. Disponível em <https://pdfs.semanticscholar.org/4753/176f47f6190f24359c67b881f04212071ba4.pdf>
- Auer, B. M., & Skinner, J. L. (2008). IR and Raman spectra of liquid water: Theory and interpretation. *Journal of Chemical Physics*, 128(22), 1–12. <http://doi.org/10.1063/1.2925258>
- Aufrère, J., Graviou, D., Demarquilly, C., Perez, J. M., & Andrieu, J. (1996). Near infrared reflectance spectroscopy to predict energy value of compound feeds for swine and ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 62, 77–90. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)00995-9](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)00995-9)
- Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., & De La Pezuela, C. (1997). Calibration in near infrared diffuse reflectance spectroscopy. A comparative study of various methods. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 5, 67–75. <http://doi.org/10.1255/jnirs.100>
- Blanco, M., & Villarroya, I. (2002). NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 21, 240–250. [http://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](http://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)
- Bugalho, M. N., Dove, H., Kelman, W., Wood, J. T., Mayes, R. W., Bugalho, M. N., ... Mayes, R. W. (2004). Plant wax alkanes and alcohols as herbivore diet composition markers. *Journal of Range Management*, 57(3), 259–268. Disponível em <https://journals.uair.arizona.edu/index.php/jrm/article/viewFile/12429/11708>
- Celaya, R., Oliván, M., Ferreira, L. M. M., Martínez, A., García, U., & Osoro, K. (2007). Comparison of grazing behaviour, dietary overlap and performance in non-lactating domestic ruminants grazing on marginal heathland areas. *Livestock Science*, 106, 271–281. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.08.013>
- Chalmers, J. M., & Mackenzie, M. W. (1985). Some Industrial Applications of FT-IR Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 39, 634–641. <http://doi.org/10.1366/0003702854250329>
- Cleland, J. D., Johnson, E., Morel, P. C. H., Kenyon, P. R., & Waterland, M. R. (2018). Mid-infrared reflectance spectroscopy as a tool for forage feed composition prediction. *Animal Feed Science and Technology*, 241(April), 102–111. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.04.022>

- Coleman, P. B. (1993). Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis. *Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis*, 320. Disponível em http://books.google.com/books?id=JY_H61INJqMC&pgis=1
- De Luca, M., Terouzi, W., Ioele, G., Kzaiber, F., Oussama, A., Oliverio, F., ... Ragno, G. (2011). Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils. *Food Chemistry*, 124, 1113–1118. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.010>
- Decruyenaere, V. (2015). Estimation of diet digestibility and intake by grazing ruminants through near infrared reflectance spectroscopy analysis of faeces. Application in various contexts of livestock production. Université de Liège. Disponível em <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/189025/1/phD%20VDecruyenaere-final-20151209.pdf>
- Decruyenaere, V., Lecomte, P., Demarquilly, C., Aufrere, J., Dardenne, P., Stilmant, D., & Buldgen, A. (2009). Evaluation of green forage intake and digestibility in ruminants using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Developing a global calibration. *Animal Feed Science and Technology*, 148, 138–156. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.03.007>
- Dias, J. J. C. T. (1986). *Espectrosocopia Molecular: Fundamentos, Métodos e Aplicações*, 1-162. (F. C. Gulbenkian, Ed.).
- Dixon, R., & Coates, D. (2009). Review: Near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17, 1-31. <http://doi.org/10.1255/jnirs.822>
- Dove, H; Mayes, R. W. (1996). Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *The Journal of Nutrition*, 126(1), 13–26. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1108/17506200710779521>
- Dove, H., & Charmley, E. (2008). Using the alkanes and long-chain alcohols of plant cuticular wax to estimate diet composition and the intakes of mixed forages in sheep consuming a known amount of alkane-labelled supplement. *Animal*, 1474–1485. <http://doi.org/10.1017/S1751731108002735>
- Dove, H., & Mayes, R. W. (2005). Using n-alkanes and other plant wax components to estimate intake, digestibility and diet composition of grazing/browsing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 59, 123–139. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.016>
- Dove, H., & Mayes, R. W. (2006). Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. *Nature Protocols*, 1(May), 1680–1697. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.225>
- Elton, D. C., & Fernández-Serra, M. (2016). The hydrogen-bond network of water supports propagating optical phonon-like modes. *Nature Communications*, 7, 1–8. <http://doi.org/10.1038/ncomms10193>
- Ferreira, L. M. M., Celaya, R., Falco, V., Oliván, M., Santos, A. S., Guedes, C., ... Osoro, K.

