IULI CAETANO DA SILVA BRANDÃO GUIMARÃES

**Quantificação de lignina em *Brachiaria* spp. medida por LDA, LBA e
NIRS**

Pirassununga, SP

2019

IULI CAETANO DA SILVA BRANDÃO GUIMARÃES

Quantificação de lignina em *Brachiaria* spp. medida por LDA, LBA e NIRS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3744
FMVZ

Guimarães, Iuli Caetano da Silva Brandão
Quantificação de lignina em *Brachiaria spp.* medida por LDA, LBA e NIRS / Iuli Caetano da
Silva Brandão Guimarães. – 2019.
155 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima.

Coorientador: Dr. Gilberto Batista de Souza.

1. Lignina em detergente ácido. 2. Lignina em brometo de acetila. 3. Espectroscopia em
infravermelho próximo. 4. Digestibilidade *in vitro*. 5. Gramínea forrageira. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Quantificação de lignina em *Brachiaria* spp. medida por LDA, LBA e NIRS", protocolada sob o CEUA nº 7684280518 (ID 005762), sob a responsabilidade de **Romualdo Shigueo Fukushima** e equipe; *Iuli Caetano da Silva Brandão Guimarães* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/11/2018.

We certify that the proposal "Lignin content in *Brachiaria* spp. measured through ADL, ABL and NIRS", utilizing 2 Bovines (2 males), protocol number CEUA 7684280518 (ID 005762), under the responsibility of **Romualdo Shigueo Fukushima** and team; *Iuli Caetano da Silva Brandão Guimarães* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/07/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2018** a **11/2018**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **20 a 30 meses**

N: **2**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **600 a 700 kg**

Local do experimento: Laboratório de Lignina do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 09 de novembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GUIMARÃES, Iuli Caetano da Silva Brandão

Título: **Quantificação de lignina em *Brachiaria* spp. medida por LDA, LBA e NIRS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais...

A meus avós...

A meus tios...

...por tudo!

AGRADECIMENTOS

- ♥ **A Jesus, Maria e todos os santos, por me regerem, me guardarem, me governarem e me iluminarem.**
- ♥ **A meus familiares, pela sabedoria, força, incentivo, carinho, educação e muita, mas muita paciência. Em especial a meus pais Martius e Maria Aparecida que sempre lutaram por mim incondicionalmente.**
- ♥ **À Universidade de São Paulo (USP) e ao Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima por ter me acolhido como orientada, pela infraestrutura e pela confiança em mim depositada.**
- ♥ **À Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE) pelas doações e condições de realizar este projeto. Em especial ao Gilberto de Souza, Cristina Picchi, Mariana Dias (empresa Büchi) e Andrea Barreto.**
- ♥ **Ao meu namorado Thiago Henrique da Silva, por ter me apoiado desde o começo até o fim deste projeto, sem medir esforços para me ajudar, com amor e compreensão.**
- ♥ **A todos os docentes do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), em especial ao professor Paulo Mazza Rodrigues, e também os da FZEA Valdo Herling, Lilian Pereira e Saulo da Luz e Silva por todos os ensinamentos.**
- ♥ **Aos professores Lilian Barreto Elston, Ed Hoffmann Madureira e Josefino Mendes Neto (Juju), por me ensinarem que os valores são a base da educação.**
- ♥ **Aos funcionários do VNP - FMVZ e da FZEA, em especial ao Pedro Pacheco, à Simi, à Renata, à Ana, à Alessandra, dona Lúcia, Dione, João Paulo, a todos os funcionários das bibliotecas, todas as faxineiras, os vigilantes e seguranças, por estarem sempre disponíveis, inúmeras vezes, para me ajudar.**
- ♥ **Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição.**
- ♥ **E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS. Eu não teria chegado até aqui sem cada um de vocês.**
- ♥ **O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

Tem que ter veneno!

(Josefino Mendes Neto)

RESUMO

GUIMARÃES, I. C. S. B. **Quantificação de lignina em *Brachiaria* spp. medida por LDA, LBA e NIRS.** 2019. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Brachiaria é o gênero de gramínea forrageira mais utilizado no Brasil. Lignificação de forrageiras é considerada o principal fator limitante à degradação da parede celular pelos microrganismos ruminais, diminuindo o valor nutritivo das mesmas. Portanto, conhecer o teor de lignina é de fundamental importância. Entretanto, não há consenso sobre um método ideal para sua quantificação. Tem-se considerado a possibilidade de a lignina em detergente ácido (LDA) subestimar a concentração de lignina em gramíneas forrageiras, devido à solubilização de parte dela, durante a realização da fibra em detergente ácido (FDA), anterior à LDA. Logo, lignina em brometo de acetila (LBA) vem recebendo atenção de pesquisadores em nutrição de ruminantes. Espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS) é rápido, de baixo custo operacional, não destrutivo e com possibilidade de análises simultâneas. Porém necessita calibração, utilizando resultados de métodos químicos como referência, antes de ser utilizado para análises de rotina. Objetivou-se utilizar 169 amostras de diferentes espécies de *Brachiaria* para correlacionar digestibilidade *in vitro* com métodos de quantificação de lignina: LDA e LBA; comparar LBA a partir de parede celular (PC) e de fibra em detergente neutro (FDN); desenvolver curvas de calibração em NIRS (regressões por mínimos quadrados parciais) para ligninas LDA, LBA_{PC} e LBA_{FDN}, assim como para matéria seca (MS), matéria mineral, PC, FDN, FDA, digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN) e testar acurácia, a precisão e a robustez dessas predições. As LBAs correlacionaram-se melhor com DIVMS e DIVFDN do que as LDAs (tanto com os métodos convencionais quanto com NIRS). Ambas PC e FDN podem ser utilizadas para a execução de LBA ($R^2=0,72$). O NIRS evidenciou ter potencial para mensuração de nutrientes e digestibilidade das amostras estudadas.

Palavras-chave: Digestibilidade *in vitro*. Espectroscopia em infravermelho próximo. Gramínea forrageira. Lignina em brometo de acetila. Lignina em detergente ácido.

ABSTRACT

GUIMARÃES, I. C. S. B. **Lignin content in *Brachiaria* spp. measured through ADL, ABL and NIRS.** 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Genus of *Brachiaria* grass is the most used in Brazil. Forage lignification is considered the main limiting factor for cell wall degradation by ruminal microorganisms, reducing their nutritive value. Thus, know the lignin content is important. However there is no ideal method for its quantification. Acid detergent lignin (ADL) has been considered to underestimate forage grasses lignin content, due to its partial solubilization during acid detergent fiber (ADF) procedure, prior to ADL. Therefore, acetyl bromide lignin (ABL) has been receiving attention from ruminant nutrition researchers. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is fast, inexpensive, non-destructive and capable of simultaneous analysis. Notwithstanding, it needs calibration before being used for routine analysis, and chemical methods are used as reference. The objectives were to use 169 samples from different *Brachiaria* species to correlate *in vitro* digestibility with lignin quantification methods: ADL and ABL; compare ABL from cell wall (CW) and from neutral detergent fiber (NDF); develop NIRS calibration curves (partial least squares regressions) for ADL, ABL_{CW} and ABL_{NDF}, as well as for dry matter (DM), ash, CW, NDF, ADF, *in vitro* DM digestibility (IVDMD) and *in vitro* NDF digestibility (IVNDFD). Furthermore, test the accuracy, precision and robustness of these predictions. ABLs were better correlated with IVDMD and DIVFDN than ADL. Both CW and NDF can be used for ABL analysis ($R^2=0.72$). NIRS showed potential for nutrient measurement and digestibility.

Keywords: *In vitro* digestibility. Near infrared spectroscopy. Grass forage. Acetyl bromide lignin. Acid detergent lignin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das pesquisas dos Censos Agropecuários do Brasil, de 1975 a 2017	31
Tabela 2. Número de estabelecimentos e de cabeças de animais, em 2017*	32
Tabela 3. Características forrageiras de algumas gramíneas tropicais	36
Tabela 4. Resumo da composição dos resíduos vegetais, após exposição à detergentes químicos	43
Tabela 5. Pesos discriminados para se chegar ao valor de Q, utilizando a seguinte fórmula: $Q = 1 / [1 + \text{soma} (\text{pesos} * \text{valor})]$	70
Tabela 6. Descrição das amostras de capins utilizadas (n=169).....	73
Tabela 7. Análise descritiva dos parâmetros químicos de amostras de <i>Brachiaria</i> spp., realizados pelos métodos convencionais (n=169), em g/kg MS	82
Tabela 8. Descrição dos parâmetros químicos de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. realizados pelos métodos convencionais, utilizados para calibração e validação interna (n=149) e validação externa (n=20), em g/kg MS.....	86
Tabela 9. Descrição dos parâmetros químicos de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. realizados pelo método espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS; n=20; em g/kg MS).....	88
Tabela 10. Correlações entre métodos convencionais e o conjunto das amostras de validação externa pelo método de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), em amostras de <i>Brachiaria</i> spp. (n=20)	89
Tabela 11. Correlação entre métodos de análises de lignina e digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) pelos métodos convencional e o conjunto das amostras de validação externa pelo método de espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS), em amostras de <i>Brachiaria</i> spp. (n=20)	90
Tabela 12. Estimativas dos coeficientes dos modelos de regressão linear entre métodos convencionais e o método de espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS), de diferentes nutrientes e digestibilidade de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. (n=20)	95
Tabela 13. Acurácia e precisão da estimativa de diferentes nutrientes determinados utilizando espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS) de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. (n=20) .	100
Tabela 14. Robustez das estimativas da digestibilidade da matéria seca (DIVMS) ou da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de diferentes nutrientes, de acordo com os métodos convencionais ou pelo método NIRS, de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. (n=20).....	106

Tabela 15. Índices estatísticos de desempenho dos modelos de calibração (C) e validação (V) de diferentes analitos para desenvolvimento dos melhores modelos para o espectrofotômetro infravermelho próximo (NIRS)	113
Tabela 16. Descrição dos resultados de validação externa pelo método espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS; n=20): parâmetros químicos e digestibilidade de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. e estatísticas	115
Tabela 17. Correlação entre lignina em brometo de acetila vinda da parede celular (PC) e da fibra em detergente neutro (FDN) de amostras de <i>Brachiaria</i> spp. (n=20)	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inter-relação entre forragens e ruminantes.....	23
Figura 2. Utilização das terras no Brasil em 2017.....	30
Figura 3. Pastagens brasileiras em 2017.....	30
Figura 4. Densidade de ruminantes, entre os estados brasileiros (dados relativos à data de referência 30/09/2017).....	33
Figura 5. Evolução da taxa de lotação animal (bovinos) em relação à área total de pastagens - Brasil - 1940/2017	34
Figura 6. Dados preliminares sobre números de cabeças de bovinos por área de pastagem, em todos os estados da federação, em 2017	34
Figura 7. Evolução do abate de bovinos por trimestre – Brasil – trimestres 2012-2017.....	35
Figura 8. Esquema da disposição dos componentes das células vegetais	38
Figura 9. Esquema mostrando como a parede celular das plantas forrageiras se desenvolve..	39
Figura 10. Ligações entre hemicelulose e lignina, na região “non core”	40
Figura 11. Desenho esquemático da parede celular de plantas	41
Figura 12. Regiões cristalina e amorfa da celulose	44
Figura 13. Exemplo de hemicelulose nas plantas e uma de suas possíveis ligações com a lignina	45
Figura 14. Esquema simplificado de precursores e subunidades da lignina	47
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura mostrando bactérias celulolíticas ruminais e fibras de celulose. Algumas bactérias fixam-se e atuam paralelamente, formando estrias, outras não tem disposição organizada	49
Figura 16. Aparelho Biochrom Libra S50 UV/Vis Spectrophotometer (190 a 1100 nanômetros), a lignina é medida a 280 nanômetros	51
Figura 17. Reprodução do aparato utilizado no experimento de Herschel, em 1800.....	57
Figura 18. Bases da tecnologia NIRS	58
Figura 19. Modos de medição empregados na espectroscopia NIR: transmitância (a); transfectância (b); refletância difusa (c); interactância (d) e transmitância através do meio de dispersão (transmitância difusa) (e).....	59
Figura 20. Componentes básicos dos espectrofotômetros de refletância difusa	59
Figura 21. Regiões do infravermelho próximo e as maiores possibilidades de se encontrar certas ligações, ao longo da faixa	61

Figura 22. Modos de vibração molecular. As bolas representam os átomos e as linhas representam as ligações entre eles. Os sinais + e – indicam movimentos para dentro e para fora do plano da página, respectivamente	62
Figura 23. Calibrações e validações em relação a amostras e métodos referências, na espectroscopia em infravermelho próximo.....	63
Figura 24. Aspecto interdisciplinar da quimiometria	64
Figura 25. Representação das etapas de modelagem realizadas pelo método PLS-1. PCA dá origem aos vetores t_1 e t_2 , e a relação entre esses dois novos vetores é feita pela regressão de PLS	67
Figura 26. Exemplo de análise de refletância difusa de uma amostra seca moída. Os feixes NIR atravessam a placa de Petri até a amostra, refletem de forma difusa até os receptores (R) ou detectores. Isso gera informação	68
Figura 27. Mapa dos locais das Embrapa que participaram da coleta de amostras.....	72
Figura 28. Representação da construção de um modelo de calibração multivariada	77
Figura 29. Espectrofotômetro modular FT-NIR, NIRFlex® N-500, da empresa suíça BÜCHI®, com amostra moída de capim do gênero <i>Brachiaria</i>	78
Figura 30. Explicação de alguns elementos estatísticos	81
Figura 31. Espectros obtidos a partir de amostras de <i>Brachiaria</i> spp., coletadas sob diferentes condições edafoclimáticas	87
Figura 32. Regressões lineares simples entre nutrientes mensurados pelos métodos convencionais vs. NIRS.....	91
Figura 33. Exemplos dos conceitos de acurácia e precisão	98
Figura 34. Viés linear (coeficiente angular) das estimativas entre a diferença do predito (espectroscopia em infravermelho próximo) pelo observado (métodos convencionais) – DIF – e o observado (métodos convencionais)	102
Figura 35. Regressão linear entre vieses das estimativas da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (método de espectroscopia em infravermelho próximo - métodos convencionais: DIFDIVMS).....	107
Figura 36. Regressão linear simples entre lignina em brometo de acetila a partir de parede celular (LBAPC) e lignina em brometo de acetila a partir de fibra em detergente neutro (LBAFDN), bem como teste de intercepto = 0 e coeficiente angular (slope) = 1 (n=169)....	119
Figura 37. Regressão linear simples entre métodos de mensuração de lignina vs. digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) (n=169)	121

Figura 38. Regressão linear simples entre métodos de mensuração de lignina vs. digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN) (n=169).....	121
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Volumosos e ruminantes – por que maiores produção e produtividade?	21
3.2	A fibra na alimentação de ruminantes	23
3.2.1	Evolução dos ruminantes e seu comportamento alimentar	23
3.2.2	A função da fibra para os ruminantes.....	25
3.2.3	Fibra e a produtividade de ruminantes	26
3.2.4	A digestibilidade das forragens e suas consequências	26
3.3	Números agropecuários Brasil 2017	29
3.4	<i>Brachiaria</i> spp.	36
3.5	A parede celular vegetal.....	38
3.5.1	Fibra: alguns métodos para sua quantificação.....	41
3.5.2	Celulose.....	43
3.5.3	Hemicelulose	44
3.5.4	Lignina	45
3.5.4.1	Lignina e a indigestibilidade da fibra.....	47
3.5.4.2	Métodos para quantificação de lignina em plantas forrageiras.....	50
3.6	Espectroscopia em infravermelho próximo – NIRS: uma abordagem alternativa para a estimativa de componentes da forragem	54
3.6.1	Histórico NIRS	56
3.6.2	Instrumentação	58
3.6.3	Princípios ou fundamentos da análise NIRS	60
3.6.4	Calibrações e validações	62
3.6.5	Análise multivariada e quimiometria	64
3.6.6	Técnicas multivariadas para análise de grande base de dados	65
3.6.7	Análise de componentes principais	65
3.6.8	Análise de regressão por quadrados mínimos parciais.....	66
3.6.9	Pré-tratamentos dos dados espectrais	67
3.6.10	Valor de Q ou Q-valor (Q-value) (BÜCHI®)	69
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1	Local, instalações e animais.....	71
4.2	Obtenção e preparo das amostras de <i>Brachiaria</i> spp.....	71
4.3	Análises químicas convencionais	74
4.4	Digestibilidade <i>in vitro</i>	75
4.5	Espectroscopia de refletância em infravermelho próximo.....	75

4.6	Análises estatísticas	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1	Análise descritiva dos capins	82
5.2	Correlações entre análises convencionais e NIRS - SAS®	85
5.3	Avaliação dos modelos obtidos pelo NIRS - SAS®	96
5.3.1	Avaliação de um modelo	96
5.3.2	Hipóteses de um modelo	96
5.3.3	Análises de sensibilidade	97
5.3.4	Acurácia e precisão dos modelos obtidos	97
5.3.5	Robustez dos modelos obtidos	103
5.4	Estatísticas multivariadas do NIRS	108
5.4.1	Calibrações e validações internas	108
5.4.2	Validações externas	114
5.5	Uso de parede celular ou fibra em detergente neutro como substrato para análise da lignina em brometo de acetila	116
5.6	Regressões entre análises de lignina e digestibilidade	119
6	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICE	150

1 INTRODUÇÃO

Para se estimar o valor nutritivo de uma cultura forrageira é preciso considerar alguns parâmetros. São eles 1) nível de ingestão de nutrientes, 2) digestibilidade dos nutrientes e 3) eficiência de utilização dos nutrientes. Desses, o segundo é considerado primário, pois tem grande influência nos outros dois parâmetros (RAYMOND, 1969).

A fisiologia do trato gastrointestinal dos ruminantes os possibilita utilizar material fibroso na composição de sua dieta (VAN SOEST, 1994). Estes animais possuem a capacidade de converter fibra, que não seria utilizada por monogástricos, em carne e leite (BURNS, 2008), entretanto esta conversão ainda é bastante ineficiente (VARGA; KOLVER, 1997).

Uma das barreiras à digestão da fibra por ruminantes é a lignina, uma estrutura fenólica complexa, hidrofóbica, composta por álcoois aromáticos (monolignols) coniferil, sinapil, p-coumaril, guaiacil, seringil e p-hidroxifenil, sempre em diferentes combinações, ligações e proporções, dependendo do tipo da planta e de seu estágio de maturidade (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987; HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005).

Sendo assim, torna-se primordial a importância de se estudar este polímero para correta estimativa do valor nutritivo de uma forragem e, por conseguinte calcular uma dieta que se aproxime ao máximo da realidade, no cocho de alimentação. Apesar de a lignina ser um importante componente da parede celular de forrageiras, resistente à degradação, ela não é facilmente quantificada dentre os vários tipos de forragens, por sua complexidade e distribuição (ENGELS; JUNG, 1998; RAFFRENATO et al., 2017).

Alguns métodos para quantificação de lignina foram desenvolvidos ao longo dos anos, para diferentes espécies vegetais. Dentre os mais escolhidos por pesquisadores envolvendo desenvolvimento de forragens e sua utilização para ruminantes são: Lignina em Detergente Ácido (VAN SOEST, 1963), Lignina Klason (THEANDER; WESTERLUND, 1986) e Lignina em Permanganato de Potássio (VAN SOEST; WINE, 1968), que são gravimétricos. Um método alternativo, espectrofotométrico, proposto por Morrison, (1972) para medir os níveis de lignina em plantas forrageiras foi o Lignina em Brometo de Acetila.

Fato é que cada um desses procedimentos gera resultados diferentes de lignina para uma mesma amostra vegetal (VAN SOEST; WINE, 1968; GOMES et al., 2011). Com o método espectrofotométrico tem sido observadas maiores correlações de Pearson (r) e coeficientes de determinação (R^2) em regressões lineares simples com digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro, comparados aos métodos gravimétricos (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004; FUKUSHIMA et al., 2015).

Para se testar os métodos de quantificação de lignina em forrageiras, ensaios de digestibilidade são feitos, posto que se sabe sobre a estreita relação negativa entre eles (JUNG; VOGEL, 1986; JUNG; MERTENS; PAYNE, 1997). Assim sendo, técnicas foram desenvolvidas, como ensaios *in vitro*, que tentam reproduzir a forma como o sistema digestivo do animal ruminante atua (GOERING; VAN SOEST, 1970; IOWERTH; JONES; HAYWARD, 1975; HUNTINGTON; GIVENS, 1997).

Considerando que uma rápida e minimamente invasiva determinação do valor nutritivo de forrageiras pode ser útil para seu manejo e para o planejamento da dieta para ruminantes, paralelamente, desde 1976 há a possibilidade de se utilizar um método de quantificação de nutrientes e constituintes dessas plantas – a tecnologia de espectroscopia em infravermelho próximo, ou NIRS (NORRIS et al., 1976).

Com um conjunto de vantagens a favor de sua utilização mais rotineiramente e alguns percalços, como todo método existente, crescentemente esta ferramenta vem sendo escolhida por pesquisadores, laboratórios e departamentos de pesquisa (REEVES; BLOSSER; COLENBRANDER, 1989; RABOTNIKOF et al., 1995; FONTANELI et al., 2004; WARD; NIELSEN; MØLLER, 2011).

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

As hipóteses foram:

- o método de quantificação de lignina LBA teria maiores correlações com digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro comparado ao método LDA, em capim *Brachiaria* spp.;
- a espectroscopia em infravermelho próximo conseguiria prever com acurácia, precisão e robustez teores de nutrientes no mesmo capim;
- o método LBA poderia ser conduzido a partir de duas preparações fibrosas: parede celular e fibra em detergente neutro.

Os objetivos neste trabalho foram

- relacionar digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro com dois métodos de quantificação de lignina (LBA e LDA);
- testar acurácia, a precisão e a robustez das predições das composições químicas das forragens de diferentes espécies de capim *Brachiaria* em espectroscopia em infravermelho próximo para matéria seca, matéria mineral, parede celular, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, lignina em detergente ácido, lignina em brometo de acetila, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro;
- comparar os resultados do método LBA a partir de duas preparações fibrosas: parede celular e fibra em detergente neutro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Volumosos e ruminantes – por que maiores produção e produtividade?

No ano de 2050 haverá mais três bilhões de pessoas no planeta, o que gerará a necessidade de aumentar em mais de 70% a produção global de alimentos (GAZZONI, 2010). O cenário agropecuário mundial demonstra claramente um mercado competitivo que exige maior eficiência e precisão nos mais diversos serviços e campos de atuação. Somado a isso, deve-se considerar a cada vez maior demanda social pela proteção ambiental e bem-estar animal (KOVÁCS et al., 2014). Nesse contexto, a agropecuária do século XXI será guiada pela sustentabilidade e a constante inovação tecnológica, com grande inter-relação entre elas.

O consumo de leite e carne nos últimos 30 anos cresceu três vezes mais rápido em países em desenvolvimento em comparação com países desenvolvidos (FAO, 2009), principalmente na Ásia, América Latina e Caribe. Apesar de as maiores mudanças terem ocorrido em países em desenvolvimento populosos e com economias de rápido crescimento, como Brasil, China, Índia e Indonésia (PICA-CIAMARRA; OTTE, 2011), é esperado aumento significativo de consumo de produtos de origem animal em países com populações e economias menos expressivas (ILRI; CIAT; ICARDA, 2011).

Há um bilhão de pessoas desnutridas no mundo. As pessoas com menor poder aquisitivo sobrevivem em sua maioria com dietas baseadas em alimentos ricos em amido que não conseguem atender a todas as suas necessidades nutricionais. Quanto mais aumenta o poder aquisitivo das pessoas, maior é o consumo de alimentos ricos em nutrientes de origem animal. O consumo de carne e leite está previsto para aumentar mais rapidamente do que qualquer produção agrícola, impulsionado pelo aumento populacional, urbanização e aumento da renda nos países em desenvolvimento (IAASTD, 2009; FAO; OPAS, 2017).

A intensificação sustentável de sistemas baseados em forragens tropicais contribui para melhorar a nutrição humana, aumentar a renda agrícola, aumentar o acúmulo de carbono no solo e reduzir as emissões de gases de efeito estufa. As gramíneas forrageiras, usadas como componentes-chave de sistemas sustentáveis de culturas agropecuárias nos trópicos, oferecem benefícios significativos: melhoria da segurança alimentar, restauração de terras degradadas, alívio da pobreza e mitigação da mudança climática. Os sistemas agrícolas baseados em forragens tropicais, climaticamente inteligentes, podem melhorar a produtividade pecuária dos sistemas de pequenos agricultores e quebrar o ciclo de pobreza e escassez de recursos (RAO et al., 2015).

Ruminantes tem capacidade de converter biomassa de baixa qualidade em alimentos ricos em nutrientes de alta qualidade (SMITH et al., 2013). Contribuem com 15% da energia total de alimentos, 25% de proteína dietética, além de fornecerem alguns micronutrientes que não estariam prontamente disponíveis ao humano através do consumo de vegetais (FAO, 2009).

A participação de ingredientes volumosos (>18% de fibra bruta com base na MS) na alimentação de ruminantes pode variar de 50-100% do total de matéria seca (MS) da dieta. O fornecimento de volumosos na alimentação de rebanhos pode ser natural: pastos, forragem verde picada e fornecida no cocho, ou conservado: silagem, feno, pré-secado (BOTREL; NOVAES; ALVIM, 1998).

A maioria dos rebanhos de ruminantes sempre foi alimentada com pastagens no Brasil, porque além do alto custo dos volumosos conservados, em ambientes tropicais sua produção encontra obstáculos como umidade e frequentes chuvas. Além disso, em condições naturais, os ruminantes têm o hábito evolutivo de pastejar (BERNARDES; SCHMIDT; DANIEL, 2015).

Porém, não se pode deixar de lado a competitividade da atividade, com manejo correto das pastagens, para seu consequente maior rendimento (PIMENTEL et al., 2011; DIAS FILHO, 2014). Por esse motivo há várias pesquisas nessa área, visando máximo aproveitamento dessa ferramenta alimentar (DE PALMA et al., 2015; STAINES et al., 2017).

A produtividade animal é resultado da produção de massa de forragem, da eficiência de utilização dessa massa e do desempenho animal. Este último está diretamente ligado ao consumo e à qualidade das pastagens. Ele determina qual a quantidade de nutrientes ingeridos necessária para atender as exigências de produção dos animais (Figura 1; RAYMOND, 1969; DEMINICIS et al., 2014).

Na forma de pastagem ou conservada (feno, silagem), em condições climáticas favoráveis, como na maioria das regiões do Brasil, gramíneas são a opção mais viável economicamente para alimentação do rebanho de ruminantes, no período das águas e no período da seca do ano (BALSALOBRE et al., 2003b; PEREIRA; POLIZEL, 2016), gerando produção de carne, leite, lã, peles, entre outros produtos de origem animal, que são alguns dos mais expressivos componentes do PIB agrícola brasileiro (GASQUES; BACCHI; BASTOS, 2018). Também vale ressaltar que a baixa inclusão de fibra nas rações de ruminantes pode levar à acidose ruminal, abscesso hepático, depressão da gordura no leite, entre outros problemas (NOCEK, 1997; NRC, 2001).

Figura 1. Inter-relação entre forragens e ruminantes

Fonte: adaptado de Burns (2008).

Diante do que foi mencionado, a máxima produção por animais ruminantes depende da adequada utilização de nutrientes provenientes da alimentação. Para isso, é de fundamental importância a máxima utilização do potencial nutritivo dos alimentos concentrados e volumosos. Quanto a estes, o principal obstáculo à digestão microbiana dos carboidratos da parede celular é a lignina (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001).

3.2 A fibra na alimentação de ruminantes

3.2.1 Evolução dos ruminantes e seu comportamento alimentar

A história evolutiva dos ruminantes pode nos ajudar a entender como as espécies de ruminantes são e como podem ser manejados para que expressem seu potencial produtivo com eficiência no intuito de promover altas lucratividades dentro do sistema pecuário (VAN SOEST, 1994).

Os primeiros ruminantes surgiram há cerca de 50 milhões de anos e eram pequenos onívoros (<5 kg) residentes na natureza. Hoje existem quase 200 espécies de ruminantes vivas distribuídas em 6 famílias. Os ruminantes silvestres são cerca de 75 milhões e variam de cerca de 2 a mais de 800 kg de peso corporal, e geralmente preferem pelo menos alguns alimentos com maior concentração de nutrientes digestíveis em suas dietas, ou seja, são animais altamente seletivos. Nove espécies foram domesticadas nos últimos 10 mil anos sendo que as duas

populações combinadas (silvestres e domesticadas) chegam a 3,6 bilhões de indivíduos. Em contraste com ruminantes silvestres, as espécies domésticas naturalmente preferem pelo menos um pouco de forragem em suas dietas e são de maior peso corporal (aproximadamente de 35 a 800 kg). Exceto as renas, todos os ruminantes domesticados pertencem à família Bovidae (HACKMANN; SPAIN, 2010).

De acordo com Hofmann e Stewart (1972), as espécies de ruminantes podem ser classificadas de acordo com suas preferências de consumo por diferentes alimentos, em que 3 classes são descritas: 1) selecionadores, os quais preferem inatamente alimentos com menor concentração de fibras tais como frutas, brotos e folhas (tipicamente de arbustos e árvores); 2) pastejadores, os quais inatamente preferem capins; ou 3) consumidores intermediários, os quais mudam entre selecionadores e pastejadores de acordo com a disponibilidade sazonal. Diante da história evolutiva, os ruminantes foram predominantemente selecionadores e somente um quarto deles eram pastejadores, sendo que a família Bovidae e Cervidae têm espécies representadas nas 3 classes e as outras famílias são exclusivamente selecionadores (antilocapridae, giraffidae, moschdae, tragulidae).

A primeira espécie a ser domesticada foi a caprina cerca de 8000 a.C. (ZEDER; HESSE, 2000), espécie esta que supria carne para subsistência para uma população dependente da caça, pois a região ocupada por estes indivíduos já não mais havia as presas antes comumente encontradas (DIAMOND, 2002). A maioria das outras oito espécies de ruminantes domesticadas (ovinos, gado Europeu e Zebu, búfalos, mithans – *Bos frontalis*, renas, iaques e gado de Bali) foram trazidas sob o controle humano cerca de 2500 a.C. (CLUTTON-BROCK, 1999). As razões para a domesticação são diversas, indo de fornecimento de carne até poder de barganha. As espécies domesticadas têm como ascendentes 12 espécies, as quais foram escolhidas para domesticação devido ao seu comportamento agregativo, eram submissos aos humanos, não eram temperamentais, e eram de fácil multiplicação (CLUTTON-BROCK, 1999; DIAMOND, 2002).

O tamanho da população de ruminantes domesticados é cerca de 50 vezes o tamanho da população de ruminantes silvestres, sendo que 95% daqueles são constituídos pela soma da população de bovinos, ovinos e caprinos os quais estão contidos dentro da família Bovidae. Embora 35,3% das espécies dentro da família Bovidae são selecionadores, 26,5% são intermediários e 39,2% são pastejadores, a maioria das espécies domesticadas é pastejadora (HACKMANN; SPAIN, 2010).

Diante do exposto, fica evidente a divisão de classes por preferências alimentares entre as espécies de ruminantes. Hofmann (1973) examinou as preferências alimentares entre estes

grupos diante das suas diferenças anatômicas e concluiu que as adaptações gerais do sistema digestivo destes animais correspondem ao seu comportamento ecológico na natureza. Ele descreve que ruminantes pastejadores são melhor adaptados para consumir fibras de plantas com lenta digestão (típicas de capins) comparados aos animais selecionadores.

Ainda diante da perspectiva de Hofmann (1973), os animais pastejadores possuem maiores compartimentos ruminais e, além disso, a estrutura do rúmen e do omaso retarda a passagem do alimento para o trato digestivo posterior. Inversamente, os selecionadores possuem rúmen e omaso menores e menos complexos, além de possuírem glândulas parótidas salivares maiores a quais atuam tamponando o rúmen, assim prevenindo distúrbios gastro-intestinais e possibilitando maior taxa de passagem dos alimentos pelo rúmen. Estes fatos, levaram Hofmann (1989) a sugerir que selecionadores e intermediários não podem digerir a fibra dietética tão bem quanto os animais pastejadores.

3.2.2 A função da fibra para os ruminantes

Diante de uma perspectiva nutricional, carboidratos podem ser divididos em fibrosos e não fibrosos. O primeiro é a fração do alimento que é lentamente digestível ou indigestível e proporciona limitação física ao trato digestório dos animais. O segundo é rapidamente digestível no rúmen (Nussio et al., 2011).

Fibra é a principal fração da parede celular das plantas e é predominantemente formada por carboidratos. Os componentes mais encontrados na fibra são celulose, hemicelulose e lignina. O primeiro, diante de um olhar químico, é compreendido por cadeias lineares de açúcar ligadas por ligações beta 1,4 as quais podem ser digeridas somente por enzimas microbianas (MOHNEN; BAR-PELED; SOMERVILLE, 2008). Além disso, a hemicelulose é dependente de enzimas microbianas para digestão devido à sua complexa estrutura de xilose também ligadas por ligações beta 1,4 (BUXTON et al., 1995). Esta última é estreitamente ligada à lignina a qual tem uma forte influência negativa sobre a digestão da fibra (SULLIVAN, 1966). Informações mais detalhadas sobre os componentes da parede celular bem como sua digestão serão abordados mais adiante neste trabalho.

Fibra é o elemento físico das dietas que deve ser fornecida em quantidades satisfatórias para o bom funcionamento do rúmen. Além disso, a fibra deve ter forma física capaz de prover a função normal do rúmen. Quando em volume adequado, estimula a mastigação e a produção de saliva, que ajudam a tamponar o rúmen contra as severas reduções do pH ruminal quando dietas com alta densidade energética são fornecidas aos animais (ALLEN, 1997). O limite

mínimo de tempo mastigando e a formação do tapete flutuante dentro do rúmen (“*mat*” ruminal) são correlacionados com o adequado fornecimento de fibra física nas dietas. Mertens (1997) afirma que a fibra em detergente neutro (FDN) obtida em laboratório seja a responsável por tais fenômenos.

3.2.3 Fibra e a produtividade de ruminantes

Em sistemas de produção onde os animais são alimentados por dietas baseadas em forragens, a quantidade e a qualidade da forragem consumida são os maiores determinantes da produtividade a ser alcançada. Na maioria destas situações, o consumo de energia e proteína determina o desempenho animal, sendo a energia disponível no alimento consumido, no caso a forragem, relacionada intimamente com a concentração de parede celular da planta, pois ela pode ter pobre digestibilidade, o que leva a limitação de consumo bem como baixa disponibilidade de nutrientes (BUXTON et al., 1995).

A maior parte dos carboidratos complexos nas forragens está contida na parede celular. Como já visto superficialmente, esta não pode ser degradada pelas enzimas presentes no trato digestório dos mamíferos. Deste modo, os animais ruminantes dependem da fermentação microbiana intra-ruminal para obter energia das paredes celulares das plantas (BUXTON et al., 1995). Esta relação entre o animal ruminante e a fibra é tão íntima que esses animais possuem exigência alimentar pela fibra da parede celular vegetal para saúde ruminal, e as forragens são as principais fornecedoras deste nutriente para esses animais (NUSSIO et al., 2011).

3.2.4 A digestibilidade das forragens e suas consequências

O consumo de matéria seca é fundamentalmente importante no campo da nutrição de ruminantes, pois é a partir dela que o animal terá o aporte de nutrientes para a manutenção da saúde e expressão de seu potencial produtivo (NRC, 2001). O potencial efeito da digestibilidade das forragens sobre o consumo de alimentos será abordado mais profundamente devido à maior variabilidade entre os animais do que a própria digestibilidade das forragens em si (Mertens et al., 1994).

O consumo de alimentos nos animais ruminantes é determinado de maneira multifatorial, e é intimamente relacionado com o potencial de entrada e saída de alimentos do rúmen. O fluxo de nutrientes pelo rúmen é influenciado pela quantidade de alimentos oferecidos e a maneira como eles são oferecidos (frequência de alimentação, por exemplo). Entretanto,

outros fatores tais como aceitabilidade, estágio fisiológico, peso, exigência para desempenho, ambiente e características dos alimentos, particularmente a fibra, a qual influencia o enchimento ruminal, podem influenciar o consumo de alimentos pelos ruminantes (LEAN; GOLDER; HALL, 2014).

Em relação ao consumo das forragens, os fatores que a alteram são de ordem física, fisiológica e psicogênica (MERTENS, 1987). Entretanto, neste estudo, serão abordados os aspectos físicos (quantidade e qualidade da parede celular) do controle do consumo, por estar intimamente ligado à digestibilidade das forragens.

É bem aceito que a digestibilidade da forragem tem forte influência sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2007). A distensão ruminal estimula receptores de tensão localizados no retículo e no saco cranial dorsal do rúmen emitindo um sinal de saciedade para o centro da fome, via nervo vago aferente. Esta distensão é afetada pelo peso e volume da digesta ruminal os quais são determinados pela concentração de FDN e pela sua característica de digestão (fragilidade, taxa de digestão e passagem) (ALLEN; PIANTONI, 2014). Além disso, outros fatores como tamanho das partículas, taxa de redução das partículas, proporção das frações potencialmente degradáveis (FDN_{pd}) e indegradáveis (FDN_i), gravidade específica funcional, proporção de forragem versus concentrado nas dietas, tipo de forragem e suas espécies, estágio de maturidade da planta, relação folha:caule (LUND, 2002; KUOPPALA et al., 2010) e população microbiana ruminal (ALLEN; MERTENS, 1988) podem afetar o consumo de alimentos pelos ruminantes.

Os efeitos de depressão de consumo pela digestibilidade da fibra são pronunciados em animais que estão em desafio energético (pico de lactação, vacas de alta produção leiteira, por exemplo); que são alimentados com dietas com alta proporção de forragens (ALLEN; PIANTONI, 2014) ou quando a forragem é de baixa digestibilidade (JUNG; ALLEN, 1995).

Para ilustrar o impacto da digestibilidade das forragens sobre a produtividade de ruminantes podemos citar o trabalho de Oba e Allen (1999), que demonstraram que uma unidade percentual de aumento na degradabilidade da FDN de forragem no rúmen aumenta 0,17 kg/dia no consumo de matéria seca e 0,25 kg/dia de leite corrigido para 4% de gordura. Além disso, Jung et al. (2004) relataram aumento de 0,12 kg/dia de consumo de matéria seca e 0,14 kg/dia de leite corrigido para gordura, com a mesma elevação no percentual de degradabilidade da FDN.

Assim como existe o fator físico limitante do consumo de matéria seca quando há ingestão de rações com alta proporção de fibra, existem também os fatores negativos da baixa inclusão de fibra nas rações, os quais podem levar a vários problemas metabólicos, como já

citado (NOCEK, 1997; NRC, 2001), pois concentração de FDN dietética é inversamente relacionada com pH ruminal, pela sua capacidade de promover a mastigação com consequente secreção de tamponantes pela saliva, e também, devido ao seu baixo potencial fermentativo (NRC, 2001). Deste modo, é extremamente necessário o fornecimento adequado de fibras nas dietas de ruminantes.

Os fatores ambientais (temperatura, disponibilidade de água, radiação solar e disponibilidade de nutrientes no solo) têm influência na qualidade das forragens. Quando há altas temperaturas (período de safra em países tropicais, como Brasil) durante o estágio vegetativo de crescimento, a digestibilidade das plantas é menor do que quando há temperaturas amenas (VAN SOEST et al., 1978). Para exemplificar este fenômeno os pesquisadores Wilson (1982), Wilson e Minson (1983) e Ohlsson (1991), relataram que o aumento de 1°C na temperatura ambiental em plantas de mesmo estágio morfológico, diminuiu sua digestibilidade na ordem de 0,3 a 0,7 pontos percentuais. As diminuições da digestibilidade das forragens cultivadas em regiões com temperaturas elevadas são associadas à maior concentração e menor digestibilidade da FDN nas células vegetais.

Do mesmo modo, a falta de água diminui a digestibilidade das plantas forrageiras por inibir o perfilhamento e ramificação de forrageira apressando a morte dos perfilhos. Sob severa restrição de água, as folhas são perdidas e algumas espécies perenes podem entrar em dormência, o que causa a translocação da maioria dos nutrientes das folhas para raízes, resultando em uma forragem de pobre qualidade (SHEAFFER et al., 1992).

Diante do sistema de produção pecuária predominante no Brasil, com alta dependência de áreas de pastagens, os fatores ambientais têm forte influência sobre a produtividade desta atividade (em se tratando de safra com altas temperaturas e “safrinhas” com restrição hídrica). Entretanto, quando se compara o potencial efeito negativo dos fatores ambientais com a maturidade das plantas, é descrito que a segunda tem maior influência na potencial qualidade das forragens (BUXTON et al., 1995), demonstrando que o fator manejo (adubação, altura de corte) tem forte impacto sobre as variáveis produtivas.

A correta avaliação de frações fibrosas de forragens é de primordial importância para acessar o seu valor nutritivo, pois estes nutrientes fornecem significantes quantidades de energia de baixo custo. Além disso, a fibra possui digestibilidade altamente variável em relação à outras partes da planta, devido à primordial influência da incrustação da lignina na parede celular (CONRAD et al., 1984). Estes mesmos autores desenvolveram uma equação com o intuito de prever a energia contida nas frações fibrosas da célula vegetal, como segue: Digestibilidade da FDN verdadeira = $0,75 \times (FDN_n - L) \times [1 - (L/FDN_n)^{0,667}]$. Esta equação envolve a

mensuração da FDN livre de nitrogênio (FDNn) e da lignina, sendo o método da lignina em detergente ácido (LDA) o método padrão escolhido pelos autores para mensuração da lignina.

A respeito dos métodos de mensuração, sabe-se atualmente que o método LDA possui falhas que prejudicam a correta mensuração da lignina por propiciar solubilização parcial da lignina quando se faz a análise de fibra em detergente neutro (FDA; essencial para a execução do método LDA; HATIFIELD et al., 1994). Estas falhas levam a previsões errôneas de quantidade de energia vindas das fibras nas dietas dos ruminantes. Outro ponto a ser considerado, são os laboriosos processos envolvidos na execução de tal metodologia, a qual envolve reagentes nocivos aos humanos, sendo necessários métodos que quantifiquem mais acuradamente a quantidade de lignina e, além disso, seja facilmente executável, que é o caso da lignina em brometo de acetila (LBA; MORRISON, 1972) e o uso da espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (NIRS; KONG et al., 2005), respectivamente.

Para que o balanço entre pontos positivos e negativos do fornecimento de fibra aos ruminantes seja favorável, a boa mensuração dos componentes nutricionais dos alimentos é de extrema importância na pecuária moderna de precisão, pois nutricionistas devem ter boas estimativas computacionais para prever o potencial produtivo das dietas, bem como ter capacidade precisa de diminuir o risco negativo de impacto econômico e ambiental.

3.3 Números agropecuários Brasil 2017

O Brasil hoje, segundo dados preliminares do Censo Agropecuário feito pelo IBGE em 2017, e apresentado em julho de 2018, possui 5.072.152 estabelecimentos relacionados à agropecuária, com área total igual a 350.253.329,273 hectares (ha) (41,13% da área total do país). Dessa, 63.366.058,510 ha estão sendo utilizados para lavoura; 158.622.704,018 ha para pastagens; 101.627.797,746 ha para matas e florestas e 26.636.768,999 ha para outros fins, representados em porcentagens arredondadas na figura 2.

Figura 2. Utilização das terras no Brasil em 2017

Fonte: adaptado de IBGE (2018).

Dentro do quesito pastagens, 46.847.429,925 ha são naturais; 99.954.268,22 ha são plantadas em boas condições e 11.821.005,873 ha plantadas em más condições (Figura 3). Em relação ao último censo, de 2006, houve diminuição da área de lavouras permanentes e de pastagens naturais, enquanto lavouras temporárias, pastagens plantadas e matas, tanto naturais quanto plantadas, aumentaram em área.

Figura 3. Pastagens brasileiras em 2017

Fonte: adaptado de IBGE (2018).

A Tabela 1 a seguir mostra a quantidade de estabelecimentos e número de cabeças de animais ruminantes, no Brasil, bem como alguns dados de produção animal, segundo o último Censo Agropecuário de 2017. A figura 4 configura detalhes por estados e gêneros de ruminantes, mostrando em quais estados há maior e menor concentração de cada um.

Tabela 1. Resultados das pesquisas dos Censos Agropecuários do Brasil, de 1975 a 2017

Dados	Censos Agropecuários					
	1975	1980	1985	1995-1996	2006	2017 ⁽¹⁾
Estabelecimentos	4.993.252	5.159.851	5.801.809	4.859.865	5.175.636	5.072.152
Área total (ha)	323.896.082	364.854.421	374.924.929	353.611.246	333.680.037	350.253.329
Utilização das terras (ha)						
Lavouras permanentes ^{(2) (3)}	8.385.395	10.472.135	9.903.487	7.541.626	11.679.152	7.982.183
Lavouras temporárias ^{(3) (4)}	31.615.963	38.632.128	42.244.221	34.252.829	48.913.424	55.383.875
Pastagens naturais	125.950.884	113.897.357	105.094.029	78.048.463	57.633.189	46.847.430
Pastagens plantadas ^{(3) (5)}	39.701.366	60.602.284	74.094.402	99.652.009	102.408.873	111.775.274
Matas naturais ^{(3) (6)}	67.857.631	83.151.990	83.016.973	88.897.582	95.306.715	106.211.639
Matas plantadas	2.864.298	5.015.713	5.966.626	5.396.016	4.734.219	8.485.503
Animais						
Bovinos	101.673.753	118.085.872	128.041.757	153.058.275	176.147.501	171.858.168
Bubalinos	209.077	380.986	619.712	834.922	885.119	948.103
Caprinos	6.709.428	7.908.147	8.207.942	6.590.646	7.107.613	8.254.561
Ovinos	17.486.559	17.950.899	16.148.361	13.954.555	14.167.504	13.770.906
Produção						
Leite de vaca (1.000 litros)	8.513.783	11.596.276	12.846.432	17.931.249	20.567.868	30.100.791
Leite de cabra (1.000 litros)	13.394	25.527	35.834	21.900	35.742	25.346
Lã (toneladas)	31.519	30.072	23.877	13.724	10.208	7.136

Fonte: IBGE, Censos Agropecuários 1975/2017.

⁽¹⁾ As críticas qualitativa e quantitativa dos dados ainda não foram concluídas, razão pela qual os resultados ora apresentados são preliminares, estando, portanto, sujeitos a alterações posteriores. ⁽²⁾ Nas lavouras permanentes, somente foi pesquisada a área colhida dos produtos com mais de 50 pés na data de referência. ⁽³⁾ Datas de referência: para 1975, 1980, 1985 e 2006: 31.12; para 1995-1996: 31.07; e para 2017: 30.09. ⁽⁴⁾ Lavouras temporárias e cultivo de flores, inclusive hidroponia e plasticultura, viveiros de mudas, estufas de plantas e casas de vegetação e forrageiras para corte na data de referência. ⁽⁵⁾ Pastagens plantadas, em más condições por manejo inadequado ou por falta de conservação, e em boas condições, incluindo aquelas em processo de recuperação em na data de referência. ⁽⁶⁾ Matas e/ou florestas naturais destinadas à preservação permanente ou reserva legal, matas e/ou florestas naturais e áreas florestais também usadas para lavouras e pastoreio de animais na data de referência. ⁽⁷⁾ Efetivo de animais – animais existentes no estabelecimento na data de referência.

Os estados com maiores números de estabelecimentos de rebanhos bovinos são Minas Gerais (381.561), Bahia (291.978) e Rio Grande do Sul (260.650). Os que contêm os maiores rebanhos de bovinos do Brasil são Mato Grosso (24.118.840 cabeças), Minas Gerais (19.494.287) e Mato Grosso do Sul (18.159.792). Quanto aos bubalinos, Pará (4.064), Maranhão (1.928) e São Paulo (1.263) possuem os maiores números de estabelecimentos e Pará (320.784 cabeças), Amapá (223.893) e Amazonas (68.460) possuem os maiores rebanhos. Os rebanhos de caprinos estão em sua maior parte na Bahia (2.383.603 cabeças), Piauí (1.847.919) e Pernambuco (1.415.553) e, nesta ordem, esses também são os estados que possuem os maiores números de estabelecimentos destinados a criação de caprinos, com 70.082, 64.481 e 56.475 estabelecimentos, respectivamente. Referentes a ovinos, Bahia, Ceará e Piauí lideram em números de estabelecimentos (117.796; 68.323; 58.581, respectivamente) e Bahia, Rio Grande do Sul e Ceará em número de cabeças (2.860.432; 2.648.370; 1.813.979, respectivamente). O Brasil produziu 30 bilhões de litros de leite de vaca, 316 mil toneladas de queijo e requeijão e houve abate de 8 milhões de cabeças de bovinos (Tabela 2).

Tabela 2. Número de estabelecimentos e de cabeças de animais, em 2017*

País/Região/Estado	Animais							
	Bovinos		Bubalinos		Caprinos		Ovinos	
	Estabelecimentos	Número de cabeças	Estabelecimentos	Número de cabeças	Estabelecimentos	Número de cabeças	Estabelecimentos	Número de cabeças
Brasil	2.521.249	171.858.168	14.728	948.103	326.166	8.254.561	511.768	13.770.906
Norte	164.290	35.563.948	6.672	622.399	8.836	188.990	17.000	408.462
Rondônia	72.855	9.827.031	216	3.566	1.229	23.907	3.135	75.000
Acre	22.533	2.133.001	59	1.757	546	9.178	2.380	52.557
Amazônas	14.345	1.253.852	1.239	68.460	1.036	18.232	1.675	32.924
Roraima	6.822	674.501	10	170	455	10.798	1.116	28.979
Pará	97.012	15.298.613	4.064	320.784	4.193	95.192	6.352	156.057
Amapá	662	36.481	884	223.893	121	1.770	160	2.725
Tocantins	50.061	6.340.469	200	3.769	1.256	29.823	2.182	60.220
Nordeste	869.202	21.670.483	2.551	83.018	289.118	7.660.715	385.752	9.032.191
Maranhão	90.369	5.412.019	1.928	57.305	13.115	250.931	8.322	193.141
Piauí	69.745	1.428.093	26	546	64.481	1.847.919	58.581	1.665.125
Ceará	112.834	1.895.053	41	1.092	39.509	880.097	68.323	1.813.979
Rio Grande do Norte	38.104	757.945	13	1.311	10.303	281.795	18.945	532.179
Paraíba	80.012	1.050.021	34	676	29.549	545.994	26.941	506.190
Pernambuco	103.660	1.283.872	68	5.239	56.475	1.415.553	56.946	1.133.056
Alagoas	40.519	785.836	11	630	3.788	35.581	19.175	192.299
Sergipe	41.981	886.459	16	186	1.816	19.242	10.723	136.269
Bahia	291.978	8.171.185	414	16.033	70.082	2.383.603	117.796	2.860.432
Sudeste	552.785	31.449.257	2.495	125.933	10.089	143.502	14.008	429.730
Minas Gerais	381.561	19.494.287	1.107	48.552	5.478	69.855	5.693	140.419
Espírito Santo	32.649	1.647.278	43	3.554	881	12.666	999	29.851
Rio de Janeiro	32.051	1.979.021	82	5.520	1.150	15.526	918	24.146
São Paulo	106.524	8.328.671	1.263	68.307	2.580	45.455	6.398	235.333
Sul	561.836	23.564.736	1854	82.212	13.299	152.550	76.536	3.304.397
Paraná	169.176	8.395.422	658	25.434	5.410	70.510	17.535	434.518
Santa Catarina	132.010	3.725.827	305	11.016	2.554	23.590	12.068	221.509
Rio Grande do Sul	260.650	11.443.487	891	45.762	5.335	58.450	46.933	2.648.370
Centro-Oeste	273.136	59.609.744	1.156	9.487	4.824	108.894	18.472	595.628
Mato Grosso do Sul	54.067	18.159.792	214	8.908	1.040	25.725	7.587	258.261
Mato Grosso	92.305	24.118.840	319	11.46	2.027	45.509	7.281	232.462
Goiás	125.342	17.268.103	618	13.808	1.672	36.323	3.343	93.036
Distrito Federal	1.422	63.009	5	579	85	1.337	261	11.869

Fonte: IBGE (2018). *Dados preliminares do levantamento de 2017.

Figura 4. Densidade de ruminantes, entre os estados brasileiros (dados relativos à data de referência 30/09/2017)

Fonte: IBGE (2018).

Figura 5. Evolução da taxa de lotação animal (bovinos) em relação à área total de pastagens - Brasil - 1940/2017

Fonte: IBGE (2018).

Figura 6. Dados preliminares sobre números de cabeças de bovinos por área de pastagem, em todos os estados da federação, em 2017

Fonte: IBGE (2018).

Observa-se na figura 5 que houve aumento na taxa de lotação a partir do ano de 1985. Isso deve-se ao avanço no estudo de melhoramento genético e maior disseminação de análises químicas das plantas. O número médio de cabeças de bovinos por área de pastagem é atualmente 1,15, 0,05 a mais que o verificado em 2006. Em 2006 a maior parte das pastagens cultivadas eram fomadas por gramíneas do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) e representavam

64% da área total (IBGE, 2012). Os dados de 2017 mostram que houve diminuição de área cultivada e aumento de grandes estabelecimentos (iguais ou maiores do que 1000 ha), indicando aumento de produtividade das pastagens e de competitividade nas atividades agropecuárias – produtores pouco competitivos saindo da atividade ou se aliando a maiores (IBGE, 2018).

Figura 7. Evolução do abate de bovinos por trimestre – Brasil – trimestres 2012-2017

Fonte: IBGE (2018).

O Brasil se estabeleceu no cenário econômico mundial como país produtor de matérias primas, mais especificamente, de commodities, que representam aproximadamente 65% das exportações brasileiras (UNCTAD, 2014). A grande maioria dos animais criados no Brasil, para corte, leite, lã e couro, provém de sistemas extensivos ou semi-extensivos, o que explica a flutuação anual no número de abates na Figura 7, principalmente até o ano de 2015. Os sistemas confinados estão lentamente aumentando, pela rapidez de terminação de animais para corte e pelo grande aumento da quantidade de produção leite (FERRAZ; FELÍCIO, 2010; IBGE, 2018).

Por outro lado, há alguns anos essa tendência da preferência pelo confinamento vem diminuindo em grande parte do mundo. Isso porque, a carne *grass-fed* (boi verde ou boi de capim), termo inglês utilizado para certificar que bovinos que originaram aquela carne foram criados inteiramente a pasto, em um sistema mais natural e livre do que o confinamento, e sem hormônios, vem sendo mais procurada pelo consumidor, que está disposto a pagar mais por ela. A mesma tendência se estende para consumidores de produtos lácteos. Por esse motivo,

pesquisadores vêm estudando as diferenças nos produtos finais, quando a dieta é a base de pastagens ou tem alto consumo de grãos. Os resultados mostram que animais *grass fed* geram produtos finais nutritivamente superiores para humanos (REIS; COMBS, 2000; PONNAMPALAM; MANN; SINCLAIR, 2005; ALFAIA et al., 2009; DALEY et al., 2010).

3.4 *Brachiaria* spp.

Quando se opta por um sistema de produção de ruminantes a pasto, antes de ser decidida a gramínea a ser utilizada, deve-se levar em conta fatores como clima e microclima da região – incidência solar anual, quantidade e distribuição de precipitações, temperaturas médias ao longo do ano e características do solo – quantidade de matéria orgânica, nutrientes disponíveis e indisponíveis, erosão, lixiviação (PEZZOPANE et al., 2015).