- (2010). Evaluation of very long-chain fatty acids and n -alkane epicuticular compounds as markers for estimating diet composition of sheep fed heathland vegetation species. *Animal Feed Science and Technology*, 156, 75–88. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.01.007>
- Ferreira, L. M. M., Celaya, R., Santos, A. S., Osoro, K., & Rodrigues, M. (2017). Utilization of Biomarkers to Study the Grazing Behavior of Herbivore Species. *InTech*, 61–87. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/67345>
- Ferreira, L. M. M., Garcia, U., Rodrigues, M. A. M., Celaya, R., Dias-da-Silva, A., & Osoro, K. (2007). The application of the n-alkane technique for estimating the composition of diets consumed by equines and cattle feeding on upland vegetation communities. *Animal Feed Science and Technology*, 138(1), 47–60. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.11.007>
- Gaffney, J. S., Marley, N. a., & Jones, D. E. (2012). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Characterization of Materials*, 1104–1135. <http://doi.org/10.1002/0471266965>
- Gallignani, M., & Brunetto, M. D. R. (2004). Infrared detection in flow analysis - Developments and trends (review). *Talanta*, 64, 1127–1146. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.06.035>
- Geladi, P., & Kowalski, B. R. (1986). Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 186, 1-17. Disponível em <http://home.mit.bme.hu/~horvath/IDA/1-s2.0-0003267086800289-main.pdf>
- Givens, D. I., Boever, J. L. De, & Deaville, E. R. (1997). The principles , practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutrition Research Review*, 10(1), 83-114. <https://doi.org/10.1079/NRR19970006>
- Gottlieb, D. M., Schultz, J., Bruun, S. W., Jacobsen, S., & Søndergaard, I. (2004). Multivariate approaches in plant science. *Phytochemistry*, 65, 1531-1548. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.008>
- Gowen, A. A., Downey, G., Esquerre, C., & O'Donnell, C. P. (2011). Preventing over-fitting in PLS calibration models of near-infrared (NIR) spectroscopy data using regression coefficients. *Journal of Chemometrics*, 25(7), 375–381. <http://doi.org/10.1002/cem.1349>
- Hodgson, A. J., Forbes, T. D. A., Armstrong, R. H., Beattie, M. M., Hunter, E. A., Armstrong, R. H., ... Building, M. (1991). Comparative Studies of the Ingestive Behaviour and Herbage Intake of Sheep and Cattle Grazing Indigenous Hill Plant Communities. *Journal of Applied Ecology*, 28(1), 205–227. <http://doi.org/10.2307/2404126>
- Holechek, J. L., Vavra, M., & Pieper, R. D. (1982). Botanical Composition Determination Botanical of Range Herbivore Diets: A Review. *Journal Of Range Management*, 35(3), 309–315.
- Hutchings, N. ., & Gordon, I. . (2001). A dynamic model of herbivore–plant interactions on grasslands. *Ecological Modelling*, 136(2–3), 209–222. <http://doi.org/10.1016/S0304->

- Karoui, R., Downey, G., & Blecker, C. (2010). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: A tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships-A review. *Chemical Reviews*, *110*, 6144–6168. <http://doi.org/10.1021/cr100090k>
- Keli, A., Andueza, D., de Vega, A., & Guada, J. A. (2008). Validation of the n-alkane and NIRS techniques to estimate intake, digestibility and diet composition in sheep fed mixed lucerne: ryegrass diets. *Livestock Science*, *119*, 42–54. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.02.011>
- Kellner, R., Mermet, J.-M., Otto, M., Valacárcel, M., & Widmer, H. M. (2004). *Analytical Chemistry - A Modern Approach to Analytical Science, 2nd Ed. American Journal of Therapeutics*. <http://doi.org/10.1097/01.mjt.0000203907.10428.5a>
- Kwaśniewicz, M., & Czarnecki, M. A. (2018). The Effect of Chain Length on Mid-Infrared and Near-Infrared Spectra of Aliphatic 1-Alcohols. *Applied Spectroscopy*, *72*(2), 288–296. <http://doi.org/10.1177/0003702817732253>
- Labcognition. (2018). Normalize Spectrum. Disponível em https://www.labcognition.com/onlinehelp/en/normalize_spectrum.htm
- Lajunen, L. H. J., & Perämäki, P. (2004). *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission* (2nd Edition). Royal Society of Chemistry. Disponível em books.google.pt/books?hl=ptPT&lr=&id=OG4oDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Lajunen,+L.+H.+J.+Spectrochemical+Analysis+by+Atomic+Absorption+and+Emission,+Royal+Society+of+Chemistry:+Cambridge,+1992.&ots=n6KwODukIV&sig=euTP2xnLDUUt4IAuX0tfDEEWjBY&redir
- Landau, S., Glasser, T., Muklada, H., Dvash, L., Perevolotsky, A., Ungar, E. D., & Walker, J. W. (2005). Fecal NIRS prediction of dietary protein percentage and in vitro dry matter digestibility in diets ingested by goats in Mediterranean scrubland. *Small Ruminant Research*, *59*, 251–263. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.009>
- Landau, S. Y., Dvash, L., Roudman, M., Muklada, H., Barkai, D., Yehuda, Y., & Ungar, E. D. (2015). Faecal near-IR spectroscopy to determine the nutritional value of diets consumed by beef cattle in east Mediterranean rangelands. *Animal*, *10*, 192–202. <http://doi.org/10.1017/S175173111500169X>
- Lavine, B. (2000). Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry By Matthias Otto. *Journal of the American Chemical Society*, *122*(24), 5903–5904. <http://doi.org/10.1021/JA995724T>
- Leung, A. K., Chau, F., & Gao, J. (1998). A review on applications of wavelet transform techniques in chemical analysis: 1989–1997. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *43*, 165–184. [http://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00080-X](http://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00080-X)
- Luttschwager, N. O. B., Wassermann, T. N., Mata, R. A., & Suhm, M. A. (2013). The last globally stable extended alkane. *Angewandte Chemie - International Edition*, *52*(1), 463–466. <http://doi.org/10.1002/anie.201202894>
- Lyons, G., Sharma, S., Aubry, A., Carmichael, E., & Annett, R. (2016). A preliminary