Após, é importante conhecer as exigências de cada planta para que a escolha da espécie a ser cultivada, de acordo com os fatores supracitados, aliados às condições de manejo da pastagem, elevem ao máximo seu potencial produtivo para alimentar os rebanhos ao longo dos anos (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002). Algumas características e exigências de algumas gramíneas utilizadas comumente no Brasil são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Características forrageiras de algumas gramíneas tropicais

Espécie	Propagação	Cobertura do solo	Exigência nutricional	Tolerância				Forma de utilização
				Seca	Geada	Solo mal drenado	Solo ácido	
<i>Andropogon gayanus</i>	S	NE	B	B	R	F	B	P
<i>Brachiaria decumbens</i>	S	E	B	R	F	F	B	P,F
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	S	E	M	F	F	F	R	P,F
<i>Brachiaria humidicola</i>	S	E	B	F	R	B	MB	P,F
<i>Brachiaria brizantha</i>	S	E	M	R	F	F	B	P,F
<i>Brachiaria arrecta</i>	V	-	M	R	R	MB	-	P,F
<i>Brachiaria mutica</i>	V	E	M	R	F	MB	-	P,F
<i>Cenchrus ciliaris</i>	S	NE	A	MB	R	F	-	P
<i>Chloris gayana</i>	S	-	A	B	R	R	F	P,F
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	V	E	A	R	F	B	R	P,F
<i>Cynodon dactylon</i>	V	E	A	R	F	B	R	P,F
<i>Digitaria decumbens</i>	V	E	M	B	B	-	-	P
<i>Hiparrhenia rufa</i>	S	NE	A	F	F	F	R	P
<i>Melinis minutiflora</i>	S	E	B	R	F	F	B	P
<i>Panicum maximum</i>	S	NE	A	R	F	R	R	P
<i>Setaria sphacelata</i>	S	E	M	B	MB	B	R	P
<i>Penicetum purpureum</i>	V	NE	A	B	B	F	R	P,C

Fonte: Adaptado de Botrel; Novaes; Alvim (1998); Gobbi et al. (2005). Propagação: S=sementes. V=vegetativa; cobertura do solo: E=eficiente. NE=não eficiente; exigência nutricional: A=alta. M=média. B=baixa; tolerância: F=fraca. R=razoável. B=boa. MB=muito boa; formas de utilização: P=pastejo. F=feno. C=corte.

O capim da família Gramineae (ou Poaceae), subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, gênero *Brachiaria* é uma gramínea perene, cespitosa ou decumbente, dependendo da espécie. Em sua maioria é nativa da África tropical, considerada uma das melhores forragens para formação de pastos, pois cobre completamente o terreno em aproximadamente quatro meses, é resistente ao pisoteio e à estiagem, previne erosão, proporciona grande quantidade de forragem verde de boa aceitabilidade e bom valor nutritivo, dependendo do estágio de desenvolvimento em que é utilizada (IPEAN, 1968).

Cada espécie desse gênero é mais adaptada a uma região diferente, abrangendo diferentes climas, variações de temperatura e umidade, qualidade e profundidade de solo (SEIFFERT, 1980). De um modo geral, África, Austrália e América do Sul são regiões que mais a utilizam, porém há estudos para adaptabilidade em outras partes do mundo, como Vanuatu, Índia, Malásia, Tailândia e Indonésia (DWARI; MONDAL, 2011; HARE et al., 2015; LOW, 2015; LOUW-GAUME et al., 2017).

O Brasil é um território extenso, com grande diversidade de climas e solos. Isso possibilita a criação de animais das mais diversas formas, utilizando diferentes tecnologias e técnicas, para adaptação ao meio. Assim, órgãos como a Embrapa e Institutos de Zootecnia (IZs) trabalham para ajudar agropecuaristas a utilizarem suas terras da melhor forma, de acordo com cada região e diferentes características de rebanho. Por sua adaptabilidade nos mais variados ambientes e com uma gama de espécies e cultivares, a *Brachiaria* sempre foi bastante estudada (IPEAN, 1968; ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002; PEREIRA; POLIZEL, 2016).

Pesquisas envolvendo várias espécies e cultivares testam a *Brachiaria* para melhoria de condição do solo (GICHANGI; NJARUI; GATHERU, 2017); sua associação com bactérias para autopreservação em solos áridos (MUTAI; NJUGUNA; GHIMIRE, 2017); sua produção e capacidade de suporte em sistemas de integração lavoura pecuária (MONTAGNER et al., 2018) bem como sistemas silvopastoris (DIAS-FILHO, 2006; PEZZOPANE et al., 2015) e até mesmo seu rendimento e digestibilidade cortada e ensilada (BERNARDES; SCHMIDT; DANIEL, 2015).

Expostos esses fatos, fica claro o porquê de a *Brachiaria* ser a principal forrageira de escolha para pastagens no Brasil. Também fica clara a necessidade de se continuar estudando esta gramínea e continuar investindo em educação continuada no campo, para que haja conhecimento do seu valor nutricional, maior rendimento e aproveitamento da mesma (XAVIER et al., 2002; KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006; EUCLIDES et al., 2009; SANTOS et al., 2015; GOBBI et al., 2018).

3.5 A parede celular vegetal

Parede celular (PC) é um termo histológico usado para definir um conjunto de compostos químicos (polissacarídeos, proteínas) que são responsáveis por manter a forma da célula (controlar sua expansão), fornecer resistência mecânica (proteção), regular os transportes entre células e armazenar reservas de alimentos. São componentes presentes na célula vegetal que são biossintetizados por genes dela própria (IIYAMA et al., 1993).

A parede celular é composta por duas camadas, chamadas parede celular primária e parede celular secundária. A relevância desta última para a agronomia, ciência animal, fitopatologia, silvicultura e biologia molecular levou muitos pesquisadores a enumerar, quantificar e analisar estruturalmente os componentes da estrutura secundária da PC (KEEGSTRA et al., 1973; STEVENSON et al., 1986) (Figura 8).

Figura 8. Esquema da disposição dos componentes das células

Fonte: Adaptado de Khalil; Alwani; Omar (2006).

A parede celular primária é tipicamente composta por microfibrilas de celulose (9-25%) e uma matriz penetrante de hemicelulose (25-50%), pectinas (10-35%) e proteínas (10%). Aproximadamente 90% dela é formada por carboidratos (maioria pentoses e hexoses) e 10% é proteína. A celulose forma a estrutura da PC enquanto a hemicelulose liga os polímeros não-celulósicos e celulósicos (KEEGSTRA et al., 1973). As pectinas fornecem ligações cruzadas e suporte estrutural enquanto as proteínas podem funcionar estruturalmente (extensina) ou enzimaticamente (celulose sintase, hidrolase, oxidase; PRESTON, 1979; FRY, 1986).

A celulose na PC primária tem arranjo aleatório e forma diferentes ligações com o polissacarídeo hemicelulósico (xilanos, mananos, galactanos, ou suas combinações). Dentre as proteínas, há enzimas necessárias para o espessamento (celulose sintase), modificação

(hidrolases) e lignificação (oxidases) da PC, durante o processo de crescimento da PC secundária (GIDDINGS; BROWER; STAEHELIN, 1980; HERTH, 1985).

Durante o crescimento celular, há uma reorganização da PC. Esse fato permite inclusão de lignina na parede e fortalecimento de sua matriz. Em gramíneas, a ordem de máxima deposição dos componentes da PC é: hemicelulose, celulose, seguidas pela lignina (até 14 dias após a deposição de hemicelulose máxima) (BIDLACK; BUXTON, 1992). Para definição, as paredes secundárias são derivadas de paredes primárias por espessamento e inclusão de lignina na matriz (HATFIELD, 1989).

Figura 9. Esquema mostrando como a parede celular das plantas forrageiras se desenvolve

Fonte: Adaptado de Jung; Allen (1995).

A PC secundária das plantas usualmente contém celulose (40-80%), hemicelulose (10-40%) e lignina (5-25%). Em gramíneas, geralmente são 45-60% de celulose, 20-40% de hemicelulose e 5-10% de lignina (BIDLACK, 1990). Celulose e hemicelulose ficam mais organizadas na PC secundária do que na primária (Figura 11) (HATFIELD, 1989) e o arranjo desses componentes permite que o vínculo entre as microfibrilas de celulose e a lignina sejam como hastes de aço embutidas em concreto (HOUTMAN; ATALLA, 1995).

O controle e o desenvolvimento da PC durante o crescimento das plantas ainda não são completamente elucidados, mas sugere-se que a lignina é formada na PC. A lignificação acompanha a formação da PC secundária e começa com a geração de radicais livres que reagem espontaneamente para formar lignina e também algumas ligações com polissacarídeos.

Ligações entre radicais livres de monômeros de lignina e polissacarídeos podem produzir a lignina chamada “*non core lignin*”, enquanto a polimerização de radicais livres monoméricos resulta em ligninas altamente condensadas, chamadas “*core lignin*” (BOLWELL, 1988; JUNG; DEETZ, 1993) (Figura 10).

Figura 10. Ligações entre hemicelulose e lignina, na região “*non core*”

Fonte: Adaptado de Pande; Roy, 1996; Seca et al. (1998).

Monômeros de lignina se originam da ação da tirosina amônia liase em gramíneas, além de outras enzimas relacionadas a fenilpropanóides, que direcionam metabólitos para, entre outras coisas, biossíntese de lignina. O metabolismo dos fenilpropanóides levam à síntese dos monômeros de lignina: ácido β -cumárico, ácido ferúlico, ácido diferúlico, ácido sinápico, ácido cinâmico e p-ácido-hidroxibenzóico. Após, enzimas catalisam a formação de três álcoois – p-cumaril, coniferil e sinapil – que interagem e polimerizam para formar lignina na PC secundária (HAHLBROCK; GRISEBACH, 1979; LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

Celulose e hemicelulose são ligadas por ligações de pontes de hidrogênio, enquanto hemicelulose e lignina (“*non core*”) são ligadas por ligações éster e éter na PC secundária. O fato de as ligações entre monômeros de lignina e frações hemicelulósicas (ligno-hemicelulósicas) serem diversas e complexas, torna as conceituações estereotípicas das estruturas da PC para todas as plantas extremamente difíceis. Estudos com gramíneas feitos com objetivo de compreender melhor essas ligações ligno-hemicelulosicas mostraram que ligações tipo éster entre lignina “*non core*” e arabinose são as mais comuns (HARTLEY, 1972; MORRISON, 1974; CHESSON; GORDON; LOMAX, 1983; ATSUSHI; AZUMA; TETSUO, 1984; SCALBERT et al., 1985; MUELLER-HARVEY et al., 1986).

Figura 11. Desenho esquemático da parede celular de plantas

Fonte: adaptado de Giddings; Brower; Staehelin, (1980); Bidlack; Malone; Benson, (1992); Nojiri; Kondo, (1996); Mohnen; Bar-Peled; Somerville, (2008).

3.5.1 Fibra: alguns métodos para sua quantificação

Van Soest, em 1994, classificou os componentes da parede celular das plantas (lignina, celulose, hemicelulose, pectina, algumas proteínas, substâncias nitrogenadas lignificadas, ceras, cutina e minerais) em dois grupos. O primeiro é o da matriz insolúvel, com ligações fortes, covalentes, composto por lignina, celulose e hemicelulose – os carboidratos estruturais. O segundo, mais solúvel, formado por pectina, ceras, açúcares e proteínas, não apresentam ligações covalentes com a matriz lignificada e, portanto, são completamente fermentescíveis no rúmen – os carboidratos não estruturais.

À medida em que a maturidade da gramínea forrageira aumenta, há aumento de parede celular na planta e diminuição de sua digestibilidade. Ainda, partes da planta são mais digestíveis do que outras, por exemplo, o colmo é menos digestível do que a folha; e partes

mais inferiores da planta são menos digestíveis do que as mais superiores, quando em estágio vegetativo (WILMAN; ALTIMIMI, 1982).

Fibra, diferente de parede celular, é um termo nutricional, biológico, que diz respeito aos componentes dos alimentos que possuem baixa solubilidade em sistemas de solventes químicos específicos obtendo menos digestibilidade relativa do que carboidratos não fibrosos. Sua definição está ligada ao método laboratorial escolhido para sua obtenção, por exemplo, a Fibra em Detergente Neutro (JUNG; ALLEN, 1995).

Os nutrientes das plantas forrageiras são utilizados pelos animais ruminantes e convertidos em alimentos destinados ao consumo humano. Para o máximo proveito destes nutrientes, as plantas precisam ser avaliadas quanto a sua qualidade, para que seja formulada uma dieta adequada para consumo dos animais (LANZAS et al., 2007).

Para isso, pesquisadores na década de 60 apresentaram uma forma de caracterização de plantas forrageiras em porção solúvel e não solúvel em soluções de reagentes específicos, os detergentes. A rapidez na obtenção do teor de fibra dos volumosos, levou a rápida aceitação dessa metodologia por técnicos e pesquisadores.

A porção da planta insolúvel em solução ácida de Brometo de cetil trimetil amônio foi denominada Fibra em Detergente Ácido (comumente chamada de FDA), constituída por lignina, celulose e minerais. Conteúdo celular (proteínas, carboidratos solúveis e gorduras), hemicelulose, proteínas são solubilizados neste método (VAN SOEST, 1963). Já a porção da planta insolúvel em solução neutra de Sulfato lauril de sódio foi denominada Fibra em Detergente Neutro (FDN), composta por lignina, celulose, hemicelulose, proteínas e minerais (VAN SOEST; WINE, 1967).

Porém, essas técnicas têm algumas falhas, como no que diz respeito à aceitação da FDN como representante da fibra total de alimentos vegetais: a pectina está presente na parede celular vegetal, portanto deveria ser preservada no procedimento da FDN, o que não acontece. Os próprios autores comentam que a FDN divide a matéria seca dos alimentos muito próximo ao ponto que separa os constituintes nutricionalmente disponíveis daqueles que são incompletamente disponíveis, que só o são por meio de fermentação microbiana. E a pectina está incluída no primeiro deles (VAN SOEST; WINE, 1967).

Ainda nesse assunto, há as evidências de que no processo de obtenção da FDA, parte da lignina se dissolve pela ação do detergente, uma vez que é intimamente ligada à hemicelulose (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987; LOWRY et al., 1994). Este é um grave problema.

Visto isso, foi criada outra maneira de se obter a parede celular das plantas, o procedimento Parede Celular (PC). Este preserva praticamente todos os componentes dessa

parte da planta, porém é mais laborioso e demorado do que os anteriormente citados (MORRISON, 1972a, 1972b; IYAMA; WALLIS, 1990; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004; QUEIROZ et al., 2008) (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da composição dos resíduos vegetais, após exposição à detergentes químicos

Procedimento	Conteúdo celular	Lignina	Celulose	Hemicelulose	Pectina	Proteína Bruta	Minerais
Parede Celular	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fibra em detergente neutro	x	✓	✓	✓	x	✓	✓
Fibra em detergente ácido	x	1/2	✓	x	✓	x	✓

Fonte: adaptado de Van Soest, (1963), (1967); Morrison, (1972a).

3.5.2 Celulose

A celulose é um polímero de cadeia longa semelhante a cordões, formada pela união de β -glicoses que são tipicamente ligadas por forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio (estrutura cristalina). Nas regiões cristalinas, as cadeias são ordenadas paralelamente. Elas são separadas por regiões menos ordenadas, as amorfas. Estas têm baixa resistência, sendo mais propícias a ataques químicos e biológicos (FAN; LEE; BEARDMORE, 1980) (Figura 12).

As estruturas cristalinas contêm cerca de 500 a 14.000 moléculas de glicose β -1,4 ligadas. Por sua vez, essas formam a fibrila elementar que são as protofibrilas e as junções destas, formam as microfibrilas (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992; LYND et al., 2002; SOMERVILLE, 2006). Sugere-se que a celulose é formada por enzimas plasmáticas, polissacarídeos de matriz e proteínas no sistema de citomembrana (DELMER, 1987).

Ela é o carboidrato mais abundante da parede celular e da Terra e pode chegar a representar um terço de toda a planta. Outros polissacarídeos e lignina são intimamente associados a ela, porém não há evidência de que a celulose tem ligações covalentes com eles. Estudos demonstraram que ela tem papel central na formação da parede celular e uma deficiência da célula em produzi-la pode alterar a organização espacial de polissacarídeos não-celulósicos e da lignina (GIGER-REVERDIN, 1995; TURNER; SOMERVILLE, 1997).

Figura 12. Regiões cristalina e amorfa da celulose

Fonte: adaptada de Kvien; Tanem; Oksman (2005).

3.5.3 Hemicelulose

A hemicelulose é um conjunto heterogêneo de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização muito inferior ao da celulose (50 a 250) que variam enormemente entre diferentes plantas (VAN SOEST, 1994). A cadeia principal é análoga à da celulose, porém as ramificações as tornam diferentes (BIELY, 1985). Os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis, diferentemente da celulose (PÉREZ et al., 2002).

Existem evidências de que, em média, o número de polissacarídeos diferentes, caracterizados como hemicelulose nas espécies vegetais, não excede três ou quatro. É composto por pentoses (xilanas - D-xiloses ligadas por ligações β 1-4; e arabinoses - derivado de ácido urônico), hexoses (galactose, manose, glicose) e açúcar ácido (acético) (CHESSON, 1993; SAHA, 2003). São classificados de acordo com o açúcar mais encontrado na cadeia principal e na ramificação lateral. Interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade à estrutura (RAMOS, 2003).

As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos, os glucuronoarabinoxilanos e os mananos. Em todos os casos, há uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente, que podem ser ramificadas com diferentes monossacarídeos. Os glucuronoarabinoxilanos são os mais encontrados nas paredes celulares das gramíneas (família Poaceae – planta de milho, braquiárias) (BUCKERIDGE, 2010).

As xilanas são encontradas entre as moléculas de lignina e as fibras de celulose, complexadas e covalentemente ligadas em vários pontos de sobreposição das bainhas de lignina. Produz um invólucro ao redor, interpondo os fios de celulose por pontes de hidrogênio.

Este complexo é importante para manter a integridade da celulose protegendo-a contra o ataque das celulasas (SILVEIRA et al., 1999).

A digestibilidade da hemicelulose é diretamente ligada à quantidade de celulose na planta, e inversamente correlacionada com o grau de lignificação. Além disso, a hemicelulose é o composto que mais se liga intimamente à lignina (SULLIVAN, 1966). Ruminantes conseguem digerir celulose e hemicelulose (VAN SOEST, 1994) mas a digestão ocorre mais rapidamente quando a proporção de hemicelulose é maior, principalmente em gramíneas (SMITH; GOERING; GORDON, 1972).

A digestão ruminal de hemicelulose pode ser limitada, escapando para o intestino grosso, onde é mais digerida. Isso pode ser por causa da celulose ligada à hemicelulose, ou pelo fato de as xilanas não poderem ser atacadas enquanto existe o grupo arabinosil em sua cadeia (FRANCIS et al., 1978). Este grupo arabinosil pode ser sensível ao ácido gástrico disponibilizando-o para o trato digestório inferior (Figura 13)(VAN SOEST, 1994).

Figura 13. Exemplo de hemicelulose nas plantas e uma de suas possíveis ligações com a lignina

Fonte: adaptado de Biely (1985); Puls; Schmidt; Granzow (1987); Collins; Gerday; Feller (2005).

3.5.4 Lignina

Após a celulose, a lignina é o segundo polímero mais abundante na natureza. Assim, estudos sobre as características desse componente da parede celular vegetal têm implicações muito mais amplas do que somente ser uma barreira à digestão dos animais – pesquisas estão

sendo feitas com lignina purificada, advinda de resíduos de fábrica de celulose e papel, com objetivo de selecionar bactérias desejáveis no rúmen, e consequentemente aumentar eficiência alimentar em bovinos de corte, sem utilização de antibióticos (WANG; MCALLISTER; LORA, 2017). Ainda, lignina é alvo de estudo não apenas no campo da nutrição animal (WILSON, 1994), mas também vem sendo testada para uso humano, como proteção contra os raios ultravioletas do sol, hidratantes, sabonetes (SAKAGAMI et al., 2012; NANBU et al., 2013) e também antioxidantes para lipídeos alimentares (SHADIDI; WANASUNDARA, 1992; PAN et al., 2006). Além disso, vem sendo testada para propriedades anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas (WANG et al., 1999; MUNAKATA et al., 2012; SALLEH; ISMAIL; IBRAHIM, 2015).

Para tanto, é preciso conhecer a lignina. Componente da parede celular de plantas vasculares, a lignina (do latim “*lignum*”, madeira) é um polímero altamente ramificado de compostos fenilpropanóides (derivados da fenilalanina) (FREUDENBERG; NEISH, 1968). Há indícios de que o processo de lignificação surgiu na Terra há 430 milhões de anos, para que as plantas se adaptassem à vida terrestre. As funções principais da lignina são permitir que a planta cresça sem perder sua estrutura – suporte mecânico – e defesa contra pragas e microrganismos. Esse papel está relacionado ao modo como a lignina interage com outras moléculas da parede celular, fortalecendo toda a estrutura (BOUDET; GRIMA-PETTENATI, 1996).

Ligninas são advindas da polimerização de subunidades monoméricas conhecidas como monolignóis. Estes são compostos fenilpropanóides C6-C3, que se diferenciam somente pelo grau de substituição do anel fenílico (metoxilação) (Figura 14). Podem existir três monolignóis diferentes no polímero de lignina: álcool p-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. Eles dão origem às unidades hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) do polímero de lignina, respectivamente (RALPH; HELM, 1993; BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Figura 14. Esquema simplificado de precursores e subunidades da lignina

A quantidade de lignina existente e sua distribuição espacial (tridimensional) variam muito entre espécies, entre plantas da mesma espécie e em diferentes partes da planta. Isso obstaculiza seu estudo (ROGERS; CAMPBELL, 2004; RUBIN, 2008).

3.5.4.1 Lignina e a indigestibilidade da fibra

A relação negativa entre digestibilidade da fibra de forragens e sua concentração de lignina tem sido observada há mais de 150 anos (WOODMAN; STEWART, 1932; DEHORITY; JOHNSON; CONRAD, 1962; D. N. MOWAT, M. L. KWAIN, 1969; ALLINSON; OSBOURN, 1970; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004; FUKUSHIMA et al., 2015). À medida que uma cultura forrageira se torna mais madura, seu teor de lignina vai aumentando gradativamente e sua digestibilidade, diminuindo (REEVES, 1987). Assim sendo, a lignina está entre os componentes químicos mais importantes relacionados à digestibilidade de forragens e pode desempenhar importante papel como indicador para avaliação da digestibilidade ou do valor nutritivo das forragens. (WOODMAN, 1927; KONDO; MIZUNO; KATO, 1987).

Um ponto interessante é o fato de que nutricionalmente a quantidade de lignina é relevante, pois pode indicar a qualidade da forragem a ser utilizada pelos animais. A lignina reduz a proporção da fibra em detergente neutro potencialmente digestível das forragens pela blindagem exercida sobre os polissacarídeos da parede celular (JUNG; ALLEN, 1995). Porém, deve-se também considerar que quando plantas diferentes têm a mesma maturidade, o perfil da lignina em seu interior pode variar, o que pode levar a digestibilidades diferentes (JUNG; ALLEN, 1995; BRITO; RODELLA; DESCHAMPS, 2003).

Como mencionado anteriormente, a composição e a disposição da lignina podem diferir entre espécies, cultivares, frações e tecidos da planta, e isso pode fazer com que o impacto da lignificação sobre a digestibilidade oscile (JUNG; VOGEL, 1992). Por isso, há achados controversos na literatura, como baixa correlação entre a concentração de lignina e a digestibilidade da parede celular (HALIM et al., 1989; JUNG; CASLER, 1991), ou ainda a correlação positiva entre lignina e digestibilidade (JUNG; SMITH; ENDRES, 1994). Porém, esses achados supracitados foram com base em pesquisas específicas, como privação de água para as plantas ou genótipos selecionados. De modo geral, altas correlações negativas são consistentemente encontradas, quando a análise inclui várias espécies de gramíneas, em diferentes estádios de maturidade e com utilização da planta inteira (JUNG; ALLEN, 1995; PACIULLO et al., 2001; JUNG; ENGELS, 2002; FUKUSHIMA et al., 2015).

A lignificação da parede celular possivelmente pode limitar a fermentação microbiana ou a hidrólise enzimática dos polissacarídeos por três mecanismos: efeito tóxico dos componentes da lignina *core* e *non core* da PC na microbiota ruminal; impedimento estérico pelas ligações lignina-polissacarídeos, que limitam acesso de enzimas fibrolíticas à partes de carboidratos específicas, ou um ambiente hidrofóbico provocado pela lignina de arranjo tridimensional, que impede a ação de enzimas hidrofílicas que funcionam em meio aquoso (JUNG; DEETZ, 1993).

A lignina atua como barreira contra a ação das enzimas microbianas que digerem celulose e hemicelulose. Como resultado, há diminuição da taxa de degradação das mesmas e limitação de energia disponível para ruminantes (JUNG; VOGEL, 1986; JUNG; ALLEN, 1995). O acúmulo de lignina inicia-se da PC primária em direção à secundária (TERASHIMA et al., 1993), por esse motivo os microrganismos degradam as células das plantas do lúmen em direção à PC primária (ENGELS, 1989; WILSON, 1994) (Figura 15).

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura mostrando bactérias celulolíticas ruminais e fibras de celulose. Algumas bactérias fixam-se e atuam paralelamente, formando estrias, outras não tem disposição organizada

Fonte: reproduzido de Weimer, (1993).

Há dificuldade em relatar qual efeito real da composição de lignina sobre a digestibilidade da fibra, mais especificamente da FDN. Assume-se que o potencial aumento da digestibilidade deve-se à menor quantidade de lignina em um material somada ao aumento na proporção de subunidades de lignina do tipo guaiacil e siringil (THORSTENSSON; BUXTON; CHERNEY, 1992; SABALLOS et al., 2008, 2012).

Deschamps e Ramos (2002) mostraram que gramíneas possuem maior quantidade de ácidos fenólicos em relação às leguminosas. Esses ácidos – p-cumárico e ferúlico – ligam a lignina à hemicelulose, na parede celular, dificultando sua degradação (HATFIELD; RALPH; GRABBER, 1999). Microrganismos conseguem digeri-los (enzima ácido fenólico esterase), porém o processo é demorado. Isso poderia explicar a maior taxa (rapidez) de digestão das leguminosas em relação às gramíneas, porém, no fim do processo (extensão total da digestão), gramíneas são mais digeridas (GRABBER; RALPH; HATFIELD, 1998).

Isso pode ser devido à presença de outros compostos, os taninos condensados, mais presentes nas leguminosas, ou ao fato de compostos nitrogenados nas gramíneas estarem numa forma mais solúvel, enquanto nas leguminosas se apresentam na forma de proteínas. Outro fenômeno que deve ainda ser considerado é a interligação dessas proteínas com outras estruturas da parede celular como lignina, celulose e hemicelulose, tornando-os mais resistentes à digestão (REED et al., 1982).

Voltando às gramíneas, com a degradação das ligações ésteres pela enzima ácido fenólico esterase, acontece a proximidade entre cadeia de ferulato e a cadeia principal de

hemicelulose, pela ligação éter, não deixando desta maneira que a enzima esterase atue mais, diminuindo a extensão e não a taxa da digestão dos polissacarídeos (JUNG; DEETZ, 1993). Isto porque as ligações éteres são degradadas com a presença de O_2 , o que não é o caso do ambiente ruminal. Ou seja, com a progressão da digestão, aumenta-se a dificuldade em se digerir os carboidratos estruturais da PC, que ficam fortemente ligados à lignina (HIGUCHI et al., 1967; HIGUCHI; ITO; KAWAMURA, 1967; JUNG; ALLEN, 1995).

O clima durante estágios de crescimento da planta interfere na quantidade de lignina depositada em seus tecidos. Altas temperaturas durante o crescimento das forrageiras favorece diminuição do conteúdo celular e aumento do teor de PC (e de lignina), resultando assim, em queda de digestibilidade. Por outro lado, a qualidade de plantas forrageiras de clima tropical e temperado decresce em função da diminuição da luminosidade. O sombreamento diminui os teores de carboidratos solúveis das folhas e aumenta os de PC (Wilson, 1982; Van Soest, 1994).

A compreensão do impacto dessas relações químicas específicas na degradação da PC de culturas agrônômicas no ambiente ruminal será necessária para avançar o conhecimento em nutrição de ruminantes e fisiologia vegetal, e para aplicação precisa de técnicas genéticas moleculares tanto na microbiota ruminal quanto na fisiologia vegetal (JUNG; DEETZ, 1993).

Portanto, para o nutricionista é importante conhecer o valor de lignina da forragem e da dieta, porque é bem aceito que a lignina e suas ligações com os carboidratos da parede celular são os principais fatores responsáveis por limitar a digestão ruminal e intestinal das forrageiras (BESLE; JOUANY; CORNU, 1995).

3.5.4.2 Métodos para quantificação de lignina em plantas forrageiras

Acurada determinação da concentração de lignina em uma amostra vegetal pode ser útil para estimar a extensão da digestão da fibra pelos ruminantes (AKIN et al., 1977). O desafio para adequado fornecimento de fibras ao formular uma dieta é encontrar um método, o qual a análise seja simples e ao mesmo tempo obtenha mais alta repetibilidade possível (CACCAMO et al., 2014).

Os métodos utilizados para medição de componentes da PC, em nutrição de ruminantes são agrupados em três categorias principais: métodos diretos ou gravimétricos; métodos de fracionamento dos constituintes da PC; e métodos físico-químicos, como colorimétricos, cromatográficos e de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (NIRS) (GIGER, 1985; GIGER-REVERDIN, 1995).

As metodologias disponíveis para quantificar o teor de lignina em plantas forrageiras dividem-se em dois grupos (NIRS será abordado mais adiante): os métodos gravimétricos e os não gravimétricos. No primeiro grupo, basicamente o procedimento baseia-se em obter o peso inicial da amostra seca e moída, separar a lignina dos demais componentes do vegetal e pesar a amostra final (PHILLIPS, 1934). Este grupo é representado pelos procedimentos: lignina detergente ácido (LDA) (VAN SOEST, 1963), lignina permanganato de potássio (LP) (VAN SOEST; WINE, 1968), e o lignina Klason (LK) (THEANDER; WESTERLUND, 1986). Porém, estes métodos de natureza gravimétrica nem sempre refletem o real valor da lignina (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004).

Um método não gravimétrico, mas sim colorimétrico, proposto por Johnson et al. (1961), que mais tarde foi adaptado para uso em forragens por Morrison (1972a,b), parece ser mais aceitável, já que os métodos gravimétricos utilizam como informação o total que sobrou após os procedimentos, e não detectam componentes fenólicos solúveis (lignina) separadamente (Fahey et al., 1979). Resumidamente, neste procedimento, o teor de lignina dos volumosos pode ser medido após solubilização da lignina em solução de 25% de brometo de acetila e 75% de ácido acético. Posteriormente a solução contendo lignina é colocada em um aparelho espectrofotométrico e sua absorbância é medida com luz ultravioleta a 280 nanômetros (nm) (FUKUSHIMA; DEHORITY; LOERCH, 1991; GIGER-REVERDIN, 1995)(Figura 16).

Figura 16. Aparelho Biochrom Libra S50 UV/Vis Spectrophotometer (190 a 1100 nanômetros), a lignina é medida a 280 nanômetros

Fonte: Guimarães, (2019).

Há interesse em alterar a quantidade de lignina, bem como sua composição nos vegetais, por várias razões, como facilitar a polpação na indústria de papel e celulose, produzir com mais eficiência combustíveis e produtos químicos a partir de recursos renováveis, oferecer alimento mais digestível para ruminantes (PARISI, 1989; CHUM; JOHNSON; BLACK, 1990; JUNG; BUXTON, 1994; VOGEL; SLEPER, 1994; STREFFER, 2014; CHEN; WAN, 2017; CLINE; SMITH, 2017). Porém, o resultado dos esforços é limitado se não houver um método que caracterize o material com maior precisão e exatidão, e quantifique a lignina, nas plantas.

Partindo-se de uma visão nutricional e funcional, os métodos para quantificação de lignina em uma amostra de forragem devem ser vistos como uma forma de verificar a porção da ração que prejudica a digestão dos carboidratos fibrosos. A partir dessa visão, mensurar essa barreira à digestão, ou seja, relacionar o valor obtido de lignina com a digestão ruminal da mesma amostra, é mais importante do que avaliar os valores absolutos das análises de lignina (JUNG; ALLEN, 1995).

É importante ressaltar que o método que estabelece a melhor relação entre o teor de lignina e a digestibilidade ruminal da fibra de forrageiras tropicais permanece indefinido, portanto, até hoje nenhum método poderia ser considerado padrão, não ambíguo nos resultados (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005).

Os métodos basicamente surgiram por necessidade da indústria madeireira e foram sendo adaptados para estimativa em plantas forrageiras (HIBBERT, 1939). Dentre os métodos disponíveis para determinar lignina em amostras de plantas forrageiras tropicais, o LDA tem sido o de escolha para a maioria dos pesquisadores (HATFIELD et al., 1994).

Resumidamente a LDA é obtida a partir da FDA (ver Tabela 4). Após o procedimento de obtenção da FDA, a amostra é submetida a uma solução de 72% de ácido sulfúrico (VAN SOEST, 1963). Para a LK, primeiro é feita a Fibra Dietética (celulose, hemicelulose, pectina, lignina, proteína bruta da parede celular e matéria mineral ficam na amostra), após, a amostra também fica submergida na solução de 72% de ácido sulfúrico (THEANDER; WESTERLUND, 1986). Nestes dois métodos, teoricamente o que sobra é a lignina, que é mensurada por diferença de peso anterior e posterior. No método LP, é realizada a FDA e então, a lignina da amostra é submetida à oxidação pelo reagente permanganato de potássio (VAN SOEST; WINE, 1968).

Porém, estes métodos apresentam muitas falhas no que diz respeito à análise de plantas forrageiras. Por exemplo, o resíduo de proteína (nitrogênio) na Fibra Dietética usada para realizar LK não é solubilizada, superestimando a quantidade de lignina mensurada. Este

problema é ainda maior em leguminosas (NORMAN; JENKINS, 1934). Então, Peter Van Soest em 1967, propôs o método LDA como alternativa para sanar este erro.

Para isso, como dito, é utilizada a FDA, que solubilizaria o nitrogênio. Entretanto, ao ser realizado o procedimento FDA, pelo fato de a lignina estar intimamente ligada à hemicelulose da PC, parte dos componentes fenólicos é perdida no processo, subestimando a quantidade de lignina na amostra final, e este erro é mais acentuado em gramíneas (SHIMOJO; GOTO, 1984; KONDO; MIZUNO; KATO, 1987). Outro erro reside no fato de que no fim dos procedimentos LDA e LK, pode haver contaminantes não solubilizados pelas análises, como a cutina (FUKUSHIMA, 1989), que superestimaria o resultado.

Ainda sobre possíveis falhas dos métodos gravimétricos, a LP pode superestimar o valor de lignina, pois ao realizar a FDA, substâncias polifenólicas, taninos, pigmentos e proteínas continuam na amostra. Elas também vão reagir com a solução de permanganato de potássio, e serem medidas erroneamente como lignina, particularmente nas gramíneas imaturas (VAN SOEST; WINE, 1968).

Por outro lado, até hoje não foi mostrado que o método LBA apresente os tipos de problemas observados nos métodos gravimétricos. Fato é que cada um desses métodos resulta em um valor diferente de lignina em amostras de gramíneas (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005).

O método LBA vem se consolidando. Todavia, trabalhos ainda devem ser feitos com objetivo de aperfeiçoar a técnica, para que seja cada vez mais considerada e popularizada na comunidade científica. Como preparação fibrosa para o método LBA, vêm sendo estudadas a PC (originalmente utilizada) e a FDN. O motivo é o uso rotineiro do procedimento FDN entre os laboratórios, que não acontece com a técnica PC (SAVIOLI et al., 2000). Com resultados promissores, também testamos este procedimento no presente trabalho.

A escolha de somente um método analítico padrão para quantificação de lignina é dificultada pela realidade de não existir um material referência com o qual o resultado de um determinado método possa ser comparado. Nessa circunstância, é necessário emprego de meios auxiliares.

Ensaio de digestibilidade *in vitro* (através de aparelhos de laboratório), *in situ* (utilizando o rúmen de animais) ou *in vivo* (envolvendo uso de animais) têm sido utilizados como ferramentas coadjuvantes para auxiliar na determinação de um método analítico adequado, pois sabe-se que a correlação é negativa e alta entre teor de lignina em uma amostra e sua digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986; JUNG; MERTENS; PAYNE, 1997). Portanto,

quanto mais alta e negativa for a correlação, mais adequado será o método (FONNESBECK, 1976).

Em função da fidelidade para expressar os fenômenos observados em estudos de digestibilidade *in vivo*, da maior facilidade de execução e de ser uma análise menos onerosa, a técnica digestibilidade *in vitro* (DIV) é escolhida por vários pesquisadores (JUNG; VAREL, 1988; JUNG; VOGEL, 1992; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004), inclusive foi utilizada neste trabalho.

3.6 Espectroscopia em infravermelho próximo – NIRS: uma abordagem alternativa para a estimativa de componentes da forragem

Caracterização precisa de alimentos para animais de produção está se tornando cada vez mais necessária por vários motivos. As técnicas tradicionais de caracterização de alimentos para animais fornecem informações importantes sobre qualidade, porém a produção animal está passando por novos desafios, como a imposição por formulações de dietas que não apenas ofereçam o máximo custo-benefício entre alimentação e produção (venda do produto), mas também que reduzam o impacto ambiental negativo (SINCLAIR et al., 2014).

Por exemplo, é especialmente interessante prever a influência da dieta na partição de energia entre a deposição de gordura corporal e a secreção de leite em vacas leiteiras de alto mérito genético (FERRIS et al., 1999; DRACKLEY; DONKIN; REYNOLDS, 2006). Ainda, métodos precisos de avaliação são necessários em relação a legislações nacionais e internacionais, para haver regularização de circulação, comércio e inspeção de rações, e garantia de segurança referente a alimentos de origem animal (IAASTD, 2009).

Em países da América do Norte e Europa, a alimentação de animais confinados é intensiva e desafiadora, o que exige monitoramento constante da composição da dieta para garantir níveis coerentes para produção de leite e carne. Em países como Austrália e Brasil, onde a pastagem prevalece na maioria das propriedades pecuárias, os padrões de crescimento e qualidade dos pastos variam muito. Por isso, os vereditos sobre comprar suplementação alimentar ou não, quando e sua quantidade, devem ser dados em tempo real. Seleção genética para maior valor nutritivo de forrageiras vem sendo considerada como fator importante por muitos agropecuaristas, e é comumente necessário testar um grande número de forragens e cultivares (DEAVILLE; FLINN, 2000).

Geralmente as análises são demoradas, como por exemplo os caros experimentos *in vivo*, somente viáveis em institutos científicos. Com intenção de aumentar a praticidade na

caracterização de rações em larga escala, pesquisadores como Baumgardt; Taylor; Cason, (1961), Tilley; Terry, (1963) e Givens et al., (1995) desenvolveram equações para prever resultados *in vivo*, baseados em análises químicas e/ou técnicas *in vitro* significativas do ponto de vista biológico, utilizando microrganismos ruminais e enzimas comerciais. Apesar de essa técnica ser tanto simples quanto acurada na predição, ela é relativamente laboriosa e lenta, com resultado em aproximadamente uma semana.

A espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (*near infrared reflectance spectroscopy*) possui algumas vantagens principais:

- rapidez, com medidas variando de 30 segundos a 3 minutos;
- fácil preparo da amostra, normalmente com apenas moagem para homogeneização;
- possibilidade de múltiplos resultados com somente uma amostra moída, já que há medição de muitos comprimentos de onda, vários analitos (MS, MM, FDN, FDA...) podem ser medidos ao mesmo tempo;
- não destruição da amostra, ela pode ser analisada novamente ou ser utilizada em outra análise;
- nenhum reagente químico é necessário, portanto nenhum resíduo é produzido;
- uma vez calibrado, sua precisão é alta e é simples de operar.

Portanto, pode fornecer ajuda necessária para esse mercado mais exigente e imediatista. A técnica da espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) tem sido descrita como "a técnica analítica mais exequível e excitante para atingir as indústrias agrícola e alimentícia desde que Johann Kjeldahl introduziu o teste de Kjeldahl" (WILLIAMS E NORRIS, 1987).

Como toda técnica analítica, o NIRS possui algumas limitações a serem consideradas. As desvantagens do método NIRS são:

- requisitos de instrumentação caros e de alta precisão, pois pequenas mudanças na refletância em comprimentos de onda específicos serão mensuradas;
- procedimentos de calibração são imprescindíveis. Estes são demorados e trabalhosos;
- alta complexidade na escolha dos tratamentos dos dados, o que exige profissional capacitado em análise multivariada e quimiometria;

- dificuldade de transferência de calibrações entre instrumentos. E ainda, muitas vezes, diferentes fabricantes usam diferentes procedimentos para tratamento de dados, o que dificulta ainda mais essa transferência.

Outro detalhe importante reside no fato de que um processo completo de calibração é necessário para cada constituinte de uma amostra, e uma calibração só é válida para o tipo de material que se usou. Tamanho e tipo de partículas, densidade, temperatura da amostra devem ser considerados (NORRIS, 1983; NORRIS, 1989). Por exemplo, no presente trabalho foi feita uma calibração para LDA, outra para LBA_{PC}, outra para LBA_{FDN} e assim por diante. E essas calibrações poderão ser usadas para esses analitos, somente para amostras de *Brachiaria* spp., secas e moídas, sob as mesmas condições deste experimento.

Outra informação importante é o fato de que para o processo de calibração é preciso a informação das análises referências, por exemplo, os resultados das amostras de lignina em *Brachiaria* pelos métodos tradicionais.

Também, é preciso sempre atualizar o modelo de calibração do aparelho, realizando, em uma pequena porcentagem das novas amostras que chegam, análises tradicionais via úmida, para atualizar a calibração do aparelho e ele sempre prever corretamente uma propriedade (matéria seca, lignina, etc) (DARDENNE; SINNAEVE; BAETEN, 2000; AGELET; HURBURGH, 2010).

3.6.1 Histórico NIRS

Os estudos da região do infravermelho próximo não são novos. O que ocorreu no Brasil e em outros países foi a introdução da tecnologia de forma errônea, o que fez com que os pesquisadores, técnicos e industriais não discernissem corretamente sobre o real avanço tecnológico que a técnica trazia. Após alguns anos e com o amadurecimento da percepção de que o NIRS poderia acelerar processos qualitativos e quantitativos, tanto na indústria quanto no meio acadêmico, esta tecnologia passou a ser novamente explorada, de forma mais organizada e integrada, pelas indústrias farmacêutica, alimentícia, petrolífera, química, agropecuária e órgãos públicos (BALABIN; SAFIEVA, 2008; SOUZA et al., 2012; EMBRAPA, 2013; FAHEY; NIEUWOUDT; HARRIS, 2018).

A descoberta da região de infravermelho foi feita por William Herschel, em 1800. Na ocasião ele utilizou um prisma de vidro contra o sol, e procurava responder o quanto de calor cada uma das cores refletidas pelo prisma, gerava. Porém, ele percebeu, usando um termômetro,

que também havia aumento de temperatura além da região vermelha visível, difratada pelo prisma. Surgia a região do infravermelho (no latim, *infra* significa abaixo de) (HERSCHEL, 1800).

Figura 17. Reprodução do aparato utilizado no experimento de Herschel, em 1800

Fonte: Herschel (1800).

Na primeira metade do século XX, o interesse pelo chamado “infravermelho fotográfico” ainda era aparente, mas a maior parte da atenção foi dedicada à região do infravermelho médio. Pesquisas durante a Segunda Guerra Mundial levaram ao desenvolvimento do detector fotoelétrico para a região NIR e, portanto, à possibilidade de construir espectrofotômetros NIR.

Na década de 1950, Dr. Karl Norris, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), começou a estudar as propriedades ópticas de materiais biológicos densos, como grãos, legumes, cérebro de carneiro, folhas, frutas (NORRIS; BUTLER, 1961; BENGERA; NORRIS, 1968), porém, problemas referentes à dispersão e interferência de outros constituintes ainda eram obstáculos.

Graças à espectroscopia de refletância e técnicas de regressão múltipla para calibração, esses problemas foram resolvidos e as primeiras calibrações práticas ocorreram na indústria de grãos, nos Estados Unidos (WILLIAMS, 1975) e no Canadá (HUNT et al., 1977) e o NIRS começou a ser usado como um método oficial de teste de proteína para o cultivo de trigo nesses países.

Em 1976, Norris et al. mostraram que o NIRS poderia ser utilizado também para prever o conteúdo de proteína e fibra, e a ingestão e digestibilidade de forragens em ovinos.

Isso foi o estímulo para o estabelecimento de um sistema de espectro-computador para pesquisa de forragem no Laboratório Regional de Pesquisa de Pastagens do USDA em colaboração com a *Pennsylvania State University*. Um monocromador de refletância, juntamente com o software para coletar, armazenar e processar os dados de NIRS foram projetados e mais tarde foi adaptado para uso no exterior.

Após a década de 80, com o advento de computadores menores, mais tecnológicos, fibra óptica, aparato mais moderno (novos sistemas de detecção, monocromador de varredura rápida, filtros sintonizáveis, matrizes de diodos, dispositivos de acoplamentos de carga, monocromador de varredura rápida) e maior capacidade de processamento de dados, os campos de aplicação do NIRS se estenderam e as possibilidades de ele atender às demandas de indústrias e comércio aumentaram. Consequentemente, a quantidade de publicações de pesquisas sobre o uso de NIRS em relação a alimentos para animais aumentou enormemente (STARK; LUCHTER; MARGOSHES, 1986; KIM; SINGH; KAYS, 2007; BALABIN; SAFIEVA, 2008).

Atualmente a miniaturização dos espectrômetros torna o NIRS poderoso instrumento analítico, com capacidade de atuação em ambientes hostis. Há possibilidade de medições a campo com sistema *on-line* integrado e os desenvolvimentos em quimiometria levaram a novos tratamentos de dados e algoritmos de calibração. Além da tradicional técnica de regressão linear múltipla, transformadas de Fourier e modelos não lineares são agora utilizados. Outro campo em expansão é o uso do NIRS para fins qualitativos, incluindo controle de qualidade (PASQUINI, 2018).

Figura 18. Bases da tecnologia NIRS

Fonte: Ferreira, (2015).

3.6.2 Instrumentação

A interação da radiação no infravermelho próximo com uma amostra pode ocorrer de várias maneiras. Transmitância, transflectância, refletância difusa, interactância e transmitância

difusa (através de meio de dispersão) são termos usados para se referir a diferentes arranjos geométricos quanto aos feixes de radiação (I), amostra (S) e sistema de detecção utilizados para coletar informações espectrais analíticas sobre uma certa amostra (Figura 19) (OZAKI, 2012; BETEMPS et al., 2014; HUANG; LU; CHEN, 2018).

Figura 19. Modos de medição empregados na espectroscopia NIR: transmitância (a); transflectância (b); refletância difusa (c); interactância (d) e transmitância através do meio de dispersão (transmitância difusa) (e)

Fonte: adaptado de Pasquini (2003). I_p : feixes de radiação incidente, antes de passar pela amostra (S); I_s : feixes de radiação depois de passar pela amostra.

Os equipamentos espectroscópicos para utilização da região do infravermelho (refletância difusa, que utilizamos) contêm geralmente cinco componentes: uma fonte de energia radiante; um seletor de comprimento de onda que isola uma região limitada do espectro para a medida; um ou mais recipientes para a amostra; um detector de radiação, que converte a energia radiante para um sinal elétrico mensurável; uma unidade de processamento e de leitura do sinal, composto nos instrumentos modernos, por um computador (NORRIS; HART, 1996).

Figura 20. Componentes básicos dos espectrofotômetros de refletância difusa

Fonte: Pasquini, (2018).

O material óptico destes equipamentos como espelhos e lentes é constituído de sais de haletos ou de materiais poliméricos, por não absorverem os comprimentos de onda utilizados na análise. A fonte de luz NIR pode ser uma lâmpada de tungstênio (como no equipamento utilizado no presente estudo) ou halogênio.

Há dois sistemas seletores de comprimentos de onda que podem ser utilizados nestes equipamentos: o monocromador, que pode possuir uma rede de difração ou um prisma, ambos responsáveis por dispersar a radiação em seus comprimentos de onda desejáveis para a análise; e o interferômetro, este produz padrões de interferência que contém a informação espectral do infravermelho e que pode ser decodificado por uma técnica matemática denominada transformada de Fourier, a qual foi utilizada neste estudo (vantagem de ser rápida e robusta).

Os detectores capazes de identificar comprimentos de onda na região do infravermelho são do tipo térmicos. Apresentam superfície enegrecida que absorve radiação infravermelha, aumentando consequentemente sua temperatura, que é convertida em sinal elétrico, que por sua vez é amplificado e medido (ROGALSKI, 2003).

O processador de sinal é um dispositivo eletrônico que amplifica o sinal elétrico vindo do detector, e efetua operações matemáticas sobre o sinal, tais como diferenciação, integração ou conversão logarítmica.

3.6.3 Princípios ou fundamentos da análise NIRS

A técnica NIR é baseada na espectroscopia vibracional e consiste na exposição de compostos orgânicos à radiação eletromagnética na região de comprimento de onda, que varia de 750 a 2.500 nanômetros (nm) (ou 13.333 a 4.000 cm^{-1}), para se obter os espectros de absorbâncias, definida em 1985 pela *American Society for Testing and Materials, Working Group on NIR* – ASTM E 1655 05.

É utilizada energia de fótons na faixa de $2,65 \times 10^{-19}$ a $7,96 \times 10^{-20}$ joules, com faixa de comprimentos de onda adjacente ao infravermelho médio e se estende até a região do visível.

Em se tratando de alimentos para ruminantes, a espectroscopia NIR possibilita avaliação da composição química de alimentos (forragens e outros), uma vez que os procedimentos adequados são feitos (calibrações e validações).

Cada um dos principais componentes orgânicos do alimento tem características próprias de absorção na região do infravermelho próximo, que são específicas, relacionadas às vibrações decorrentes do alongamento e flexão de ligações entre H, C, O e N. Essas características de

absorção são determinadas principalmente através da refletância difusa, o que nos dá os meios para avaliar a composição (Figura 21) (NORRIS, 1983; ABRAMS et al., 1989).

Figura 21. Regiões do infravermelho próximo e as maiores possibilidades de se encontrar certas ligações, ao longo da faixa

Fonte: adaptado de Metrohm (2013).

Através do princípio de emissão da radiação eletromagnética na faixa do infravermelho próximo (capaz de identificar ligações covalentes de moléculas orgânicas), o espectrômetro NIR é um equipamento capaz de efetuar análises de amostras orgânicas complexas. As radiações eletromagnéticas consistem em fótons que traçam um percurso a uma velocidade fixa. Nesse percurso os fótons exibem um movimento de onda, que é expresso como comprimento de onda (a distância percorrida por uma onda completa) (GASPAR, 2004).

A base física de absorção de luz é relacionada à natureza das ligações moleculares. Esta natureza é definida pelos vínculos entre os átomos dentro das moléculas. No entanto, essas ligações não são imóveis, mas sim vibram a todo momento, provocando compressão ou estiramento das moléculas (Figura 22), o que resulta em movimento de onda. Cada um desses movimentos tem um comprimento específico, dependente da quantidade de energia envolvida na ligação, e esta é dependente dos elementos envolvidos na molécula (SKOOG et al., 2006).

Figura 22. Modos de vibração molecular. As bolas representam os átomos e as linhas representam as ligações entre eles. Os sinais + e - indicam movimentos para dentro e para fora do plano da página, respectivamente

Deformações moleculares axiais ou por estiramento (*stretching*):

Deformações moleculares angulares (*bending*):

Simétrica fora do plano

Assimétrica fora do plano

Fonte: Adaptado de Stuart (2004); Skoog et al. (2006).

O NIRS baseia-se na absorção de energia eletromagnética, emitida por uma fonte de luz com comprimentos de ondas situados na região do infravermelho próximo. Ao penetrarem na amostra, eles podem ser absorvidos pelas ligações covalentes existentes entre os elementos presentes nas substâncias orgânicas, que vibram no mesmo comprimento de onda. Uma vez que a quantidade de radiação e os comprimentos de onda absorvidos são específicos para cada tipo de ligação química covalente entre os elementos que compõem a amostra, torna-se possível identificar e quantificar as moléculas orgânicas através do padrão espectral que é absorvido da luz incidente (VOGEL, 1992).

Em amostras sólidas, parte da luz emitida pelo equipamento penetra na amostra e interage com suas moléculas, sendo absorvida, a outra parte é refletida e vai até o detector. Por conseguinte, a luz refletida carrega as informações sobre o padrão espectral daquela amostra.

3.6.4 Calibrações e validações

A interpretação do espectro de um composto orgânico misto é mais complicada do que a interpretação de compostos orgânicos puros, porque apresenta grande número de ligações

moleculares que caracterizam diversos compostos orgânicos, porém absorve luz de um mesmo comprimento de onda (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Sem a diferenciação das medidas dos picos do espectro que indicam quais comprimentos de onda correspondem a qual composto molecular, fica difícil dizer a composição do alimento a partir de modelos matemáticos simples. Como não existe um modelo matemático só para descrever a reflexão da luz em uma amostra contendo uma distribuição heterogênea de substâncias químicas, o NIRS requer calibração.

Para isso, são necessários resultados conhecidos da composição química de amostras, determinadas por uma técnica química padrão acurada, que cubra o máximo e mais uniformemente possível a amplitude provável daquele analito.

Esses resultados serão correlacionados com os espectros obtidos pelas mesmas amostras, no NIRS. Um modelo estatístico será criado, o que explicará a maioria das informações contidas nos espectros. Os métodos matemáticos e estatísticos capazes de fazer estas calibrações são chamados de métodos quimiométricos ou Quimiometria.

O modelo de calibração deve ser posteriormente validado para testar o desempenho do modelo em amostras futuras (validação externa). Depois, para a caracterização de uma amostra desconhecida, basta a obtenção de seu espectro e o uso do modelo estatístico previamente construído para a predição ou classificação de suas propriedades (Figura 23; AGELET; HURBURGH, 2010).

Figura 23. Calibrações e validações em relação a amostras e métodos referências, na espectroscopia em infravermelho próximo

Fonte: Agelet; Hurburgh (2010).

3.6.5 Análise multivariada e quimiometria

O principal obstáculo para o uso da espectrometria NIR é a complexidade de seus espectros. Por isso, surgiu a quimiometria, uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. Outras áreas como psicologia e economia já empregavam artifícios matemáticos e estatísticos para tratamento dos dados, como ferramentas para ajudar na sua interpretação, quando a área da química passou a sentir essa necessidade (WOLD, 1987; MADEIRA et al., 2015).

A necessidade da quimiometria começou em 1960, com o avanço tecnológico na área instrumental, com espectrômetros e cromatógrafos gerando grande quantidade de dados. Em tal grau que ficava difícil de ser interpretada e por isso não seria possível ser empregada de maneira proveitosa na análise química. Com isso, foram sendo criadas ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de extrair o máximo de informação útil possível de um conjunto de dados. A quimiometria aliou-se ao surgimento de computadores cada vez mais competentes em analisar grande quantidade de dados, com rapidez (KOWALSKI; BENDER, 1972; KOWALSKI, 1975).

Figura 24. Aspecto interdisciplinar da quimiometria

Fonte: Ferreira, (2015).

Svante Wold (1995) nos anos 70 juntamente com seu grupo de pesquisa, foi um dos criadores da quimiometria, a definindo: “como conseguir informações quimicamente relevantes a partir de dados químicos medidos, como representar e exibir essas informações, e como transformar essas informações em dados”.

A quimiometria pode ser dividida em diferentes aplicações: processamento de sinais analíticos; planejamento e otimização de experimentos; reconhecimento de padrões e classificação de dados; calibração multivariada e métodos de inteligência artificial. Ela pode

ser considerada a área mais recente da química analítica e através de métodos específicos passa a ser possível o processamento e interpretação de dados que antes não poderiam ser analisados.

Por causa desses métodos essa técnica analítica está se popularizando cada vez mais. A quimiometria somada a técnicas instrumentais produzem dados que serão utilizados para desenvolvimento de modelos responsáveis por estimar uma ou mais propriedades de ordens quantitativa ou qualitativa (KRAMER, 1998).

3.6.6 Técnicas multivariadas para análise de grande base de dados

Pela dificuldade em interpretar os espectros NIR, são utilizadas técnicas multivariadas para análise dos dados dos espectros, como análise de componentes principais (*principal components analysis* - PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares* - PLS). Elas possibilitam a análise de todo o espectro para a construção de modelos de calibração quantitativos e qualitativos, além de análise de reconhecimento de padrões (HALL et al., 1996; BARTON, 2003).

3.6.7 Análise de componentes principais

Esta é a ferramenta estatística mais utilizada para análise exploratória de dados multidimensionais e sua compreensão (SOUZA; MADARI; GUIMARÃES, 2012). Ela é realizada por meio de modelagem da estrutura de correlação entre as variáveis da matriz de dados, agrupando-as, com o objetivo de conseguir a máxima variância total dos dados em um número pequeno de componentes principais (fatores). Isso gera redução da dimensionalidade das variáveis originais e são construídas novas variáveis sintéticas independentes. Além disso, variáveis originais que possuíam pouca informação e que poderiam ser ruídos, são eliminadas (BOUROCHE; SAPORTA, 1982; HOTELLING, 1933).

Os escores representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelos componentes principais (*principal components* - PC). Cada componente principal é composto pela combinação linear das variáveis originais. Os coeficientes da combinação são denominados pesos (*loadings*).

Os pesos representam o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC (são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais). A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação no conjunto de

dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o objetivo de retratar a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante.