- evaluation of the use of mid infrared spectroscopy to develop calibration equations for determining faecal composition, intake and digestibility in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 44–53. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.014>
- Manne, R. (1987). Analysis of two partial-least-squares algorithms for multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, 187–197. [http://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80096-5](http://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80096-5)
- Marten, C. G., Shenk, J. S., & Barton, F. E. (1989). *Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage* (U.S Depart). *Agriculture Handbook* 643, 1-110. Disponível em <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT89919964/PDF>
- Martens, H., & Geladi, P. (2004). Multivariate Calibration. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. <http://doi.org/10.1002/0471667196.ess1105>
- Martens, H., & Naes, T. (1990). Multivariate calibration. *Journal of Chemometrics* 4, 441–441. <http://doi.org/10.1002/cem.1180040607>
- Mayes, R. W., & Dove, H. (2000). Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutrition Research Reviews*, 13, 107–138. <http://doi.org/10.1079/095442200108729025>
- McCarthy, W. J., & Kemeny, G. J. (2008). Fourier Transform Spectrophotometers in the Near-Infrared. *Handbook of Near-Infrared Analysis* (3ª Edição, Volume 35). D. A. Burns & C. Emil W (Eds.). Disponível em https://books.google.pt/books?id=6EEed1a0uka0C&pg=PA79&hl=pt-PT&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false
- Mills, Richard. (2017). NIR technology for routine analysis of food and agricultural products. Disponível em <https://www.fossanalytics.com/en/nir>
- Mitchell, M. B. (1993). Fundamentals and Applications of Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) Spectroscopy. *Structure-Property Relations in Polymers*, 13, 351–375. <http://doi.org/10.1021/ba-1993-0236.ch013>
- Monteiro, A. da R. D. (2011). Estudo de Aspetos Estatísticos da Espectroscopia na Região do Infravermelho Próximo. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Moorby, J. M., Fraser, M. D., Parveen, I., Lee, M. R. F., & Wold, J. P. (2010). Comparison of 2 high-throughput spectral techniques to predict differences in diet composition of grazing sheep and cattle. *Journal of Animal Science*, 88, 1905–1913. <http://doi.org/10.2527/jas.2009-1944>
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. (2002). *A User Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester UK. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/259289317_A_User_Friendly_Guide_to_Multivariate_Calibration_and_Classification
- NIST. (2018). Octacosane. Disponível em <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C630024&Mask=80>
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Miguel Hernández-Hierro, J., José Heredia, F., & Byrne, H. J. (2017). Linking ATR-FTIR and Raman features to

- phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta*, 167, 44–50. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.008>
- Osborne, B. (2000). Near-infrared spectroscopy in food analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–14. <http://doi.org/10.1002/9780470027318.a1018>
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. *Longman Scientific and Technical* (2ªEdição).
- Pasquini, C. (2003). Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14, 198–219. <http://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200006>
- PerkinElmer (2005). FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). Disponível em https://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf
- Polshin, E., Lammertyn, J., & Nicolai, B. M. (2010). Vibrational Spectroscopy Techniques in the Quality Assessment of Fruits and Vegetables. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 1–17. <http://doi.org/10.1002/0470027320.s8954>
- Porep, J. U., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science and Technology*, 46(2), 211–230. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.002>
- Post-Beittenmiller, D. (1996). Biochemistry and Molecular Biology of Wax Production in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 47, 405–30. Disponível http://arquivo.ufv.br/DBV/PGFVG/BVE684/htms/pdfs_revisao/metabolismo/cera.pdf
- Purcell, D. E., O'Shea, M. G., & Kokot, S. (2007). Role of chemometrics for at-field application of NIR spectroscopy to predict sugarcane clonal performance. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 139–150. <http://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.11.003>
- Rahman, A., Bayram, I., Khanum, S., & Ullah, S. (2015). Use and Calibration of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in Feed Analysis: A Mini Review. *Journal of Life and Social Sciences*, 13, 1–7.
- Rook, A. J., Parente, G., & Mills, J. (2004). Matching type of livestock to desired biodiversity outcomes in pastures – a review. *Biological Conservation*, 119, 137–150. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.11.010>
- Rook, A. J., & Tallwin, J. R. B. (2003). Grazing and pasture management for biodiversity benefit. *Animal Research*, 52, 181–189. <http://doi.org/10.1051/animres:2003014>
- Roumet, C., Picon-cochard, C., Dawson, L. a, Joffre, R., Mayes, R., Blanchard, A., ... Brewer, J. (2006). Methods in root mixtures Quantifying species composition using two methods : and spectroscopy wax markers plant. *New Phytologist*, 170, 631–638. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01698.x>
- Ru, Y. J., Kruk, J. a., Fischer, M., Choct, M., & Glatz, P. C. (2002). Predicting N-alkane concentration in pastures and deer faeces for dietary composition and digestibility measurement using near infrared spectroscopy. *Asian-Australasian Journal of Animal*

- Sciences*, 15, 1611–1616. <http://doi.org/10.5713/ajas.2002.1611>
- Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., & Hoover, M. R. (1979). Analysis of Forages by Infrared Reflectance. *Journal of Dairy Science*, 62(5), 807–812. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83330-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83330-5)
- Siesler, H. W., Ozaki, Y., & Kawata, S. (2002). *Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. Wiley –VCH (Vol. 16). <http://doi.org/10.1002/cem.762>
- Smith, B. C. (1996). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. C. Press, Ed.). Disponível em https://books.google.pt/books?id=cL_cvNCoEmkC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=ftir+spectroscopy+history&source=bl&ots=l8_Kc0o4jd&sig=M0_vbACWcfcApebsovGs5uQ1Szw&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwix0MTGxJTaAhVJcRQKHkOC5w4ChDoAQgmMAA#v=onepage&q=ftir spectroscopy history&f=f
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*. 1-208 (Wiley, Ed.).
- Stuth, J., Jama, A., & Tolleson, D. (2003). Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research*, 84, 45–56. [http://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00140-0](http://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00140-0)
- Stuth, J., Lyons, R., & Kreuter, U. (1995). Animal/plant interactions: nutrient acquisition and use by ruminant. *Livestock and Sustainable Nutrient Cycling in Mixed Farming Systems of Sub-Saharan Africa. Volume II: Technical Papers. Proceedings of an International Conference. International Livestock Centre for Africa (ILCA)*, 63–82.
- Swain, D. L., & Friend, M. A. (2013). Opportunities for telemetry techniques in studies on the nutritional ecology of free-ranging domesticated ruminants. *Animal*, 7(s1), 123–131. <http://doi.org/10.1017/S1751731112000870>
- Swierenga, H., Wülfert, F., De Noord, O. E., De Weijer, A. P., Smilde, A. K., & Buydens, L. M. C. (2000). Development of robust calibration models in near infra-red spectrometric applications. *Analytica Chimica Acta*, 411, 121–135. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00718-2](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00718-2)
- Thermo Scientific. (2012). Thermo Scientific Nicolet iS50 FT-IR Spectrometer. *Molecular Spectroscopy*. Disponível em <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Specification-Sheets/PS52301-E-1112M-iS50-L-1.pdf>
- Tobias, R. D. (1995). An Introduction to Partial Least Squares Regression. *Proceedings of the Twentieth Annual SAS Users Group International Conference, Cary, NC: SAS Institute Inc*, 1250–1257. <http://doi.org/http://support.sas.com/techsup/technote/ts509.pdf>
- Tsai, S.-R., & Hamblin, M. R. (2017). Biological effects and medical applications of infrared radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170, 197–207. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014>
- Viscarra Rossel, R. A., Walvoort, D. J. J., McBratney, A. B., Janik, L. J., & Skjemstad, J. O. (2006). Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma*,

131(1–2), 59–75. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.03.007>

Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [http://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](http://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

Xiaobo, Z., Jiewen, Z., Povey, M. J. W., Holmes, M., & Hanpin, M. (2010). Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 667(1–2), 14–32. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.048>

Ziegel, E. R. (2004). A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. *Technometrics*, 46(1), 108–110. <http://doi.org/10.1198/004017004000000167>