Os escores representam as relações de similaridade entre as amostras. A avaliação dos pesos possibilita entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos escores.

Através da análise conjunta do gráfico de escores e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras. O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais seja obtida (WOLD, 1987).

3.6.8 Análise de regressão por quadrados mínimos parciais

Para dados oriundos da espectroscopia em infravermelho próximo faz-se necessário o uso de métodos de regressão multivariada pelo grande número de variáveis envolvidas. Hoje, o mais empregado é a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS), por considerar informações contidas tanto na matriz X (espectros) quanto na Y (valores de referência) (PASQUINI, 2003).

O método baseia-se em combinar linearmente os dados da matriz X e os da matriz Y, através da PCA. São formados vetores (fatores) descorrelacionados entre si, capazes de explicar a variação dos dados de cada matriz (o da matriz X e o da matriz Y, separados, como é mostrado na Figura 25. Após, esses dois vetores são relacionados, de forma que haja a máxima covariância entre os dois conjuntos de dados, e a máxima explicação da variância dos dados de referência Y a partir das variáveis X (GELADI; KOWALSKI, 1986; KOURTI; MACGREGOR, 1995).

A PCA só pode ser feita quando há duas ou mais variáveis, como no caso deste estudo. Foi desenvolvido um modelo para cada variável Y (um para MS, um para PC et Cetera), então o PLS-1 gerou a matriz de fatores para os dados da matriz X, que foi relacionada com a matriz de dados Y, gerando um modelo para cada nutriente do capim.

Essas são as fontes de variação do modelo PLS-1 (adequado para determinação de um constituinte por vez). Na Figura 25 há a representação do passo a passo da modelagem PLS-1.

Figura 25. Representação das etapas de modelagem realizadas pelo método PLS-1. PCA dá origem aos vetores t_1 e t_2 , e a relação entre esses dois novos vetores é feita pela regressão de PLS

Fonte: adaptado de Geladi; Kowalski (1986).

3.6.9 Pré-tratamentos dos dados espectrais

Após a obtenção dos dados espectrais e antes do desenvolvimento dos modelos de calibração, há necessidade de aplicar alguns tratamentos matemáticos nos espectros do banco de dados.

Os principais objetivos da aplicação das técnicas de pré-processamento são eliminar informações não relevantes do ponto de vista químico e tornar a matriz de dados melhor preparada para a análise, viabilizando a subsequente análise exploratória do conjunto de dados com competência (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

Quando os espectros são provenientes de amostras sólidas, com partículas de tamanhos desuniformes, a mensuração pode ser feita por refletância difusa, porém existe o problema associado aos espalhamentos de luz. Após a amostra ser irradiada com luz, parte dela será absorvida e parte dela será refletida até um detector, isto gera o resultado da amostra.

Contudo, quando não se tem uma superfície de absorbância uniforme, parte da luz refletida pode ser espalhada para outra direção que não a do detector, gerando falso resultado para a refletância da amostra que se está analisando, o que pode ser visto na Figura 26 (WORKMAN, 1999).

Figura 26. Exemplo de análise de refletância difusa de uma amostra seca moída. Os feixes NIR atravessam a placa de Petri até a amostra, refletem de forma difusa até os receptores (R) ou detectores. Isso gera informação

Fonte: adaptado de Osborne (2000).

Deve-se tomar cuidado, pois um pré-processamento inadequado pode remover informação útil. Então, um reexame deve sempre ser realizado após o pré-processamento. Ao invés de se fazer por "tentativa e erro", recomenda-se conhecer o que cada pré-tratamento faz com os dados, quais as variações são relevantes e quais devem ser removidas. O método adequado irá depender do tipo de variação presente nos dados espectrais.

As técnicas matemáticas mais empregadas sobre espectros para correção de problemas de natureza metodológica são a primeira e a segunda derivadas (*1st derivative* e *2nd derivative*); alisamento Savitsky-Golay (*smooth*); correção do espalhamento multiplicativo (*Multiplicative Scatter Correction* - MSC); transformação normal de variação (*Standard Normal Variate* - SNV) (SAVITZKY; GOLAY, 1964; GELADI; KOWALSKI, 1986; BARNES; DHANOA; LISTER, 1989; HOPKINS, 2001; NORRIS, 2001).

As derivadas são empregadas quando a linha de base é difícil de ser identificada, são capazes de remover efeitos sobre a linha de base. As informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente acentuadas e se tem uma aparente melhora na "resolução" espectral. Isso pode contribuir para resolver problemas com bandas sobrepostas, enfatizando pequenas variações espectrais que não estavam evidentes nos dados brutos (ESBENSEN, 2004).

Entretanto, os ruídos tornam-se acentuados em relação aos sinais espectrais, diminuindo a relação sinal/ruído, e isso dificulta compreender o que é sinal e o que é ruído. Esta

desvantagem é amenizada quando alisamento Savitsky-Golay é utilizado, que elimina ruídos espectrais.

No alisamento Savitsky-Golay, um segmento do espectro é escolhido e um polinômio é ajustado a esses pontos usando quadrados mínimos. O valor experimental central do segmento é substituído pelo valor ajustado pelo polinômio e esse processo é repetido ponto a ponto com o deslocamento do segmento. Por exemplo, 3 ou 9 pontos viram um (ACHARYA et al., 2016).

A MSC e a SNV diminuem problemas de dispersão de luz, comuns em varreduras espectrais por refletância difusa, em que a radiação é incidida diretamente na amostra moída (DHANOA et al., 1994).

3.6.10 Valor de Q ou Q-valor (*Q-value*) (BÜCHI®)

O valor de Q é uma entre outras ferramentas úteis para o julgamento da qualidade das calibrações (como R^2 e RMSEP, que serão abordados mais adiante). É importante testar a calibração com amostras independentes bem caracterizadas, que representem a amplitude da população total do que se está analisando (Tabela 5).

Ele situa-se entre 0, que indica uma calibração inoperativa, e 1, que seria uma calibração ideal, inalcançável na prática. Ou seja, quanto maior o valor de Q, melhor a calibração. Em análises quantitativas, como as deste estudo, se o valor for maior que 0,75, a calibração é bem aceita, entre 0,5-0,75 a calibração é utilizável, mas não muito precisa. Calibrações com valor Q abaixo de 0,5 devem ser inspecionadas com muito cuidado antes do uso em rotina.

Esta é uma ferramenta útil para julgamento de calibrações, para determinar o número de PCs secundárias e também para comparar diferentes calibrações. Depois de todas as calibrações feitas, os resultados são resumidos e as calibrações são classificadas pelo valor Q. Ele leva em consideração os fatores (componentes principais) primários e secundários, as regiões de comprimentos de onda selecionadas, o algoritmo usado e os pré-tratamentos empregados (Tabela 5) (BÜCHI LABORTECHNIK, 2016).

Tabela 5. Pesos discriminados para se chegar ao valor de Q, utilizando a seguinte fórmula: $Q = 1 / [1 + \text{soma (pesos * valor)}]$

Pesos	Fórmula para valor	Termo geral	Aspectos para uma boa calibração	Detalhe
10	Número de espectros do conjunto de calibração (<i>C-Set</i>) com resíduo muito grande	Rejeição de conhecidos	A contagem de rejeição do conhecido deve ser zero	
1	Número de espectros do conjunto de validação (<i>V-Set</i>) com resíduo muito grande	Rejeição de conhecidos	A contagem de rejeição do conhecido deve ser zero	
2	$\text{Abs (SEE - SEP)} / [\text{absorbância (SEP)} + 1]$	Consistência relativa	<i>C-Set</i> e <i>V-Set</i> devem ter erros padrões de predição similares e baixos	Viés (<i>bias</i>) corrigido
2	$\text{Abs (V-Set do viés)} / \text{Abs (amplitude)}$	viés ponderado	O viés <i>V-Set</i> absoluto deve ser baixo	
1	1 - <i>V-Set</i> da regressão	Validade	O coeficiente de regressão do <i>V-Set</i> deve ser próximo de 1	
1	$\text{Abs(C-Set da regressão - V-Set da regressão)}$	Comparabilidade	<i>C-Set</i> e <i>V-Set</i> devem ter regressões altamente similares	
1	$\text{SEP} / \text{Abs (amplitude)}$	Precisão	O erro padrão de predição do <i>V-Set</i> deve ser baixo	Viés (<i>bias</i>) corrigido
1	Abs	Acurácia ponderada	A soma de quadrados residual do <i>V-Set</i> deve ser baixa	Viés (<i>bias</i>) corrigido

Fonte: NIRCal 5.6 Operation Manual (2016). Abs: absorbância; SEE: erro padrão da estimativa; SEP: erro padrão da predição; RSS: soma de quadrados residuais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, instalações e animais

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo, incluindo o procedimento cirúrgico de animais fistulados, seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" recomendados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com o protocolo de nº CEUA 7684280518.

As análises bromatológicas convencionais foram conduzidas nas dependências do Laboratório de Lignina do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 05 de setembro de 2016 a 01 de setembro de 2017. As análises de espectroscopia em infravermelho próximo foram efetuadas em parceria com a Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE) no laboratório de Espectroscopia de Infravermelho Próximo, em São Carlos, do período de 15 de outubro de 2017 a 22 de junho de 2018.

Para a análise de digestibilidade *in vitro*, coletas de líquido ruminal foram efetuadas de 2 bovinos da raça Nelore, fistulados, canulados e previamente adaptados à dieta com 100% de volumoso (silagem de milho).

4.2 Obtenção e preparo das amostras de *Brachiaria* spp.

Para o desenvolvimento desse estudo foi utilizado um banco de amostras de *Brachiaria* spp. com 169 amostras, de diferentes espécies e cultivares. Plantadas sob diferentes manejos tais como adubação, extrato da planta, estágio de maturidade, sistema produtivo e diversas regiões geográficas do Brasil. Estas amostras fazem parte do banco de dados do projeto NIR da Embrapa, que reuniu amostras de diversas unidades da Embrapa Brasil, em 2012.

Figura 27. Mapa dos locais das Embrapa que participaram da coleta de amostras

As plantas, provenientes de quatro unidades da Embrapa, foram cortadas e secas a 60°C em estufa de circulação forçada de ar por 72h. Após secagem, elas foram moídas em moinho de facas tipo Willey (MARCONI® - MOD - 0.48) de crivo de 1 mm e armazenadas em frascos lacrados, até o momento das análises e dos ensaios de digestibilidade. Grande variabilidade foi observada dentre as amostras de *Brachiaria* spp., desde em relação aos materiais genéticos como aos diferentes locais de coleta, o que contemplou diferentes características edafoclimáticas. Essa heterogeneidade é de grande importância para a construção de modelos de calibração no NIRS, que representem a grande diversidade deste gênero de capim no Brasil. É apresentado na Tabela 6 um resumo da descrição das forragens utilizadas.

Tabela 6. Descrição das amostras de capins utilizadas (n=169)

N	Espécie ou Híbrido	Cultivar	Adução	Estrato (cm)	Estádio	Sistema	Cidade
1	brizantha ¹	-	não	25-80	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha ²	-	não	80-160	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha ¹	-	sim	80-160	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha ³	-	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha ³	-	sim	40-95	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha ⁴	-	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha ⁴	-	não	40-85	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Marandu	não	40-95	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Marandu	sim	40-95	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	ruzziensis x brizantha cv. Marandu ⁵	Mulato 1	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	ruzziensis x decumbens cv. Basilisk x brizantha cv. Marandu ⁶	Mulato2	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	ruzziensis x decumbens cv. Basilisk x brizantha cv. Marandu ⁶	Mulato2	não	40-90	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	não	40-90	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Xaraés	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	decumbens	Basilisk	não	15-30	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	decumbens	Basilisk	não	30-65	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Comum	não	10-30cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Comum	não	30-75	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Tupi	não	10-30cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Tupi	não	30-75	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Llanero	não	10-30cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Llanero	não	30-85	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	ruzziensis	-	não	15-30	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	sim	5-45cm	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	sim	5-30cm	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	sim	5-15cm	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha3	-	sim	5-15cm	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha3	-	sim	5-30cm	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha cv. Marandu x ruzziensis ⁷	Ibyporã	não	60-105	Reprodutivo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	-	não	60-110	Reprodutivo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Marandu	não	20-50	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Marandu	não	>15	Reprodutivo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	decumbens	Basilisk	não	>15	Reprodutivo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	decumbens	Basilisk	não	>15	Reprodutivo	Extensivo	Campo Grande-MS
6	brizantha	Piatã	não	5-45cm	Vegetativo	Piquetes ILP	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	não	5-30cm	Vegetativo	Piquetes ILP	Campo Grande-MS
1	humidicola	Tupi	não	5-10cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Tupi	não	5-25cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Comum	não	5-10cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Comum	não	5-25cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Comum	não	0-20cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	humidicola	Comum	não	>20	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Xaraés	não	0-20cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Xaraés	não	20-40cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Xaraés	não	>40cm	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Xaraés	não	>5	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1	brizantha	Marandu	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha	Marandu	não	>10	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	decumbens	Basilisk	não	>10	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	decumbens	Basilisk	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
1	brizantha	Piatã	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Campo Grande-MS
10	brizantha	Xaraés	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Juiz de Fora-MG
12	brizantha	Marandu	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Juiz de Fora-MG
8	decumbens	-	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Sete Lagoas-MG
4	ruzziensis	-	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Sete Lagoas-MG
2	brizantha	Piatã	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Sete Lagoas-MG
3	brizantha	Xaraés	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Sete Lagoas-MG
3	brizantha	Marandu	sim	>10	Vegetativo	Piquetes	Sete Lagoas-MG
1	brizantha	Marandu	sim	>20	Reprodutivo	Piquetes-Irrigados	São Carlos-SP
3	brizantha	Xaraés	não	>20	Vegetativo	Piquetes-Irrigados	São Carlos-SP
1	brizantha	Piatã	não	>20	Reprodutivo	Piquetes	São Carlos-SP
2	brizantha	Xaraés	não	>5	Vegetativo	Piquetes	São Carlos-SP
9	humidicola	-	não	>10	Reprodutivo	Extensivo	São Carlos-SP
2	humidicola+decumbens	-	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	São Carlos-SP
2	decumbens	Basilisk	não	>5	Vegetativo	Extensivo	São Carlos-SP
3	decumbens	Basilisk	não	>5	Reprodutivo	Piquetes - ILPF	São Carlos-SP
7	brizantha	Marandu	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	São Carlos-SP
1	brizantha	Xaraés	sim	>20	Reprodutivo	Piquetes	São Carlos-SP
1	brizantha	Piatã	sim	>20	Reprodutivo	Piquetes-Irrigados	São Carlos-SP
1	brizantha	Marandu	sim	>20	Reprodutivo	Piquetes-Irrigados	São Carlos-SP
4	brizantha	Xaraés	não	>10	Vegetativo	Extensivo	São Carlos-SP
13	brizantha	Marandu	não	>10	Vegetativo	Extensivo	São Carlos-SP
1*	brizantha	-	não	15-40	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1*	brizantha	Piatã	não	>15	Vegetativo	Extensivo	Campo Grande-MS
1*	decumbens	Basilisk	não	>25	Reprodutivo	Extensivo	Sete Lagoas-MG
1*	decumbens	Basilisk	não	>30	Reprodutivo	Extensivo	Sete Lagoas-MG
1*	brizantha	Xaraés	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	Sete Lagoas-MG
1*	brizantha	Piatã	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	Sete Lagoas-MG
3*	brizantha	Marandu	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	Juiz de Fora-MG
1*	brizantha	Xaraés	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	Juiz de Fora-MG
1*	brizantha	Marandu	sim	>20	Reprodutivo	Piquetes-Irrigados	São Carlos-SP
2*	brizantha	Piatã	sim	>20	Reprodutivo	Piquetes-Irrigados	São Carlos-SP
3*	humidicola	-	não	>10	Reprodutivo	Extensivo	São Carlos-SP
3*	brizantha	Marandu	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	São Carlos-SP
1*	brizantha	Xaraés	não	>5	Reprodutivo	Extensivo	São Carlos-SP

Fonte: Guimarães (2019). Genótipos: ¹B4; ²BA; ³B6; ⁴HBGC 331; ⁵CIAT 3606; ⁶CIAT 3608; ⁷RB H331; *Utilizadas para validação externa; ILP: integração lavoura-pecuária; MS = Mato Grosso do Sul; MG = Minas Gerais e SP = São Paulo.

4.3 Análises químicas convencionais

Os procedimentos analíticos utilizados para avaliação das amostras de *Brachiaria* spp. foram: a matéria seca (MS; 967.03; AOAC, 2006) a 105 °C durante 16 horas em estufa com ventilação forçada; o teor de cinzas, o qual foi obtido pela queima em forno tipo mufla a 600°C por quatro horas (MM, 942.05; AOAC, 2006); a fibra em detergente neutro (FDN), a qual foi determinada pelo método de Van Soest; Robertson; Lewis, (1991), em determinador de fibra TE-149® (TECNAL, São Paulo, Brasil); a fibra em detergente ácido (FDA) que foi determinada de acordo com AOAC (FDA; 973.18; AOAC, 2006).

Brevemente, as análises de FDN e FDA seguiram os seguintes procedimentos: 1) pesagem dos saquinhos de TNT (tecido não tecido) constituído de 100% em polipropileno e de gramatura 120 g/m² e dimensão de 6 x 5 cm vazios; 2) enchimento dos saquinhos com pesagem de 0,5 g de amostra seca, usando 2 saquinhos por amostra (duplicata) e selado à quente; 3) colocados na cuba do determinador de fibra TE-149® adicionando de acordo com a análise (FDN ou FDA) 10 ml por saquinho da solução detergente de acordo com Goering e Van Soest, (1970); 4) as cubas foram aquecidas mantendo a temperatura de 95 a 100 °C; 7) Após 60 minutos para FDN e 60 minutos para FDA os saquinhos foram retirados do determinador de fibras e imediatamente lavados com água a 90 °C, até ficarem livres de qualquer resíduo de solução detergente; 8) sequencialmente, os saquinhos foram enxaguados com acetona 4 vezes e secos em estufa de circulação forçada à 105 °C por 16 horas; 9) Por último, transferiu-se os saquinhos para o dessecador e, após atingirem a temperatura ambiente, foram pesados para a determinação da massa. O teor de FDN ou FDA foi obtido por meio da diferença entre as massas do saquinho original contendo a amostra e a massa do saquinho com FDN ou FDA.

Para análise de parede celular (PC), as amostras moídas foram sequencialmente extraídas com água, etanol, clorofórmio:metanol (2:1) e acetona, em um aparelho Soxhlet. Para cada solvente, a extração foi continuada até que nenhuma cor adicional fosse lixiviada. Tipicamente, os tempos de extração foram de 4 a 8 h para cada solvente (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001).

A lignina em detergente ácido (LDA) foi determinada de acordo com Robertson e Van Soest (1981) o qual utiliza a FDA como substrato. O detergente ácido remove a proteína e outros materiais solúveis em ácido que interferem na determinação da lignina (GOERING; VAN SOEST, 1970). O resíduo da FDA consiste em celulose, lignina e cutina, além de cinzas insolúveis em detergente ácido (principalmente sílica), o qual é tratado com ácido sulfúrico 72% para a dissolução da celulose. Após 3 horas de submersão em ácido sulfúrico os saquinhos são lavados com água quente até ficarem livres do ácido. Subsequentemente, os saquinhos são

secos a 105 °C e pesados. Para determinação da lignina em detergente ácido livre de cinzas, os saquinhos são queimados em mufla a 600 °C por 3 horas e depois resfriados a 105 °C, colocados em dessecadores com sílica até atingirem temperatura ambiente e pesados novamente.

A lignina brometo de acetila (LBA) foi mensurada pelo método espectrofotométrico descrito por Fukushima et al., (2015), em que o padrão de referência é representado por uma equação de regressão que engloba a média de coeficientes de extinção de 17 amostras purificadas de lignina:

$$x = \frac{y - 0,0009}{23,077}$$

onde X é a concentração de lignina (mg/ml), Y é a leitura da densidade óptica da amostra desconhecida, 0,0009 é o valor médio do intercepto e 23,077 é a média dos coeficientes de extinção das curvas de calibração de 17 amostras de lignina (FUKUSHIMA; KERLEY, 2011). O valor X resultante é multiplicado pelo conteúdo de parede celular (PC) e dividido pelo peso da amostra inicial. Alternativamente ao uso de PC, foram utilizadas amostras de FDN como preparação fibrosa.

4.4 Digestibilidade *in vitro*

No ensaio de digestibilidade *in vitro*, aproximadamente 0,5 g de amostras de *Brachiaria* spp. pré-secas (em triplicatas) foram colocadas em saquinhos TNT (gramatura 120g/m²). Posteriormente, as amostras foram incubadas em solução mineral (tampão ou saliva artificial), para garantir o meio estável de pH entre 6,9 e 7,1 (MCDUGALL, 1948) e líquido ruminal, relação 4:1, por 48h, seguida por digestão péptica em que os saquinhos foram imersos em solução de pepsina e ácido clorídrico por mais 48h (TILLEY; TERRY, 1963). Na solução mineral foi empregada a técnica de aceleração da anaerobiose do meio de cultura, preconizada por Fukushima; Weimer; Kunz (2002). Os doadores de líquido ruminal foram 2 bovinos machos castrados da raça Nelore, fistulados e canulados no rúmen, que recebiam dieta de silagem de milho.

4.5 Espectroscopia de refletância em infravermelho próximo

As análises em NIRS foram conduzidas nos laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP). A obtenção dos espectros foi realizada em espectrofotômetro de

infravermelho próximo (BÜCHI Labortechnik, modelo NIRFlex N-500 Solids), os quais foram obtidos no modo de refletância difusa, por meio do software Operator 1.2 (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suíça), abrangendo a região espectral de 10.000 a 4.000 cm^{-1} (2500 - 1000 nm), com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por espectro.

A região utilizada para todas as calibrações foi 8.000 a 4.100 cm^{-1} . Foi utilizado como porta amostra uma placa de Petri de vidro borossilicato. O equipamento foi calibrado utilizando o padrão Spectralon[®], de 10 em 10 minutos, automaticamente. Foram realizadas duas repetições (duplicata) para cada amostra para obtenção dos espectros. A temperatura do laboratório durante as análises era controlada a 20°C, por ar condicionado.

Com o objetivo de minimizar os efeitos causados por problemas de linha de base devido ao espalhamento da luz (em consequência dos diferentes tamanhos das partículas de amostras sólidas) e ruídos, assim como aumentar os pequenos picos de absorção nos espectros (sensibilidade), diferentes técnicas chamadas pré-tratamentos dos dados foram utilizadas, como normalização, alisamento e derivadas: n01 (“normalization” - normalização entre 0 e 1), mf (“Multiplicative Scatter Correction (full)” - MSC Full - correção multiplicativa de dispersão) e SNV (“Standard Normal Variate” - transformação normal de variável), para normalização; sa3 (“smoothing” - alisamento média 3 pontos) para alisamento e derivadas: dg1 e dg2 (primeira e segunda derivadas Savitzky-Golay 9 pontos) (BÜCHI LABORTECHNIK, 2016).

Após a detecção e retirada de amostras anômalas (*outliers*), os modelos foram avaliados quanto à faixa de concentração, coeficientes de determinação (R^2) e desvios padrão da calibração e da validação. Uma observação a ser feita é de que, como as amostras foram analisadas em duplicata, considerou-se as duas amostras como *outliers*, ou seja, foram retirados de dois em dois.

Os dados referentes à matéria seca, matéria mineral, parede celular, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, lignina em detergente ácido e lignina brometo de acetila vinda da parede celular ou da fibra em detergente neutro, digestibilidade *in vitro* da matéria seca ou da fibra em detergente neutro, mensurados pelos métodos convencionais foram introduzidos para construção da curva de calibração multivariada utilizando o software NIRCal 5.6 (BÜCHI Labortechnik).

Os espectros (matriz X) foram combinados linearmente aos valores de referência, (matriz Y), pelo método de regressão por mínimos quadrados parciais (“Partial Least Squares Regression” - PLS) o qual, através de análise de componentes principais (“Principal components analysis” - PCA), forma vetores (fatores) descorrelacionados entre si, que são capazes de explicar a variação dos dados de cada matriz. Posteriormente as matrizes são

relacionadas, no intuito de maximizar a covariância entre os dois conjuntos de dados e a explicação da variância dos dados de referência Y a partir das variáveis X (Figura 28; GELADI; KOWALSKI, 1986, FERREIRA, 2015).

Figura 28. Representação da construção de um modelo de calibração multivariada

Fonte: Ferreira et al. (1999).

Por conseguinte, a seleção de amostras para predição (validação externa) foi feita através da distância euclidiana para selecionar amostras representativas da variabilidade amostral pelo algoritmo de Kennard-Stone (KENNARD; STONE, 1969; DE SOUSA et al., 2011). Ou seja, 149 amostras (88,2%) foram utilizadas para a construção do modelo e 20 amostras (11,8%) para a predição. Ainda para a predição, o valor mínimo e máximo amostral ficaram dentro do intervalo de leitura do modelo (faixa de calibração).

Figura 29. Espectrofotômetro modular FT-NIR, NIRFlex® N-500, da empresa suíça BÜCHI®, com amostra moída de capim do gênero *Brachiaria*

Fonte: Guimarães (2019).

4.6 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados pelo software SAS (Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE do SAS) e informações com resíduos estudantizados maiores que +3 ou menores que -3 foram excluídos das análises. A homogeneidade das variâncias foi comparada pelo teste de Levene.

Inicialmente o tratamento estatístico dos dados foi organizado em 7 diferentes partes: 1) correlação geral entre os métodos convencionais de análise de alimentos com as estimativas espectrais feitas pelo NIRS; 2) Correlação entre os diferentes métodos de mensuração da lignina (LDA , LDA_{NIRS} , LBA_{PC} , $LBA_{PC\ NIRS}$, LBA_{FDN} , $LBA_{FDN\ NIRS}$) com a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro; 3) Correlação entre a LBA vinda da PC e a vinda da FDN; 4) Regressão simples entre os métodos convencionais de mensuração dos nutrientes com o método NIRS; 5) acurácia e precisão da estimativa de diferentes nutrientes pelo NIRS; 6) robustez da estimativa da digestibilidade da matéria seca ou da FDN pelos métodos convencionais ou pelo método NIRS e 7) Análise de desempenho dos modelos desenvolvidos pelo NIRS.

Para análises descritivas como média, mínimo, máximo e desvio padrão, foi utilizado o comando PROC MEANS do SAS. Além disso, para as análises de correlação de Pearson e de

criação de modelos de regressão simples, foram executados os comandos PROC CORR e PROC REG do SAS.

A acurácia das estimativas feitas pelo NIRS foi avaliada pelo viés médio, que é a diferença entre o valor predito pelo NIRS e o valor observado pela análise convencional. Assim, a estimativa mais acurada é aquela que possui um viés médio mais próximo de zero (KOHN; KALSCHEUR; HANIGAN, 1998). O cálculo do viés médio foi realizado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Viés médio} = \frac{\sum(\text{predito} - \text{observado})}{\text{n}^{\circ} \text{ de observações}}$$

A precisão é uma medida de dispersão entre os valores preditos e observados, ou seja, é a variabilidade média da distância entre o valor predito e o observado ou ainda, a variabilidade dos vieses (KOHN; KALSCHEUR; HANIGAN, 1998), que pode ser avaliada pela raiz quadrada média do erro de predição (RQMEP, ou em inglês: RMSEP), cuja fórmula é apresentada a seguir:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum(\text{predito} - \text{observado})^2}{\text{n}^{\circ} \text{ de observações}}}$$

Sempre que o viés médio for alto (falta de acurácia) por motivo de erro sistemático, ocorre superestimativa da falta de precisão, ou seja, superestimativa da raiz quadrada média do erro de predição, uma vez que a distância média entre o valor predito e o observado leva também ao aumento da variabilidade entre o predito e o observado. Portanto, a precisão é mais bem avaliada quando a raiz quadrada média do erro de predição é corrigida para falta de acurácia, gerando assim o erro residual, que é definido como o erro restante no modelo de predição, excluindo-se o erro devido ao viés médio (KOHN; KALSCHEUR; HANIGAN, 1998). O erro residual é também referido como o erro de predição, excluindo-se o viés médio, e obtido pela fórmula:

$$\text{Erro residual} = \sqrt{[\text{RMSEP}^2 - (\text{viés médio})^2]}$$

O teste t para média igual a zero foi utilizado para avaliar a significância dos vieses médios pelo comando PROC UNIVARIATE do SAS.

Para avaliar o comportamento do erro de predição do NIRS (vieses) em função da variação dos valores observados pelos métodos convencionais, foi estimada a regressão entre os vieses obtidos pelos métodos convencionais e pelo método NIRS, obtendo-se, desta forma, o viés linear (coeficiente angular), o coeficiente de determinação do modelo (R^2) e a significância do viés para cada análise, pelo procedimento REG do SAS, segundo Kohn; Kalscheur; Hanigan, (1998).

A reta ajustada foi avaliada segundo as hipóteses de que o coeficiente angular (slope) fosse igual a 1, e o coeficiente linear (intercepto) fosse igual a 0, pelo comando TEST, dentro do PROC REG do SAS.

A avaliação da robustez de cada método foi obtida regredindo-se o viés em função das variáveis selecionadas (digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro), realizada também pelo procedimento REG do SAS (SAS, 1998). O nível de significância utilizado foi 5%.

Foi utilizada análise de regressão por mínimos quadrados parciais - PLS (“Partial Least Squares Regression”) para a validação dos espectros criados pelo NIRS no software NIRCal 5.6 (BÜCHI®). Os valores discrepantes foram detectados por meio da ferramenta “outlier detection” e os respectivos espectros foram removidos da curva de calibração.

O desempenho dos modelos desenvolvidos foi avaliado de acordo com diversos índices: 1) valor de Q (indica a qualidade da calibração, sendo um valor maior do que 0,75 aceitável para análises quantitativas, entre 0,5-0,75, ela pode ser utilizada, mas não é muito acurada e valores menores do que 0,5 devem ser inspecionados antes de serem utilizados em rotina - este índice pode ser usado para escolher o melhor modelo de calibração); 2) desvio padrão da calibração (SEC); 3) desvio padrão da predição (SEP – o qual deve ser o menor possível e o mais próximo de SEC possível); 4) correlação (r); 5) coeficiente de determinação (R^2); 6) Viés (erro sistemático ou tendenciosidade - o qual não deve ser maior do que 0,6 vezes o SEC) e, por fim 7) desvio padrão.

Altos valores de r, R^2 e Q, como também baixos valores de SEC, SEP e erro médio (raiz quadrada do erro médio de predição – RMSEP), indicam o melhor modelo para predição. O RMSEP expressa a concordância entre o valor estimado e o valor de referência.

Para avaliação da validação externa, o software NIRCal 5.6 (BÜCHI®) inclui novas análises estatísticas no protocolo de previsão (predição). Essas análises são calculadas em conformidade com a norma ISO 12099 (Alimentos para animais, cereais e produtos cereais

moídos – Diretrizes para a aplicação de espectrometria em infravermelho próximo) e são feitas para cada propriedade no protocolo de predição.

As estatísticas incluídas no protocolo de predição são o deslocamento do intercepto (*offset*), o coeficiente angular (*slope*), a raiz quadrada média do erro de predição (*RMSEP*), o erro padrão de predição (*SEP*), o desvio padrão residual (*RSD*) e o viés (*bias*). É importante comentar que elas são calculadas utilizando os espectros que não são marcados como *outliers* e somente fornece estimativas relevantes sobre o desempenho da calibração se o protocolo de predição é feito utilizando um conjunto independente de teste, como as 20 amostras que usamos. A Figura 30 explica algumas dessas estatísticas.

Raiz quadrada do erro médio de predição, *SEP* e *RSD* (desvio padrão residual – estima o erro aleatório corrigido com o slope) são três estimativas de erros aleatórios, que incluem: *RMSEP*: erro aleatório + inclinação sistemática + viés; *SEP*: Erro aleatório + inclinação sistemática e *RSD*: somente erro aleatório. Portanto, *RMSEP* é uma estimativa mais completa.

Figura 30. Explicação de alguns elementos estatísticos

Fonte: BÜCHI Labortechnik (2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise descritiva das gramíneas

O total de 169 amostras de capim *Brachiaria* selecionadas para este estudo por profissionais da Embrapa, variaram bastante quanto a suas composições químicas e parâmetros de digestibilidade. Médias, mínimos, máximos e desvios-padrão das amostras utilizadas estão especificados na Tabela 7. Outros trabalhos também chegaram a valores parecidos com o mesmo gênero de capim (MONTAGNER et al., 2018).

Tabela 7. Análise descritiva dos parâmetros químicos de amostras de *Brachiaria* spp., realizados pelos métodos convencionais (n=169), em g/kg MS

Item	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Matéria seca	923,23	897,05	946,56	9,51
Matéria mineral	76,05	40,77	124,98	17,6
Parede celular	809,82	670,12	916,44	53,13
Fibra em detergente neutro	761,52	575,42	879,24	60,74
Fibra em detergente ácido	489,14	314,31	611,55	58,81
Lignina em detergente ácido	71,57	37,88	111,52	15,83
Lignina em brometo de acetila (PC) ¹	114,77	61,12	173,9	20,54
Lignina em brometo de acetila (FDN) ²	115,44	65,51	162,09	18,42
DIVMS ³	602,73	331,65	791,62	93,31
DIVFDN ⁴	543,26	298,91	740,17	90,88

Fonte: Guimarães (2019).

¹Parede celular como substrato;

²Fibra em detergente neutro como substrato;

³Digestibilidade *in vitro* da matéria seca;

⁴Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

Essa variação é de extrema importância. Dentre várias recomendações feitas pela ASTM E 1655 05, (2000), o NIRS deve ter em seu banco de dados a maior amplitude possível de resultados, pois após a calibração, se acontecer de alguma análise de rotina estar abaixo ou acima dessa amplitude, a robustez do resultado pode ser prejudicada, ou seja, não condizer com a realidade da amostra. Por essa razão, ao longo do tempo há também a possibilidade de serem incluídas novas amostras ao banco de dados da calibração, com características de variabilidades de amostras. Assim, as análises sempre ficam atualizadas e acuradas (STARR; MORGAN; SMITH, 1981; DARDENNE; SINNAEVE; BAETEN, 2000).

O conteúdo de matéria seca foi de 897 até 947 g/kg MS. Resultado parecido com os de Geron et al. (2014), que abrangeu 832 até 968 g/kg MS, em gramíneas do gênero *Brachiaria* e *Panicum*.

Grande amplitude (conjunto representativo) foi conseguida para a concentração de matéria mineral (cinzas): 41 a 125 g/kg MS, o que no trabalho de Balsalobre et al., (2003b) não ocorreu: 78 a 105 g/kg MS, em amostras de capim Tanzânia, em diferentes estações do ano. Estes valores são relativamente altos, mas estão de acordo com o teor de MM das gramíneas tropicais.

Parede celular foi de 670 a 916 g/kg MS, com média de aproximadamente 810. Concordando com esses resultados, Savioli e Fukushima (2000) encontraram médias para *Brachiaria* de 772 até 840, dependendo da maturidade da planta. Fukushima et al. (2015) encontraram valores entre 499 e 760 g/kg MS em amostras de gramíneas forrageiras. Dentre elas azevém, festuca e andropogon.

Fibra em detergente neutro abrangeu entre 575 e 879 g/kg MS e a fibra em detergente ácido entre 314 e 611 g/kg MS dentre todas as gramíneas analisadas pelos métodos referências. Uma amplitude maior do que outros autores, referidos abaixo, mas estes não tinham a intenção de operar calibrações em NIRS.

Soares Filho; Rodrigues; Perri (2002) conseguiram valores de FDN de 694 a 749 g/kg MS e de FDA entre 375 e 450 g/kg MS, a partir de um conjunto de diversas espécies de gramíneas tropicais manejadas sob intervalos de corte de 35 dias durante o verão e inverno no Brasil. Balsalobre et al. (2003a) e (2003b) obtiveram valores de FDN e FDA variando de 628 a 683 e 332 e 349 g/kg MS, respectivamente, para o capim-guiné (cv. Tanzânia) cortado a 33 dias de rebrota. Deresz et al., (2006) relataram teores de FDN e FDA de 623 a 741 e de 373 a 420 g/kg MS, respectivamente, para capim-elefante (cv. Napier) com rebrota de 30 dias. Análises de Geron et al., (2014) resultaram em valores de 746 a 778 g/kg MS para FDN, e 456 a 531 g/kg MS para FDA em amostras do gênero *Brachiaria*, coletadas no período de seca, em pastagens com três anos de implantação.

Em um trabalho com o objetivo parecido com o deste, e com o mesmo gênero de gramínea, Monrroy et al. (2017) chegaram a uma amplitude de 627 a 857 g/kg MS para FDN e 285 a 455 g/kg MS para FDA. Na mesma situação também, Caixeta et al. (2013) chegaram de 263 a 522 g/kg MS para FDA, e média de 404. Maiores do que os anteriormente citados, mais ainda não tão amplo quanto do presente trabalho.

A quantidade de LDA pelo método convencional nas amostras abrangeu aproximadamente 38 a 112 g/kg MS, um pouco mais alto do que outros trabalhos. Tais como os de Balsalobre et al. (2003a) (31 a 47 g/kg MS, capim *Panicum maximum*), de Andrade e Assis (2008) (24,6 a 31 g/kg MS, capins Xaraés, Piatã e Marandu, entre seca e águas, por 3 anos), Fukushima et al. (2000) (35 e 75 g/kg MS, para *Brachiaria* jovem e madura

respectivamente), Fukushima et al. (2015) (48 a 77 g/kg MS, capins azevém, festuca e andropogon) e Caixeta et al. (2013) (16 a 96 g/kg MS, com várias amostras do gênero *Brachiaria*). A média de LDA neste trabalho foi 72 g/kg MS, já no trabalho de Gomes et al. (2011) foi 63 g/kg MS e de Caixeta et al. (2013) foi 48.

A LBA_{PC} média foi 115 g/kg MS, de 61 a 174 g/kg MS. Um pouco abaixo de outros trabalhos, que obtiveram média de 194 g/kg MS (FUKUSHIMA et al., 2000) e de 190 a 241 g/kg MS (FUKUSHIMA; SAVIOLI, 2001) para a mesma gramínea, jovem e madura. Por outro lado, um pouco acima que outros trabalhos, que obtiveram média de 79,7 g/kg MS em gramíneas diversas (*Brachiaria*, *Andropogon*, *Panicum*, *Pennisetum*) (GOMES et al., 2011).

Alguns trabalhos foram publicados acerca de LBA feita a partir de FDA, tanto em gramíneas quanto em leguminosas. Contudo, Fukushima et al. (2009) verificaram que o efluente da solução de detergente ácido resultante do preparo da FDA de diversas gramíneas apresentava picos de absorbância semelhantes aos da lignina retida no resíduo insolúvel em detergente ácido.

Neste sentido, a avaliação do teor de lignina em brometo de acetila tendo como base que a PC forneceria estimativas mais verossímeis do teor de lignina de forragens (IIYAMA; WALLIS, 1990; FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000; CHANG et al., 2008). Há também a possibilidade de se conduzir a LBA a partir da FDN, uma vez que a diferença entre PC e FDN é a presença de pectina na FDN, e não há relatos de influência negativa deste composto sobre a absorbância da lignina no espectrofotômetro a 280 nm. Com leguminosas, trabalhos já foram feitos abordando utilização de LBA a partir de FDN (LBA_{FDN}) (FUKUSHIMA; DEHORITY; LOERCH, 1991; FUKUSHIMA; DEHORITY, 1995; REEVES, 1997). Porém poucos abordaram sobre LBA_{FDN} em gramíneas.

No presente trabalho, Digestibilidade *in vitro* da matéria seca ficou com média igual a 602,7 g/kg MS, mínimo de 331,6 e máximo de 791,6 g/kg MS. Os resultados concordam com Moore e Mott (1973), os quais comentam que DIVMS de gramíneas tropicais tem média por volta de 650 g/kg MS e nunca superior a 800.

Em outros trabalhos obteve-se média de DIVMS igual a 490,6 a 789,9 g/kg MS com capins azevém, festuca e andropogon (FUKUSHIMA et al., 2015). Com *Brachiaria* jovem e madura obteve-se média de 458 e 257 g/kg MS, respectivamente (FUKUSHIMA et al., 2000). DIVMS de capim do gênero *Pennisetum* resultou em média de 585 a 689 g/kg MS, medido por dois anos consecutivos (DERESZ et al., 2006).

Neste trabalho a média da digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro foi 543 g/kg FDN e os resultados de mínimo e máximo foram 299 e 740 g/kg FDN. Em outro trabalho,

utilizando azevém, festuca e andropogon, houve média de 567 a 873 g/kg FDN (FUKUSHIMA et al., 2015). Outro, utilizando um conjunto maior de capins, dentre eles *Brachiaria*, *Panicum*, *Andropogon* e *Cynodon*, obtiveram média de 631 g/kg FDN (GOMES et al., 2011).

5.2 Correlações entre análises convencionais e NIRS - SAS®

Como já mencionado, para a realização da calibração no NIRS, 149 amostras foram utilizadas para calibração e validação interna, sendo dois terços para a primeira e um terço para a segunda. Este procedimento foi feito aleatoriamente pelo software NIRCal®, do próprio aparelho da empresa BUCHI®. Outras 20 amostras externas a essas (que não fizeram parte do modelo de calibração), aleatoriamente selecionadas, também cedidas pela Embrapa, foram utilizadas a fim de fazer a validação externa de cada modelo criado na calibração. Ao todo, 10 parâmetros foram calibrados no NIRS, através de PCA e PLS-1.

Na Tabela 8 pode-se ver, com exceção da MS e da LDA, que as amostras para validação externa ficaram dentro da amplitude das amostras para calibração. Isso é aceitável, pois é difícil em uma primeira calibração já se obter a maior amplitude possível de uma análise química que um gênero de planta pode ter.

Tabela 8. Descrição dos parâmetros químicos de amostras de *Brachiaria* spp. realizados pelos métodos convencionais, utilizados para calibração e validação interna (n=149) e validação externa (n=20), em g/kg MS

Item	Calibração e Validação Interna				Validação Externa			
	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Matéria seca	924,7	904,7	946,5	8,59	912,0	897,0	934,0	8,65
Matéria mineral	76,29	40,77	124,9	17,49	74,27	49,84	107,5	18,7
Parede celular	811,6	670,1	916,4	54,05	795,9	711,9	859,4	44,35
Fibra em detergente neutro	768,2	575,4	879,2	58,84	708,7	616,4	800,9	50,91
Fibra em detergente ácido	494,2	314,3	611,5	57,84	451,2	341,2	549,5	52,90
Lignina em detergente ácido	102,4	60,93	151,4	19,86	81,33	58,37	119,2	15,11
Lignina brometo de acetila (PC) ¹	113,8	61,12	173,9	20,32	123,9	69,88	155,4	22,47
Lignina brometo de acetila (FDN) ²	115,9	65,51	162,0	18,35	111,4	66,9	148,5	18,86
DIVMS ³	598,7	331,6	791,6	93,28	632,3	445,8	774,1	90,31
DIVFDN ⁴	542,4	298,9	740,1	90,77	560,1	372,7	708,5	99,99

Fonte: Guimarães (2019).

¹Parede celular como substrato;

²Fibra em detergente neutro como substrato;

³Digestibilidade *in vitro* da matéria seca;

⁴Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

Na Figura 31 estão os espectros 149 obtidos pelo NIRS. Esta é a conformação inicial para todas as calibrações. A partir disso, haverá a separação entre conjunto de calibração (*C-Set*) e o de validação externa; serão selecionados os comprimentos de onda, a fim de ser retirado tudo o que não for informação, de acordo com trabalhos anteriores (FAHEY et al., 2017; FAHEY; NIEUWOUDT; HARRIS, 2018).

Após, serão aplicados pré-tratamentos necessários; serão selecionados os fatores que têm o maior número de informação (PCs a partir da PCA) e serão retirados os outliers, tudo com a ajuda do *software* NIRCal[®], que além de outros vários parâmetros, utiliza o valor de Q (quanto mais próximo de 1, melhor) e o *SEP* (quanto menor, melhor) para ajudar o usuário a chegar em uma melhor calibração. As calibrações finais, bem como alguns espectros em que foram aplicados pré tratamentos, podem ser vistos no apêndice.

Figura 31. Espectros obtidos a partir de amostras de *Brachiaria* spp., coletadas sob diferentes condições edafoclimáticas

Fonte: Guimarães (2019).

A caracterização de cada resultado de validação externa (n=20) obtida pelo NIRS está exposta na Tabela 9. É possível observar que os números são próximos tanto aos da calibração quanto aos da validação interna. Porém é preciso utilização de análises estatísticas para julgar se os modelos conseguidos podem ser realmente utilizados em rotina ou não.

O trabalho de Monrroy et al. (2017), que utilizou 123 amostras de *Brachiaria* spp. para construir os modelos de calibração e 30 para validação externa (*prediction set*), alcançou uma amplitude de validação externa de 680 a 830 g/kg MS para FDN e 300 a 440 g/kg MS para FDA. No atual trabalho foram obtidos aproximadamente 642 a 803 g/kg MS para FDN e 365 a 547 g/kg MS para FDA, números ligeiramente menores para FDN e maiores para FDA.

Tabela 9. Descrição dos parâmetros químicos de amostras de *Brachiaria* spp. realizados pelo método espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS; n=20; em g/kg MS)

Item	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Matéria seca	923,9	914,9	948,4	8,41
Matéria mineral	73,3	47,2	102,5	15,73
Parede celular	796,1	701,1	865,4	47,53
Fibra em detergente neutro	741,3	641,9	803,3	48,66
Fibra em detergente ácido	470,8	364,7	547,1	47,33
Lignina em detergente ácido	68,8	51,9	95,8	12,25
Lignina brometo de acetila (PC) ¹	121,9	69,9	155,3	21,29
Lignina brometo de acetila (FDN) ²	111,4	66,9	148,5	18,85
DIVMS ³	639,4	491,6	784,6	76,37
DIVFDN ⁴	567,1	398,8	774,7	92,37

Fonte: Guimarães (2019).

¹Parede celular como substrato;

²Fibra em detergente neutro como substrato;

³Digestibilidade *in vitro* da matéria seca;

⁴Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

Com os resultados dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre análises convencionais e validações externas obtidas pelo SAS 9.4, é possível concluir que o NIRS foi efetivo em prever os valores para as análises em questão (Tabela 10).

Lignina em detergente ácido obteve menor correlação, com $r = 0,75$ e o DIVFDN obteve o maior, com $r = 0,93$. Este resultado para LDA pode ser devido ao coeficiente de variação laboratorial, que dentre as análises de lignina, foi o maior (5,65 para LDA, 3,43 para LBA_{PC} e 2,5 para LBA_{FDN}, não mostrados na tabela). Independentemente se por sub-amostragem ou procedimento com baixa precisão analítica, sabe-se que os erros vindos das análises químicas convencionais, ou seja, as análises-referências, são transportados para o NIRS.

Freitas et al. (2016) encontraram resultados 0,89; 0,81; 0,89; 0,82 para FDN, FDA, LDA e DIVMS, respectivamente, com 48 amostras de *Brachiaria humidicola*. Clark e Lamb (1991) reportaram resultados entre 0,76 e 0,84 para DIVMS, em várias gramíneas. Outros pesquisadores também mostraram correlações parecidas com as deste estudo (EUCLIDES et al., 2009; MONRROY et al., 2017), porém, é difícil comparação entre trabalhos neste sentido, pois é preferível que a comparação seja feita com o mesmo material, no caso, as variedades comerciais de *Brachiaria*. Mais trabalhos sobre madeira são encontrados, de eucalipto por exemplo (VIANA et al., 2010; DE SOUSA et al., 2011). Além disso, poucos trabalhos abordaram os resultados desta forma. Geralmente apresentam somente as análises estatísticas fornecidas pelo próprio NIRS. Isso é bom, porém uma vez que o NIRS fornece o resultado de sua análise, é possível fazer análises estatísticas externas a ele, como se fosse qualquer outro procedimento analítico.

Tabela 10. Correlações entre métodos convencionais e o conjunto das amostras de validação externa pelo método de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), em amostras de *Brachiaria* spp. (n=20)

Item	r ¹	Valor de P
Matéria seca	0,8883	<0,0001
Matéria mineral	0,8463	<0,0001
Parede celular	0,9062	<0,0001
Fibra em detergente neutro	0,9079	<0,0001
Fibra em detergente ácido	0,8925	<0,0001
Lignina em detergente ácido	0,7518	<0,0001
Lignina em brometo de acetila PC ²	0,9227	<0,0001
Lignina em brometo de acetila FDN ³	0,8836	<0,0001
DIVMS ⁴	0,8984	<0,0001
DIVFDN ⁵	0,9314	<0,0001

Fonte: Guimarães (2019).

¹Coefficiente de correlação de Pearson;

²Método realizado utilizando a parede celular;

³Método realizado utilizando a fibra em detergente neutro;

⁴Digestibilidade *in vitro* da matéria seca;

⁵Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

Quanto aos métodos de quantificação de lignina, sabe-se que não existe um método de escolha para medi-la em gramíneas forrageiras e também é bem aceito que quanto maior o teor de lignina em uma amostra vegetal, menor será sua digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986; JUNG; MERTENS; PAYNE, 1997).

Portanto, correlações de Pearson entre os métodos utilizados para quantificar lignina e digestibilidades foram feitas para tentar esclarecer esta questão. Como esperado, todos os resultados foram negativamente correlacionados, tanto entre métodos convencionais, quanto entre métodos por NIRS (Tabela 11).

Assim como os de Fukushima e Hatfield (2004), os resultados relacionados a LDA e LDA_{NIRS} geraram coeficientes de correlação de Pearson menores do que os das LBAs. Enquanto os primeiros estavam entre $r = -0,58$ a $-0,78$, os demais ficaram mais altos, entre $-0,80$ e $-0,96$.

Como comentado anteriormente, provavelmente esse fato deverá ser decorrência das análises químicas referências, antes do NIRS, ou no momento de passar os dados para o instrumento, e não alguma falha ao fazer os procedimentos no aparelho (MCCLURE et al., 2006).

Tabela 11. Correlação entre métodos de análises de lignina e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) pelos métodos convencional e o conjunto das amostras de validação externa pelo método de espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS), em amostras de *Brachiaria* spp. (n=20)

Item	Métodos de análises de lignina (g/kg)					
	LDA	LDA _{NIRS}	LBA _{PC}	LBA _{PC NIRS}	LBA _{FDN}	LBA _{FDN NIRS}
DIVMS	-0.7691**	-0.6685*	-0.8887**	-0.8830**	-0.9230**	-0.8693**
DIVFDN	-0.7630**	-0.6896*	-0.8935**	-0.8863**	-0.8977**	-0.8872**
DIVMS _{NIRS}	-0.7563*	-0.5816*	-0.8075*	-0.9041**	-0.8964**	-0.8735**
DIVFDN _{NIRS}	-0.7860**	-0.6444*	-0.9096**	-0.9683**	-0.9442**	-0.9639**

Fonte: Guimarães (2019).

*Valor de $P < 0,01$. **Valor de $P < 0,0001$.

Também foram feitas regressões lineares simples entre os métodos referências e NIRS, para amostras de validação externa. Os resultados do coeficiente de determinação dos modelos (R^2), mostram o quanto a abscissa (eixo x) e a ordenada (eixo y) se relacionam, e o ideal seria igual a 1 (Figura 32) (JERÓNIMO; MOURA, 2008).

Em ordem crescente, os coeficientes de determinação entre os métodos convencionais e NIRS foram: LDA $R^2 = 0,57$; MM $R^2 = 0,72$; LBA_{FDN} $R^2 = 0,78$; MS $R^2 = 0,79$; FDA $R^2 = 0,80$; DIVMS $R^2 = 0,81$; PC e FDN parecidos, com $R^2 = 0,82$; LBA_{PC} $R^2 = 0,85$; DIVFDN $R^2 = 0,87$.

Novamente observa-se um coeficiente de determinação menor para o método LDA em comparação com os outros, abaixo de 0,60. Fora ele, os outros resultaram acima de 0,71 e o maior foi DIVFDN. Monrroy et al. (2017), com amostras de *Brachiaria* spp. também criaram regressões simples a partir das análises convencionais e do NIRS, para FDN e FDA, com 30 amostras para validação externa. Alcançaram $R^2 = 0,85$ e 0,91 respectivamente, numericamente maiores do que os do presente estudo.

Os coeficientes angulares (*slopes*) foram aproximadamente iguais a: LDA = 0,69; MM = 0,71; DIVMS = 0,76; FDA = 0,80; LBA_{FDN} = 0,83; MS e FDN = 0,86; DIVFDN = 0,92; LBA_{PC} = 0,95 e PC = 0,97, em ordem crescente. Observa-se que o menor foi o do LDA, e os outros entre 0,71 e 0,97. Quanto mais o coeficiente angular se aproximar do 1, melhor é o modelo, como no caso da bissetriz. A bissetriz ($Y = X$) é a reta com extremidade (intercepto) no ponto (0,0), que divide o ângulo dos quadrantes em dois ângulos congruentes. Assim, a inclinação da reta da bissetriz é igual a 45° e o coeficiente angular é igual a 1.

Análise para verificação de intercepto igual a zero e coeficiente angular igual a um foi feita para cada uma das regressões a seguir. As variáveis MS, MM, FDN, FDA, LDA, LBA_{PC} e DIVMS obtiveram interceptos diferentes de zero e coeficientes angulares diferentes de um

($P < 0,05$). Já PC ($P = 0,9642$), LBA_{FDN} ($P = 0,2743$) e $DIVFDN$ ($P = 0,0682$) sim, alcançaram interceptos iguais a zero e coeficientes angulares iguais a um.

Basicamente a raiz quadrada média do erro (RQME) (*root mean square error – RMSE*) é a média de quanto cada ponto do gráfico está distante da linha de tendência conseguida, são os desvios padrões dos resíduos. Quanto menores, melhor (CHAI; DRAXLER, 2014). Neste estudo, entre resultados dos métodos referências e de validação externa em NIRS, com 20 dados para cada análise (*property – propriedade*), obteve-se: MS = 3,97; LDA = 8,3; LBA_{FDN} = 8,54; MM = 8,61; LBA_{PC} = 8,68; PC = 20,65; FDN = 20,95; FDA = 21,93; e os maiores: $DIVMS$ = 34,45; $DIVFDN$ = 34,54. Isso mostra que mesmo com o LDA tendo correlações piores, o NIRS conseguiu ajustar sua calibração com as análises resultantes dos métodos referências.

Uma observação a ser feita é a de que o objetivo era nenhum número ser retirado (considerado *outlier*) desta fase final da análise do NIRS. O $n = 20$ permaneceu para todas as propriedades analisadas, na correlação de Pearson e na regressão linear simples. Isso porque estas duas análises estariam mimetizando uma análise de rotina. Felizmente os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias confirmaram a inexistência de *outliers* nestas análises. O que mostrou a competência do NIRS em prever os valores das 10 propriedades testadas (MS, MM, PC, FDN, FDA, LDA, LBA_{PC} , LBA_{FDN} , $DIVMS$, $DIVFDN$).

Figura 32. Regressões lineares simples entre nutrientes mensurados pelos métodos convencionais vs. NIRS

Fonte: Guimarães (2019). a) matéria seca; b) matéria mineral; c) parede celular; d) fibra em detergente neutro; e) lignina em detergente ácido; f) lignina em brometo de acetila utilizando parede celular; g) lignina em brometo de acetila utilizando fibra em detergente ácido; h) digestibilidade *in vitro* da matéria seca e i) digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro, entre análises convencionais e método de espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS) de amostras de *Brachiaria* spp. Linha preta contínua: linha de tendência do modelo. Linha cinza tracejada: bissetriz, forma um ângulo de 45° entre Y e X, com coeficiente angular = 1 ($Y = X$) (n=20).

A Tabela 12, refere-se a análise de variância de cada modelo. Nela estão especificados os graus de liberdade do erro (ou do resíduo), para $n = 20$ (GL regressão = 1; GL total = 20 - 1 = 19; GL erro = GL total - GL regressão = 18). Os quadrados médios dos erros também estão descritos. É importante lembrar que quanto menor o QME melhor, pois maior a chance de o R^2 do modelo ser significativo (análise de variância: QME menor = maior valor de F de Fisher = maior a chance de F calculado ser maior que F tabelado = maior a chance de valor de P ser significativo).

Pode-se observar que quanto mais etapas tem a análise química convencional, maior o QME, maior a variância, menor a precisão. A MS, a análise dentre as estudadas que demanda menos etapas, obteve 15,76. Matéria mineral obteve um QME igual a 74,18, muito alto comparado ao da MS. No grupo das fibras e parede celular, observou-se PC com 426, FDN com 439 e FDA com 481. Quanto às ligninas, LDA apresentou o menor QME, com 69, e os dois valores de LBA não seguiram suas preparações fibrosas, com LBA_{FDN} menor que LBA_{PC} (73 e 75, respectivamente). As digestibilidades tiveram seus QME parecidos, com 1187 para DIVMS e 1193 para DIVFDN. Estas duas últimas envolvem etapas relativamente mais demoradas do que as outras e utilizam inóculo ruminal, que é o único componente externo ao laboratório, comparado com as outras análises.

Já o RQME é a raiz quadrada do QME (ou *root mean square error* – RMSE), e resultou na divisão mais homogênea dos grupos (fibras, ligninas, digestibilidades), com exceção da MM.

Obviamente seguiu os resultados do QME: MS resultou na menor RQME, seguida por LDA, LBA_{FDN} , MM e LBA_{PC} ; após, PC, FDN e FDA e depois DIVMS e DIVFDN.

Os coeficientes da equação linear estão discriminados também nas equações da Figura 32, e todos os coeficientes angulares (slopes) foram significativos ($P < 0,0001$).

Tabela 12. Estimativas dos coeficientes dos modelos de regressão linear entre métodos convencionais e o método de espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS), de diferentes nutrientes e digestibilidade de amostras de *Brachiaria* spp. (n=20)

Item	MS	MM	PC	FDN	FDA	LDA	LBA _{PC}	LBA _{FDN}	DIVMS	DIVFDN
GL _{erro} ¹	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
QME ²	15,76	74,18	426,4	438,9	480,9	68,90	75,25	73,0	1186,8	1192,7
R ² ³	0,7890	0,7162	0,8213	0,8243	0,7966	0,5651	0,8514	0,7807	0,8072	0,8675
R ² _{ajustado}	0,7773	0,7004	0,8113	0,8146	0,7853	0,541	0,8432	0,7686	0,7965	0,8602
RQME ⁴	3,97	8,61	20,6	20,9	21,9	8,30	8,67	8,54	34,4	34,5
<i>Coefficientes da equação linear</i>										
Intercepto	136,41	20,60	22,93	128,00	110,48	25,26	-5,21	19,49	158,94	63,2709
Valor de P	0,172	0,019	0,790	0,071	0,019	0,013	0,657	0,114	0,010	0,195
Slope ⁵	0,863	0,709	0,971	0,862	0,798	0,686	0,949	0,832	0,759	0,917
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Fonte: Guimarães (2019).

¹Graus de liberdade do erro;

²Quadrado médio do erro;

³Coefficiente de determinação do modelo de regressão linear;

⁴Raiz quadrada do quadrado médio do erro;

⁵Coefficiente angular.

5.3 Avaliação dos modelos obtidos pelo NIRS - SAS®

5.3.1 Avaliação de um modelo

O escopo da avaliação de um modelo matemático é indicar a acurácia (exatidão), a precisão e a robustez das previsões desse modelo. Além disso, identificar os pontos fracos que necessitam de mais pesquisas acerca do modelo e também indicar os modelos que não devem ser utilizados. A metodologia de avaliação deve ser bem estruturada, e seus resultados devem ser documentados a fim de garantir o entendimento dos usuários acerca das limitações e dos pontos fortes do sistema (KOHN; KALSCHEUR; HANIGAN, 1998).

A acurácia (exatidão) e a precisão dos modelos são conseguidas comparando as previsões (predições) com os dados observados. Os dados utilizados devem refletir os objetivos do modelo, como no exemplo deste trabalho, as amostras de capim foram secas e passadas por peneira de 1 mm e foi feita análise química específica para cada propriedade (MS, MM, *et cetera*), então os modelos serão para estas condições.

Na avaliação sobre a aplicabilidade do modelo, o conjunto de dados de avaliação deve ser independente do conjunto de dados de desenvolvimento, ou seja, os mesmos dados não podem ser usados tanto para o desenvolvimento quanto para a avaliação do modelo. Além disso, atenção especial deve ser dada à amplitude de resultados, pois extrapolação não é recomendada (KOHN; KALSCHEUR; RUSSEK-COHEN, 2002).

5.3.2 Hipóteses de um modelo

A avaliação do modelo deve utilizar análise estatística rigorosa. Nos estágios iniciais do desenvolvimento do modelo, uma hipótese nula é que o modelo não pode prever resultados reais. Qualquer relação positiva entre observações e predições justificaria a rejeição dessa hipótese e uma avaliação favorável ao modelo (deve-se rejeitar a hipótese nula para um bom modelo de regressão – $P < 0,05$).

Porém, Kohn; Kalscheur e Hanigan (1998) comentam que avanços adicionais na pesquisa de modelagem exigem um exame mais crítico do modelo. Uma segunda hipótese nula seria que o modelo prevê resultados observados consistentemente. Uma rejeição desta segunda hipótese indicaria potenciais vieses no modelo (o objetivo é que não se rejeite essa hipótese – $P > 0,05$).

Por fim, os modelos que diferem em complexidade devem ser comparados entre si para garantir a maior complexidade. A hipótese nula testada neste caso seria que o erro de predição de um modelo não difere daquele do outro. Não rejeitar esta hipótese garantiria o uso do modelo mais conveniente para as condições a serem testadas.

5.3.3 Análises de sensibilidade

Os modelos geralmente são avaliados pela regressão entre dados os previstos e os observados, gerando por exemplo o coeficiente de determinação (R^2). Porém, as informações podem ser ambíguas e com pouca sensibilidade (MITCHELL, 1997). Por isso há uma medida de quão bem as predições se ajustam aos dados observados, a raiz quadrada média do erro de predição (RQMEP ou *root mean square prediction error* – RMSE). Nesta equação, se calcula a raiz quadrada da variância entre os valores preditos e os observados. O RQMEP é a distância vertical média de cada ponto à linha em que o $Y = 0$ (BIBBY & TOUTENBURG, 1977).

Acurácia, precisão e robustez foram medidas para avaliação de cada modelo. As duas primeiras são determinadas pela comparação dos dados preditos com os observados. Já a última é determinada diminuindo os valores preditos pelos observados (vieses) e depois o valor obtido é relacionado com outros fatores estudados (KOHN; KALSCHEUR; HANIGAN, 1998).

5.3.4 Acurácia e precisão dos modelos obtidos

Acurácia (exatidão) dos modelos é avaliada pelo viés médio. O viés é a diferença entre o valor predito pelo modelo e o valor referência. Ele representa a falta de acurácia média das predições do modelo. Portanto, o modelo mais acurado é aquele que possui um viés médio mais próximo do valor zero (KOHN; KALSCHEUR; HANIGAN, 1998).

Precisão é uma medida de dispersão entre os valores preditos e observados. É a medida do erro aleatório associado ao método analítico. Ela pode ser avaliada pela RQMEP ou pelo erro residual. Todavia, uma ressalva deve ser levada em consideração: sempre que o viés médio for alto (falta de acurácia), há uma superestimativa da falta de precisão, ou seja, da RQMEP, uma vez que a distância média entre o valor predito e o observado leva também ao aumento da variabilidade entre o predito e o observado (RODRIGUES et al., 2010).

Portanto, a precisão é mais bem avaliada quando a RQMEP é corrigida para falta de acurácia. Esse novo valor é chamado de erro residual, que é definido como o erro restante no modelo de predição, excluindo-se o erro devido ao viés médio (BIBBY & TOUTENBURG, 1977). É também referido como o erro de predição, excluindo-se o viés médio.

A regressão dos vieses (valores preditos menos observados) contra os valores observados, gera o viés linear. Ela pode ser usada para identificar se a magnitude do viés aumenta, diminui ou não muda, com a magnitude dos valores observados (BIBBY; TOUTENBURG, 1977).

É usual fazer analogia entre o processo de medição e um exercício de tiro ao alvo, para melhor compreensão, como na Figura 33. Na base dessa analogia está a ideia de que, assim como o objetivo de um atirador é atingir o centro do alvo, o objetivo da medição é determinar o valor verdadeiro do mensurando.

Figura 33. Exemplos dos conceitos de acurácia e precisão

Com acurácia (exatidão) e precisão

Com acurácia (exatidão) e sem precisão

Sem acurácia (exatidão) e com precisão

Sem acurácia (exatidão) e sem precisão

Fonte: adaptado de Olivieri et al. (2006).

Na Tabela 13 estão expostos os dados obtidos para cada análise, bem como os resultados de acurácia (exatidão) – viés médio – e precisão – RQMEP e erro residual. É importante frisar que neste estudo foram feitas somente duas análises diferentes: a via úmida e a em NIRS, para cada propriedade mensurada.

Geralmente a utilização deste tipo de estatística tem como objetivo comparar uma análise considerada a padrão com pelo menos duas outras diferentes, como fizeram (Kohn; Kalscheur; Russek-Cohen (2002) e Meyer et al. (2006) ao compararem modelos

para predição de nitrogênio uréico excretado no leite, em vacas leiteiras, e também Rodrigues et al. (2010), que compararam diferentes marcadores para predição da digestibilidade aparente da matéria seca, em ovinos e Pombo et al., (2016), em equinos.

O atual estudo trabalhou desta forma para que possíveis trabalhos futuros possam utilizar os resultados de viés médio, RQMEP e erro residual para fins de comparação. Porém, esta valiosa análise também fornece outra importante informação, quanto ao viés linear, que será abordado em seguida.

Na Tabela 13, os vieses médios em ordem crescente foram LBA_{PC} , MM, PC, LBA_{FDN} , LDA, DIVMS, MS, DIVFDN, FDA e FDN. Os vieses médios de MM, PC, LBA_{FDN} e DIVMS foram iguais a zero ($P > 0,05$). Percebe-se que NIRS subestimou valores para LBA_{PC} , bem como superestimou para LBA_{PC} , LDA, MS, DIVFDN, FDA e FDN ($P < 0,05$).

Os RQMEP também em ordem crescente foram LBA_{FDN} , MM, LDA, MS, LBA_{PC} , PC, FDA, FDN, DIVFDN e DIVMS. Nota-se que ao retirar o erro devido a possíveis superestimativas da falta de precisão (vieses médios altos), como no caso do FDN, o erro residual basicamente divide as análises em grupos, primeiro a MS, com 3,90, depois LBA_{PC} , LBA_{FDN} e LDA, com 8,28, 8,67 e 8,89 respectivamente. Depois MM com 9,74, logo após, as fibras com 19,63 (PC), 21,02 (FDN) e 23,26 (FDA). E por último DIVFDN e DIVMS, com 33,63 e 38,92 respectivamente.

Como já dito, para se chegar ao viés linear, se faz a diferença entre os dados preditos pelos observados (referências) e os resultados são colocados em uma regressão linear com os dados observados. O objetivo ao se validar um modelo é conseguir que o viés linear, que é o coeficiente angular da reta, seja o mais próximo de 0 possível. Isso significa que a diferença entre valores preditos e observados é pequena, independentemente do valor observado.

Os vieses lineares de cada propriedade estão descritos na Tabela 13. Do maior para o menor tem-se LDA, com - 0,31; MM com - 0,29; DIVMS com - 0,24; FDA com - 0,20; LBA_{FDN} com - 0,17; MS e FDN com - 0,14; DIVFDN com - 0,08; LBA_{PC} com - 0,05 e PC com - 0,02. Observa-se que todo são negativos.

Porém, antes de fazer qualquer afirmação sobre esses números, é importante estudar o coeficiente de determinação e o valor de P da regressão. Neste caso, a meta é o R^2 ser o mais baixo possível e o valor de P não ser significativo (maior do que 0,05), ou seja, que se tenha o mínimo de influência entre ordenadas (Y) e abscissas (X) na equação.

Isso significa que conforme o valor da propriedade aumenta (X), não há influência sobre seu viés (Y) (MEYER et al., 2006).

Tabela 13. Acurácia e precisão da estimativa de diferentes nutrientes determinados utilizando espectroscopia em infravermelho próximo (NIRS) de amostras de *Brachiaria* spp. (n=20)

Item	Análises laboratoriais (g/kg)									
	MS	MM	PC	FDN	FDA	LDA	LBA _{PC}	LBA _{FDN}	DIVMS	DIVFDN
Observado	912,0	74,3	796,0	711,2	451,3	63,5	121,9	111,4	632,4	549,3
Predito	923,9	73,3	796,1	741,3	470,8	68,8	110,5	112,3	639,4	567,1
Viés médio	11,91***	-0,98	0,17	30,14***	19,56**	5,35*	-11,38***	0,82	7,03	17,77*
RMSEP ¹	12,53	9,79	19,63	36,74	30,39	10,37	14,08	8,71	39,55	38,03
Erro residual	3,90	9,74	19,63	21,02	23,26	8,89	8,28	8,67	38,92	33,63
<i>Regressão linear entre dados de laboratório (observados) e seus respectivos vieses</i>										
Viés linear ²	-0,1365	-0,2905	-0,0286	-0,1376	-0,2015	-0,3138	-0,0506	-0,1676	-0,2402	-0,0828
R ² ³	0,0855	0,2973	0,0040	0,1067	0,1996	0,2136	0,0160	0,1261	0,2951	0,0507
Pr > t ⁴	0,2110	0,0129	0,7919	0,1597	0,0483	0,0402	0,5951	0,1244	0,0133	0,3398

Fonte: Guimarães (2019).

*Probabilidade do teste t para média = 0. *P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,0001.

¹Raiz quadrada da média do erro de predição (RQMEP);

²Coefficiente angular do modelo de regressão entre dados de laboratório observados e seus vieses;

³Coefficiente de determinação do modelo linear de regressão dos vieses em função de seus respectivos resultados de laboratório observados;

⁴Probabilidade de aceitação da hipótese nula: Viés linear = 0.

O maior coeficiente de determinação foi o para MM (0,29), seguido por DIVMS, LDA, FDA, LBA_{FDN}, FDN, MS, DIVFDN, LBA_{PC} e o menor para PC (0,004). Porém não se pode comparar esses dados, como já apontado anteriormente, por se tratar de análises diferentes umas das outras.

Os coeficientes de regressão de cada viés em função de cada propriedade, no caso de MS, PC, FDN, LBA_{PC}, LBA_{FDN} e DIVFDN não foram estatisticamente diferentes de zero (P>0,05), mostrando que o NIRS criou modelos acurados para essas propriedades. Já para MM, FDA, LDA e DIVMS foram diferentes de 0 (P<0,05). Isso significa que os vieses, ou os erros de predição desses quatro são influenciados, subestimando ou superestimando o valor, de acordo com a quantidade real da propriedade observada. O que não acontece com os seis acima.

Na ocasião das análises de regressão entre mesmas amostras feitas pelos métodos referências e em NIRS (n = 20, Figura 34), foi feita a verificação de intercepto ser igual a zero e coeficiente angular ser igual a um. Parede celular, LBA_{FDN} e DIVFDN confirmaram a resposta. O mesmo ocorreu na análise de acurácia para essas três análises (Tabela 13).

Uma possível explicação para MS, FDN e LBA_{PC} não estarem junto com os outros três na análise de intercepto ser igual a zero e coeficiente angular ser igual a um, mas no teste para acurácia sim (viés linear com $P>0,05$), pode ser a falta de precisão. Infelizmente a precisão não pode ser comparada neste experimento, somente mostrada, por motivos já comentados.

Para a verificação do teor em que o NIRS consegue estimar mais corretamente cada uma dessas 4 propriedades (MM, FDA, LDA e DIVMS), deve-se achar o ponto de X em que $Y=0$. É preciso averiguar em torno de qual valor da análise, o viés será 0, e o NIRS fará a predição correta (RODRIGUES et al., 2010).

A diferença de valores, para as mesmas amostras, entre MM feita via NIRS (predita) e via úmida (observada), assim como para FDA, LDA e DIVMS estão na Figura 34 como DIFMM, DIFFDA, DIFLDA, DIFDIVMS. Foi calculado o erro de predição para essas 4 propriedades e quando o NIRS prediz a MM, a LDA e a DIVMS em torno de 70,9, 80,5 e 661,6 g/kg MS respectivamente, é mais provável de a análise estar correta. Se predisser menos que isso ele pode estar superestimando a análise, e mais que isso ele pode estar subestimando a análise.

Quanto à FDA, resultados por volta de 548,3 g/kg MS são mais passíveis de acerto pelo método NIRS. Resultados abaixo disso podem estar superestimando os valores.

Figura 34. Viés linear (coeficiente angular) das estimativas entre a diferença do predito (espectroscopia em infravermelho próximo) pelo observado (métodos convencionais) – DIF – e o observado (métodos convencionais)

Fonte: Guimarães (2019). a) matéria mineral convencional (MM); b) fibra em detergente ácido convencional (FDA); c) lignina em detergente ácido convencional (LDA); e d) digestibilidade *in vitro* da matéria seca convencional (DIVMS), de amostras de *Brachiaria* spp. (n=20).

5.3.5 Robustez dos modelos obtidos

A robustez é a caracterização do modelo que menos é influenciado por outros fatores selecionados (R^2 baixo e coeficiente angular igual a zero). É obtida a partir da regressão dos vieses (valores preditos menos valores observados) contra variáveis diferentes, passíveis de serem identificadas na experimentação (MEYER et al., 2006).

A robustez foi calculada pela diferença entre DIVMS (ou DIVFDN) obtida pelo NIRS e DIVMS (ou DIVFDN) obtida pela incubadora *in vitro*, e após isso fez-se a regressão desta diferença com cada variável (MS, PC, LBA_{FDN} ...), para verificar se e como estas variáveis influenciariam na determinação da digestibilidade pelo NIRS.

O coeficiente angular da DIVMS ($DIVMS_{NIRS} - DIVMS$), bem como o da DIVFDN confrontado com as outras análises pode ser visto na Tabela 14. No caso da DIVMS, pode-se ver que o único negativo é para MM, tanto quando o viés é confrontado com análises convencionais, quanto em NIRS. Outro ponto é a amplitude, que vai de -1,11 até 2,22 nas análises convencionais e de 0,009 até 0,16, nas do NIRS.

Quanto ao viés da DIVMS com análises convencionais, os menores R^2 foram com a FDA (0,06) e com a LDA, seguidas por FDN, PC, LBA_{FDN} , LBA_{PC} , MS e o maior foi com a MM (0,27). O mesmo viés, mas com análises em NIRS, no geral resultou em menores coeficientes de determinação do que os anteriormente citados, menos para LDA. O menor foi com FDN (0,009), seguida por PC, FDA, LBA_{PC} , MM, LBA_{FDN} , MS, e o maior com LDA (0,16).

Os coeficientes angulares da regressão linear entre o viés da DIVMS e a PC, a FDN, a FDA, a LDA, e a LBA_{FDN} feitas pelos métodos convencionais e também todos os feitos pelo NIRS não foram diferentes de zero ($P > 0,05$). Isso mostra que o erro de predição pelo NIRS da DIVMS foi independente da variação dessas outras análises citadas, ou seja, independentemente da quantidade delas no capim, a DIVMS será predita com robustez pelo NIRS. Portanto, todos esses foram robustos.

O mesmo não aconteceu para as análises entre o viés da DIVMS e a MS, a MM e a LBA_{PC} . O viés da DIVMS foi influenciado por essas variáveis ($P < 0,05$). O NIRS consegue prever sem viés a DIVMS em uma amostra de *Brachiaria* com a MS em torno de 909 g/kg MS. Se a MS for mais baixa que isso, é provável que ele subestime o resultado da análise e se for mais alta que isso, é possível que ele superestime o resultado da análise.

Quando a matéria mineral é 80,6 g/kg MS, o NIRS prediz corretamente o valor de DIVMS. Quando o resultado na realidade é menor do que esse, o NIRS superestima e quando é maior, o NIRS subestima. Quando os valores de LBA_{PC} são menores que 114 g/kg MS, pode ser que o NIRS subestime o resultado e quando são maiores, que superestime.

Na realidade esse resultado de falta de robustez pode ser atenuado pelo fato de que as análises dessas três propriedades, MS, MM e LBA_{PC} , têm resultados por volta dos apresentados, quando o viés é zero (Tabela 7, Tabela 8 e Tabela 9), 923, 76 e 115 g/kg MS respectivamente, com 169 dados.

No caso da DIVFDN, os coeficientes angulares da regressão linear entre seu viés e todas as propriedades mensuradas, foram zero ($P > 0,05$). Ou seja, o resultado de cada

um deles em *Brachiaria*, segundo esta análise, não influencia o erro de predição da DIVFDN feita pelo NIRS. Assim, todas as propriedades foram robustas.

Tabela 14. Robustez das estimativas da digestibilidade da matéria seca (DIVMS) ou da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de diferentes nutrientes, de acordo com os métodos convencionais ou pelo método NIRS, de amostras de *Brachiaria* spp. (n=20)

Item	Análises convencionais								Análises em NIRS							
	MS	MM	PC	FDN	FDA	LDA	LBA _{PC}	LBA _{FDN}	MS	MM	PC	FDN	FDA	LDA	LBA _{PC}	LBA _{FDN}
DIVMS																
Coefficiente angular ¹	2,223	-1,112	0,334	0,282	0,188	0,871	0,873	0,790	1,678	-0,721	0,136	0,078	0,184	1,302	0,488	0,664
R ² ²	0,232	0,273	0,138	0,131	0,0621	0,0857	0,217	0,139	0,125	0,081	0,026	0,009	0,048	0,160	0,072	0,087
Pr > t ³	0,032	0,018	0,107	0,117	0,289	0,210	0,039	0,105	0,126	0,225	0,496	0,692	0,355	0,081	0,254	0,206
DIVFDN																
Coefficiente angular ¹	-0,192	-0,502	0,049	0,043	-0,124	-0,077	-0,008	-0,159	-0,126	0,138	-0,084	-0,1077	-0,133	0,422	-0,287	-0,327
R ² ²	0,002	0,075	0,004	0,004	0,036	0,001	0	0,008	0,0009	0,004	0,013	0,0231	0,033	0,022	0,033	0,028
Pr > t ³	0,840	0,244	0,788	0,789	0,421	0,901	0,980	0,715	0,898	0,793	0,629	0,5226	0,441	0,529	0,441	0,477

Fonte: Guimarães (2019).

¹Estimativa do coeficiente angular da equação linear de regressão entre os vieses de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro e a variável independente estudada;

²Coefficiente de determinação do modelo de regressão linear entre vieses de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro e a variável independente estudada;

³Probabilidade de aceitação da hipótese nula: coeficiente angular = 0

Figura 35. Regressão linear entre vieses das estimativas da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (método de espectroscopia em infravermelho próximo - métodos convencionais: DIFDIVMS)

Fonte: Guimarães (2019). a) matéria seca convencional (MS); b) matéria mineral convencional (MM); e c) lignina em brometo de acetila vinda de parede celular (LBA_{PC}), de amostras de *Brachiaria* spp. (n=20).

É claro que mais estudos sobre acurácia, precisão e robustez das análises em NIRS utilizando *Brachiaria* devem ser conduzidos, principalmente com número maior de amostras, e de anos diferentes (RESTAINO et al., 2009), a fim de que se tenha cada vez mais confiabilidade nos resultados e se compreenda quais análises necessitam de mais atenção e cuidado, tanto via úmida para abastecer o aparelho NIRS com resultados corretos, quanto no próprio NIRS, estabelecendo decisões corretas relativas a pré-tratamentos, escolha de PCs, retirada de *outliers*.

5.4 Estatísticas multivariadas do NIRS

5.4.1 Calibrações e validações internas

As análises foram conduzidas por refletância difusa. Seleção dos comprimentos de onda foi feita e vários pré-tratamentos foram utilizados antes das calibrações propriamente ditas, como primeira e segunda derivadas (NORRIS et al., 1976). As melhores calibrações foram comparadas com calibrações utilizando o pré-tratamento Correção de Sinais por Espalhamento Multiplicativo Completa (*Multiplicative scatter correction full* – MSC full – mf), menos no caso de PC, em que MSC full foi o pré-tratamento de escolha. Então, ele foi comparado com o pré-tratamento Alisamento com

3 pontos (*Smooth Average 3 Points* – sa3), que foi o segundo melhor e produziu resultados quase tão satisfatórios quanto o MSC full (Tabela 14).

Um pré-tratamento foi o bastante para PC, FDN, LBA_{PC} e LBA_{FDN}. Já para MS, MM, FDA, DIVMS e DIVFDN foram necessários dois pré-tratamentos e para LDA, três.

A propriedade que ficou com o menor número final de componentes principais (*principal components* – PCs; fatores, variáveis latentes) foi a FDA, com 2. Parede Celular e LBA_{PC} ficaram com 3. Matéria Seca, MM, FDN, LDA, LBA_{FDN} e DIVFDN finalizaram com 4 e DIVMS com 5. A decisão quanto ao número de PCs utilizar é baseada em um conjunto de resultados, como valor de Q o mais alto possível (comentado anteriormente); viés do conjunto de validação interna (*C-Set*) perto de zero; *C-Set SEE* (*SEC* - *standard error of calibration*) baixo; *V-Set SEE* (*SEP* - *standard error of prediction*) baixo; *SEC* e *SEP* o mais próximos possível; consistência (*SEC/SEP.100*) perto de 100 (80-110); *C-* e *V-Set PRESS* menores possíveis; coeficientes da regressão (*r* e *R*²) entre *C-* e *V-Set* o mais próximos de um (LABORTECHNIK, 2016).

O número de amostras no conjunto de calibração foi perto de 2/3 (por volta de 66,66%) para calibração e 1/3 (mais ou menos 33,33%) para validação interna, das 149 selecionadas para a função. Como foram analisadas em duplicata, 298 espectros foram analisados.

Duzentos e oitenta espectros foram utilizados para calibração da MS, 185 (66%) no *C-Set*, 95 (34%) no *V-Set*. Então, 18 *outliers* foram retirados. Para MM foram 274 espectros, 24 *outliers*. Cento e oitenta (66%) para *C-Set* e 94 (34%) para *V-Set*.

Duzentos e noventa e dois espectros foram utilizados para calibração de PC, então foram 6 *outliers*, 190 (65%) no *C-Set* e 102 (35%) no *V-Set*. Já no conjunto de FDN, foi empregado um total de 294 espectros, com somente 4 *outliers*, 200 (68%) no *C-Set* e 94 (32%) no *V-Set*. A FDA ficou com 284 no total, logo houve 10 *outliers*. Foram 190 (67%) no *C-Set* e 94 (33%) no *V-Set*.

Lignina em detergente ácido ficou com 280 no total, 190 (68%) no conjunto de calibração, 90 (32%) no conjunto de validação interna e 18 *outliers*. Para LBA_{PC} foram os 298 espectros, portanto nenhum *outlier*, 2/3 para *C-Set* e 1/3 para *V-Set*. No caso de LBA_{FDN}, 194 (68%) amostras ficaram no *C-Set* e 92 (32%) ficaram no *V-Set*. Assim sendo, 286 espectros no total e 12 *outliers* foram detectados.

Na DIVMS, foram 188 (66%) no *C-Set*, 96 (34%) no *V-Set*, 284 no total e por isso, 14 *outliers*. Por fim, para a DIVFDN ficaram 188 (67%) no *C-Set* e 92 (33%) no *V-Set*. Igual a 280 no total e 18 *outliers*.

A amplitude (faixa) de cada propriedade, tanto da calibração quanto da validação interna pode ser vista na Tabela 15. Nota-se que em todas, as calibrações estão mais amplas do que as validações internas, concordando com a recomendação, que preconiza os espectros com valores mínimos e máximos de concentração (valores extremos) estarem selecionados como espectros de calibração (ASTM E 1655 05, 2000).

De acordo com o valor de Q, nota-se que FDA (0,43), LDA (0,53), MS (0,54), DIVFDN (0,57) e DIVMS (0,59) obtiveram valores passíveis de serem revisados, uma vez que possuem valores abaixo do limite aceitável (0,6). Não se pode utilizar essas calibrações em rotina ainda, deve-se tentar algumas ações para tentar melhorar os modelos, como adicionar mais amostras ao conjunto de calibração, adicionar ou mudar pré-tratamentos e modificar os comprimentos de onda selecionados.

As calibrações que ficaram com valor de Q entre 0,6-0,75 são utilizáveis, porém não tão acuradas: FDN (0,64), PC (0,65), MM (0,66), LBA_{FDN} (0,66) e LBA_{PC} (0,7). Nenhuma das calibrações ficou com valor de Q maior que 0,75, que significariam análises mais confiáveis de se utilizar na rotina.

Previsões precisas do NIRS dependem de 3 condições: 1) um método referência com baixo erro laboratorial; 2) ligações químicas da amostra capazes de serem absorvidas ou identificadas pelo NIRS e 3) quantidade significativa e grande amplitude do constituinte a ser analisado (SHENK; WESTERHAUS, 1994; NIE et al., 2008).

Para a inspeção de uma calibração, o SEC e o SEP fornecem a magnitude do desvio padrão para calibração e validação (precisão). Os dois valores devem ser os menores e mais parecidos quanto for possível. Eles podem ser comparados com o desvio padrão do método convencional, de laboratório. Com uma calibração aceitável, os dois valores também são aproximadamente iguais (Consistência próxima de 100).

Observando os desvios padrão das análises laboratoriais (Tabela 7, Tabela 8 e Tabela 9), o menor foi 8,41 e o maior foi 99,99. Nem de longe se compara aos valores de SEC e SEP das calibrações (Tabela 15), em que o maior de todos foi um SEC de 3,62, e deve-se lembrar que a acurácia e a precisão do método laboratorial tem enorme influência na qualidade da calibração no NIRS (LABORTECHNIK, 2016).

Calculando as consistências, tem-se: MS = 80% MM = 92% PC = 101%, FDN, 114%, FDA = -301%, LDA = 91%, LBA_{PC}, 94%, LBA_{FDN} = 104%, DIVMS = 103 e DIVFDN = 101. Nota-se que a mais preocupante, que necessita de aprimoramento, é a calibração da FDA.

Rabotnikof et al. (1995) conseguiram valores melhores de SEC: 0,43 (FDN), 0,21 (LDA) e 1,14 (DIVMS), utilizando gramíneas de clima temperado. Igualmente (PIRES; PRATES, 1998), que chegaram a 0,46 (MS), 1,06 (FDN), 0,79 (FDA) e 0,31 (LDA).

Os coeficientes de regressão mostram quão bem os valores preditos (do NIRS) se encaixam nos valores de referência (de laboratório), na média. Devem ser pelo menos maiores do que 0,9 (LABORTECHNIK, 2016).

Identifica-se valores de coeficiente de correlação entre 0,79 e 0,95 para calibrações e 0,78 e 0,96 para validações internas. Os piores valores foram para MS, FDA e LDA ($r < 0,82$), enquanto os melhores, para MM, PC, FDN, LBA_{PC} , DIVMS, DIVFDN ($r > 0,9$). Valores para LBA_{FDN} ficaram intermediários, com $r = 0,88$.

Coefficientes de determinação obviamente acompanharam os de correlação ($R^2 = r.r$). Para MS, FDA e LDA, ficaram abaixo de 0,7. Até 0,9 ficaram MM, LBA_{PC} , LBA_{FDN} , DIVMS e DIVFDN. Os mais altos foram para PC e FDN.

O trabalho de Simeone et al. (2015) também utilizou vários gêneros de *Brachiaria*, sob as mesmas condições deste experimento, e seus modelos geraram melhores coeficientes de determinação da calibração, com R^2 igual a 0,95 para FDN, 0,93 para FDA, 0,94 para LDA e 0,94 para DIVMS.

Outro estudo com *Brachiaria humidicola* gerou resultados de r para calibração iguais a 0,89 (FDN e LDA), 0,81 (FDA) e 0,96 (DIVMS). Aproximados aos presentes resultados. No mesmo trabalho, com validação cruzada, obtiveram R^2 igual a 0,89 (FDN), 0,81 (FDA), 0,89 (LDA) e 0,86 (DIVMS). Foi melhor resultados para FDA e LDA, igual para DIVMS e menor para FDN (FREITAS et al., 2016).

Restaino et al. (2009) trabalharam com silagens de forragens (gramíneas, leguminosas e mistura das duas – *Lotus*, *Festuca*, *Lolium*, *Leucaena*), e conseguiram R^2 de calibrações para FDN igual a 0,75, para FDA igual a 0,80 e para DIVMS igual a 0,60. Menores que os do presente trabalho somente para FDN.

Outros autores, utilizando gramíneas de clima temperado alcançaram R^2 de calibrações iguais a 0,94 (FDN), 0,93 (LDA) e 0,97 (DIVMS; RABOTNIKOF et al., 1995). O parâmetro para LDA foi melhor do que o do presente estudo.

Com amostras de *Brachiaria* (Piatã), *Lolium* (azevém), *Panicum* (capim-tanzânia), *Arachis* (amendoim forrageiro), *Paspallum* e *Medicago* (alfafa crioula), Del Santo et al. (2010) conseguiram R^2 de 0,80 para MS e 0,99 para FDN, resultados maiores e melhores do que os do presente estudo. Da mesma forma, Pires; Prate, (1998), com R^2 das calibrações iguais a 0,94 (MS), 0,95 (FDN), 0,96 (FDA) e 0,90 (LDA).

O fato de o NIRS não absorver certas bandas moleculares, como compostos inorgânicos, pode fazer com que o NIRS desenvolva modelos com baixos coeficientes de determinação de MM nas amostras de *Brachiaria* (SHENK; WESTERHAUS, 1994; FONTANELI et al., 2004). Porém, neste estudo isso não ocorreu.

No NIRS, a acurácia é medida basicamente pelo viés do conjunto de validação interna (*V-Set Bias*). Ele fornece informações sobre o desvio médio entre os valores previstos (NIRS) e os valores reais (laboratoriais), e deve ser sempre o mais próximo de 0 possível. Este valor fornece informações sobre o desvio sistemático da calibração. O viés do conjunto de calibração (*C-Set Bias*) é zero por definição (LABORTECHNIK, 2016).

Os menores vieses foram os de MS, LBA_{PC} e LBA_{FDN} , seguidos pelos de DIVMS, MM, LDA, FDN e PC. Valores altos foram os de FDA e DIVFDN, o que mostra que suas calibrações necessitam revisão. Resultados de vieses de Rabotnikof et al. (1995) foram 0,07 (FDN), 0,05 (LDA), e 0,01 (DIVMS), melhores que os nossos.

Os desvios padrão foram de 0,48 até 3,62. Fontaneli et al. (2004), com amostras do gênero *Cynodon* obtiveram desvios padrão da calibração iguais a 2,02 (MS), 3,45 (FDN) e 3,69 (FDA). Todos maiores do que os do presente trabalho. Já Pires; Prates (1998) com amostras de alfafa (*Medicago sativa*), conseguiram desvios padrão iguais a 1,97 para MS, 4,57 para FDN, 4,02 para FDA e 0,98 para LDA, todos maiores e piores do que os presentes resultados.

Robustez é a avaliação da susceptibilidade do método de análise às variações das condições analíticas, por exemplo, armazenamento, operador, condições ambientais, variações de reagentes, compactação do material, alterações instrumentais e temperatura da amostra. Um modelo mais robusto é menos sensível a essas variações e apresenta uma maior estabilidade e aplicabilidade a longo prazo (HINDLE et al., 2008).

Caso sejam determinados parâmetros que afetam o método de análise, estes deverão ser controlados e os procedimentos para o desenvolvimento da metodologia deverão incluir recomendações de como mantê-los sob controle (OLIVIERI et al., 2006).

A ortogonalidade dos componentes principais da PCA mais o fato de que, coletivamente eles representam a quantidade máxima de variação nos dados (tendem a rejeitar o ruído nos dados), faz com que o uso de PCs (fatores) seja um método inerentemente robusto de calibração.

É bem conhecido que, uma vez que os componentes principais são ortogonais, as calibrações baseadas neles evitam os problemas associados às calibrações baseadas nos

Tabela 15. Índices estatísticos de desempenho dos modelos de calibração (C) e validação (V) de diferentes analitos para desenvolvimento dos melhores modelos para o espectrofotômetro infravermelho próximo (NIRS)

Analito	Pré-tratamentos ¹	PC ²	n ³ (C/V)	Amplitude (C/V)	Valor de Q ⁴	SEC ⁵	SEP ⁶	r ⁷ (C/V)	R ² ⁸ (C/V)	Viés ⁹ (C/V)	DP ¹⁰ (C/V)
MS	mf ¹¹ , dg1 ¹²	4	185 / 95	904,7-946,5 / 906,8-945,1	0,54	0,48	0,6	0,79 / 0,78	0,62 / 0,61	0 / 0,03	0,48 / 0,60
	mf	4	185 / 95	904,7-946,5 / 906,8-945,1	0,5	0,54	0,69	0,72 / 0,70	0,52 / 0,49	0 / 0,02	0,54 / 0,69
MM	n01 ¹³ , dg1	4	180 / 94	40,8-112,8 / 48,4-107,8	0,66	0,6	0,65	0,91 / 0,90	0,83 / 0,81	0 / -0,07	0,60 / 0,65
	mf	4	180 / 94	40,8-112,8 / 48,4-107,8	0,53	0,99	0,95	0,72 / 0,79	0,52 / 0,62	0 / -0,23	1,00 / 0,95
PC	mf	3	190 / 102	670,1-916,4 / 672,0-901,2	0,65	1,88	1,86	0,93 / 0,94	0,97 / 0,89	0 / 0,15	1,88 / 1,86
	sa3 ¹⁴	3	190 / 102	670,1-916,4 / 672,0-901,2	0,65	1,85	1,86	0,93 / 0,94	0,87 / 0,89	0 / 0,23	1,85 / 1,86
FDN	sa3	4	200 / 94	623,6-879,2 / 631,7-847,2	0,64	1,72	1,51	0,95 / 0,96	0,91 / 0,92	0 / -0,14	1,72 / 1,51
	mf	4	200 / 94	623,6-879,2 / 631,7-847,2	0,64	1,72	1,54	0,95 / 0,96	0,91 / 0,92	0 / -0,23	1,72 / 1,54
FDA	dg1, n01	2	190 / 94	379,0 -611,5 / 389,2-588,2	0,43	-0,87	3,46	0,81 / 0,79	0,65 / 0,63	0 / -0,58	3,16 / 3,46
	mf	2	190 / 94	379,0 -611,5 / 389,2-588,2	0,42	-0,99	3,76	0,75 / 0,75	0,56 / 0,56	0 / -0,87	3,58 / 3,76
LDA	sa3, dg2 ¹⁵ , SNV ¹⁶	4	190 / 90	38,8-104,8 / 45,7-102,0	0,53	0,88	0,97	0,80 / 0,78	0,65 / 0,61	0 / 0,09	0,88 / 0,97
	mf	4	190 / 90	38,8-104,8 / 45,7-102,0	0,45	1,23	1,26	0,56 / 0,59	0,31 / 0,34	0 / 0,21	1,23 / 1,25
LBA _{PC}	dg2	3	200 / 98	61,1-173,9 / 74,0-164,4	0,7	0,67	0,71	0,95 / 0,92	0,90 / 0,85	0 / 0,03	0,67 / 0,71
	mf	3	200 / 98	61,1-173,9 / 74,0-164,4	0,58	0,9	1,02	0,90 / 0,85	0,82 / 0,72	0 / 0,07	0,90 / 1,02
LBA _{FDN}	n01	4	194 / 92	65,5-162,1 / 86,3-157,7	0,66	0,86	0,83	0,88 / 0,88	0,78 / 0,77	0 / 0,03	0,86 / 0,83
	mf	4	194 / 92	65,5-162,1 / 86,3-157,7	0,6	0,92	0,97	0,86 / 0,83	0,75 / 0,69	0 / 0,0004	0,92 / 0,97
DIVMS	sa3, SNV	5	188 / 96	380,6-791,6 / 393,5-767,7	0,59	3,34	3,28	0,93 / 0,92	0,86 / 0,86	0 / 0,06	3,34 / 3,28
	mf	5	188 / 96	380,6-791,6 / 393,5-767,7	0,55	3,49	3,63	0,92 / 0,91	0,85 / 0,82	0 / 0,12	3,49 / 3,63
DIVFDN	sa3, dg1	4	188 / 92	298,9-740,2 / 334,7-724,9	0,57	3,62	3,6	0,92 / 0,91	0,84 / 0,83	0 / -0,52	3,62 / 3,59
	mf	4	188 / 92	298,9-740,2 / 334,7-724,9	0,5	4,29	4,44	0,88 / 0,86	0,77 / 0,74	0 / -0,38	4,29 / 4,44

Fonte: Guimarães (2019). ¹Transformações; ²Componentes Principais (*Principal Components* – número de fatores); ³Número de amostras; ⁴Valor de qualidade da calibração; ⁵Erro padrão de calibração ("Standard error calibration"); ⁶Erro padrão de predição ("Standard error prediction"); ⁷Correlação; ⁸Coefficiente de determinação; ⁹Erro sistemático ou tendenciosidade; ¹⁰Desvio Padrão; ¹¹Multiplicative scatter correction full; ¹²Primeira derivada; ¹³Normalização entre 0 e 1; ¹⁴Alisamento com 3 pontos; ¹⁵Segunda Derivada; ¹⁶Transformação normal de variação ("Standard normal variate").

dados ópticos altamente correlacionados. Ou seja, eles são mais robustos do que outros métodos de análise de dados.

Porém, não se deve esquecer que para conseguir uma calibração robusta é necessário que as amostras sejam coletadas durante um período de tempo, variando a composição, processo de produção, período de produção e área de produção. Também, o tempo entre a determinação em laboratório e a coleta dos espectros NIRS deve ser o mais curto possível (HINDLE et al., 2008). Estes cuidados foram tomados no presente trabalho.

5.4.2 Validações externas

As estatísticas de desempenho das melhores regressões para cada um dos parâmetros químicos usando a população de capins *Brachiaria* são apresentados na Tabela 16.

A ASTM E 1655 05 (2000) preconiza para validação externa, um conjunto de amostras que tenham valores que cubram 95% dos valores das propriedades das amostras de calibração, isto é, a amplitude e o desvio padrão destes valores para as amostras de validação deve ser pelo menos 95% daqueles das amostras de calibração, para confirmação efetiva da capacidade preditiva dos modelos.

É preciso ter cuidado ao fazer comparações entre resultados de diferentes trabalhos, pois certos tipos de diferenças como gênero de plantas, preparações das amostras ou o fato de se fazer validação cruzada ou externa, podem levar a manobras e resultados completamente distintos.

Melhores resultados de RMSEP foram alcançados por Simeone et al. (2015), com o mesmo gênero de gramíneas, sob as mesmas condições e com o mesmo tipo de instrumento NIRS: FDN = 1,74; FDA = 1,46; LDA = 0,57 DIVMS = 2,60.

Em um trabalho com silagem de forragens (gramíneas, leguminosas e mistura das duas – *Lotus*, *Festuca*, *Lolium*, *Leucena*), Restaino et al. (2009) conseguiram SEP da validação para FDN, FDA e DIVMS iguais a 8,1, 4,8 e 4,5, respectivamente. Talvez piores do que os presentes resultados por terem utilizado vários gêneros de plantas, e conservadas (LUTZ et al., 1984).

Tabela 16. Descrição dos resultados de validação externa pelo método espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS; n=20): parâmetros químicos e digestibilidade de amostras de *Brachiaria* spp. e estatísticas

Item	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Offset ¹	Slope ²	RMSEP ³	SEP ⁴	RSD ⁵	Bias ⁶
Matéria seca	923,9	914,9	948,4	8,41	5,93	0,92	1,25	0,41	0,41	-1,18
Matéria mineral	73,3	47,2	102,5	15,73	-0,59	1,09	1,02	1,03	1,04	0,08
Parede celular	796,1	701,1	865,4	47,53	12,17	0,85	2,01	2,03	1,93	0,03
Fibra em detergente neutro	741,3	641,9	803,3	48,66	-3,28	1,00	3,77	2,03	2,06	-3,19
Fibra em detergente ácido	470,8	364,7	547,1	47,33	-5,29	1,07	3,16	2,46	2,48	-2,02
Lignina em detergente ácido	68,8	51,9	95,8	12,25	0,81	0,81	1,06	0,93	0,91	-0,52
Lignina em brometo de acetila (PC) ⁷	121,9	69,9	155,3	21,29	2,61	0,87	1,41	0,86	0,84	1,12
Lignina em brometo de acetila (FDN) ⁸	111,4	66,9	148,5	18,85	0,02	1,00	0,85	0,86	0,88	-0,03
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca	639,4	491,6	784,6	76,37	-2,87	1,04	3,67	3,71	3,75	-0,34
Digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro	567,1	398,8	774,7	92,37	-1,94	1,01	3,64	3,46	3,51	-1,30

Fonte: Guimarães (2019). ¹Deslocamento do intercepto; ²Coeficiente angular; ³Rais quadrada média do erro de predição; ⁴Erro padrão da predição; ⁵Desvio padrão relativo; ⁶Viés da validação externa; ⁷Parede celular como substrato; ⁸Fibra em detergente neutro como substrato.

Porém, em um trabalho com 75 amostras, dos gêneros *Bothriochloa*, *Digitaria*, *Eragrostis*, *Tanganyka* e *Panicum*, os autores encontraram SEP igual a 2,49 para FDN, 0,71 para LDA e 1,33 para DIVMS. Também são muitos gêneros de forrageiras, porém obtiveram alguns resultados melhores do que os do presente estudo. No mesmo trabalho, conseguiram viés para FDN = 0,16, para LDA = 0,07 e para DIVMS = 2,17 de validação externa. Os dois primeiros resultados melhores do que os do presente projeto, e o último pior.

Destacando-se o baixo custo de análise e reduzida necessidade de preparo das amostras, vê-se que o NIRS tem potencial para quantificação das propriedades em questão. O maior problema foi a amplitude entre os valores de máximo e mínimo, que gerou dificuldade de se melhorar os parâmetros de calibração e validação externa, como r , R^2 , valor de Q , RMSEP, bem como a inclinação da reta (DIAS; DEL SANTO; SOUZA, 2012).

Uma forma de contornar esse problema seria escolher pré-tratamentos mais adequados e aumentar o número de amostras, uma vez que fontes de erros podem ser principalmente associados à homogeneidade das amostras. As amostras utilizadas para a construção das curvas eram de 2012, por isso o modelo final, utilizado para análises de rotina, necessita ser checado periodicamente para evitar flutuações ao longo do tempo (DIAS; DEL SANTO; SOUZA, 2012).

5.5 Uso de parede celular ou fibra em detergente neutro como substrato para análise da lignina em brometo de acetila

Uma das hipóteses deste trabalho é a de que a análise de lignina em brometo de acetila possa ser conduzida a partir de PC (LBA_{PC}) ou de FDN (LBA_{FDN}), sem que haja interferência negativa no resultado.

Para a mensuração da PC, são necessárias a lavagem sequencial do alimento moído e seco em soluções de extração as quais são: água, etanol, clorofórmio e acetona no aparelho Soxhlet. A extração deve permanecer até que nenhum lixiviado cromógeno seja observado, o que leva entre 4 a 8 horas por reagente (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001).

Resumidamente, a mensuração da FDN proposta por Van Soest envolve a lavagem dos alimentos em solução de detergente neutro (60 minutos) com subsequente

lavagem em água quente (30 minutos) e duas vezes em acetona (10 minutos) para lixiviação dos resíduos digeridos (VAN SOEST; WINE, 1967).

Obviamente, o procedimento de mensuração da FDN é menos laboriosa do que a mensuração da PC. Isto indica que métodos dependentes de PC como substrato para análise seriam muito beneficiados por sua substituição por FDN.

A fração FDN contém em sua grande maioria celulose, hemicelulose e toda a lignina contida na parede celular (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991), sendo assim um possível substituto para ser utilizado em análises de LBA a qual foi desenvolvida com a utilização de PC.

Deste modo, correlações de Pearson entre LBA_{PC} e LBA_{FDN} resultaram em 0,90 e entre estas mesmas análises, mas em NIRS resultaram em 0,93 ($LBA_{PC\ NIRS}$ e $LBA_{FDN\ NIRS}$). Uma explicação para tal fenômeno é que os valores de $LBA_{PC\ NIRS}$ obtiveram menor desvio padrão quando comparados aos valores do LBA_{PC} . Como na fórmula de correlação o valor de ρ (r) é inversamente proporcional ao desvio padrão, tem-se que quando algo foi correlacionado ao LBA_{PC} (de maior desvio padrão) o valor de r foi menor, como demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17. Correlação entre lignina em brometo de acetila vinda da parede celular (PC) e da fibra em detergente neutro (FDN) de amostras de *Brachiaria* spp. (n=20)

Item	LBA_{PC}	$LBA_{PC\ NIRS}$
LBA_{FDN}	0,9047*	0,9380*
$LBA_{FDN\ NIRS}$	0,9007*	0,9313*

Fonte: Guimarães (2019). *Valor de $P < 0,0001$.

Como dito, o método de mensuração da PC é extremamente laborioso, pois demanda mais etapas e tempo do que o método de mensuração do FDN proposto por Van Soest e Wine (1967). Este fato faz com que aumente a probabilidade de erros laboratoriais para a análise de PC justificando maior dispersão dos dados, ou seja, maior erro de mensuração por serem necessárias mais etapas.

Já que se objetiva validar a técnica com a utilização de FDN como preparação fibrosa para fazer a LBA, além da PC, que já era utilizada inicialmente, foi determinado o coeficiente de correlação linear de Pearson para se verificar a força que mantém próximos os dados obtidos por estes dois diferentes procedimentos.

Ou seja, a análise de correlação verifica a existência e o grau de relação entre as variáveis. Uma vez detectada correlação entre os dois conjuntos de dados, é necessário descrever matematicamente essa relação por meio de uma função, a qual é objeto da regressão.

Para análise de correlação e regressão, contrastou-se a variável LBA_{PC} com LBA_{FDN} , as quais foram calculadas utilizando todos os 169 dados deste estudo (Figura 36). Diante da análise de correlação, verificou-se que existe correlação forte entre os dois métodos de análise da LBA com coeficiente de correlação de Pearson ($\rho = r = 0,848$; $P < 0,0001$). Além disso, o coeficiente de determinação, calculado por meio da divisão da soma de quadrados dos tratamentos dividido pela soma de quadrado total dos dados regressão, sugere 71% de explicação pelo modelo proposto ($R^2 = 0,71$).

Outro teste estatístico adequado para se verificar igualdade de retas em uma regressão é o teste de intercepto = 0 e coeficiente angular (*slope*) = 1. Se o valor de probabilidade for maior do que o valor de alfa = 5%, sugere que não há diferença do intercepto = 0 e slope igual = 1 (SAS, 1998).

Nesta regressão entre LBA_{PC} e LBA_{FDN} , o valor de probabilidade foi 0,242, indicando que os valores observados pela análise de LBA utilizando FDN como substrato é acuradamente semelhante ao método de mensuração de LBA utilizando como substrato a PC (Figura 36).

Os principais polissacarídeos presentes na parede celular vegetal são: celulose, hemicelulose e pectina. A pectina compreende a família dos polímeros acídicos tais como homogalacturanas, galactanas e arabinogalatctanas (BACIC et al., 1988).

Várias técnicas analíticas estão disponíveis para a caracterização da fração fibrosa da célula vegeta. O mais antigo e ainda utilizado é o método da fibra bruta (FB; HENNEBERG; STOHMANN, 1859). Entretanto, devido à alta solubilização de polissacarídeos estruturais e lignina seus resultados indicam incompleta mensuração dos carboidratos estruturais da parede celular vegetal.

O sistema de detergentes de Van Soest e coautores têm sido os métodos mais utilizados para análise de fibra em forragens com satisfatória caracterização dos carboidratos estruturais da célula vegetal (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991).

No entanto, tem sido reportado solubilização de polissacarídeos pectináceos da parede celular vegetal quando imersa em detergente neutro (BAILEY; ULYATT, 1970) indicando que, dependendo da forragem a ser analisada (gramínea ou leguminosa) este método pode subestimar os valores de parede celular contido na célula vegetal.

Em se tratando de gramíneas, o método FDN é razoavelmente acurado para mensurar concentração de parede celular, quando comparado as leguminosas, pois possuem menor concentração de pectinas na parede celular, a qual não traz problemas nas análises (THEANDER; WESTERLUND, 1993).

Este fato pode ser a explicação biológica por trás dos resultados obtidos neste estudo, pois com amostras de *Brachiaria* spp. (gramíneas) não foi detectada diferença na mensuração de lignina quando o método LBA_{FDN} foi empregado, quando comparado ao método LBA_{PC} .

Figura 36. Regressão linear simples entre lignina em brometo de acetila a partir de parede celular (LBA_{PC}) e lignina em brometo de acetila a partir de fibra em detergente neutro (LBA_{FDN}), bem como teste de intercepto = 0 e coeficiente angular (slope) = 1 (n=169)

Fonte: Guimarães (2019).

5.6 Regressões entre análises de lignina e digestibilidade

Como dito anteriormente, a mensuração da lignina é uma ferramenta potente do ponto de vista nutricional. Com ela pode-se estimar o valor nutricional das forragens por meio da estimação da digestibilidade do material analisado. A digestibilidade tanto da matéria seca como da FDN é influenciada negativamente pelo nível de lignina presente no alimento. Assim, a avaliação da digestão ruminal de um certo material é uma variável

mais importante do que a própria avaliação dos valores brutos da lignina (JUNG; ALLEN, 1995).

Curvas de regressão, contrastando digestibilidade vs. concentração de lignina, foram calculadas usando valores determinados por três diferentes métodos de mensuração de lignina: LDA, LBA_{PC} e LBA_{FDN}. Como demonstrado (Figura 37) o método LDA subestima a quantidade de lignina quando comparado aos métodos LBA_{FDN} e LBA_{PC}. Esta conclusão pode ser feita analisando o termo independente das equações de regressão, os quais foram 117,3; 210,8 e 228,2, para LDA, LBA_{FDN} e LBA_{PC}, respectivamente.

Outro ponto a ser analisado nas curvas de regressão são os valores dos coeficientes de determinação (R^2), os quais indicam maior poder de explicação do modelo. Para o método LDA o R^2 foi de 20% e para os métodos envolvendo a LBA foi acima de 70%. Estes valores indicam que o método de mensuração de lignina LBA, é mais preciso em estimar a digestibilidade da matéria seca de *Brachiaria* spp.

Resultados semelhantes foram detectados quanto à digestibilidade da FDN quando contrastado aos níveis de lignina por diferentes métodos de mensuração (Figura 38). Em que o método LDA subestima os valores de lignina bem como os valores de digestibilidade. Além disso, baixo coeficiente de determinação foi relatado para o método LDA, quando comparado aos métodos de LBA.

Como já explicado, o método LDA solubiliza parcialmente a lignina presente na parte “non-core”, o que faz com que o método subestime seus valores detectáveis (FUKUSHIMA; DEHORITY; LOERCH, 1991). Sendo assim, valores de digestibilidade frequentemente são subestimados também trazendo consequências desastrosas na formulação de rações, em que nutricionistas devem ter estimativas acuradas para que não impactem negativamente a produtividade dos animais à campo.

Figura 37. Regressão linear simples entre métodos de mensuração de lignina vs. digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (n=169)

Fonte: Guimarães (2019).

Figura 38. Regressão linear simples entre métodos de mensuração de lignina vs. digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) (n=169)

Fonte: Guimarães (2019).

6 CONCLUSÃO

Os métodos LBA_{PC} , $LBA_{PC-NIRS}$, LBA_{FDN} , $LBA_{FDN-NIRS}$ comprovaram ser os indicados para quantificação de lignina em amostras de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* spp., comparados com LDA e LDA_{NIRS} , a partir de análises com digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro.

O método LBA pode ser conduzido a partir de duas preparações fibrosas: parede celular e fibra em detergente neutro. Além disso, espectroscopia no infravermelho próximo mostrou potencial para a quantificação das propriedades da *Brachiaria*: teores de lignina (LBA_{PC} , LBA_{FDN} , LDA) e outros nutrientes (MS, MM, PC, FDN, FDA, DIVMS E DIVFDN). Porém, as calibrações feitas a partir de NIRS para mensurar MS, FDA, LDA, DIVMS e DIVFDN precisam de revisão antes de serem utilizadas em análises de rotina.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, S. M.; MERTENS, D. R.; NORRIS, K. H.; WESTERHAUS, M. O.; WINDHAM, W. R.; MARTIN, N. P.; CLARK, D. H.; SHENK, J. S. **Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality**. [s.l.] United States Department of Agriculture (ARS-USDA), 1989.
- ACHARYA, D.; RANI, A.; AGARWAL, S.; SINGH, V. Application of adaptive Savitzky–Golay filter for EEG signal processing. **Perspectives in Science**, v. 8, p. 677–679, 2016.
- ADESOGAN, A. T.; KIM, S. C.; ARRIOLA, K. G.; DEAN, D. B.; STAPLES, C. R. Strategic addition of dietary fibrolytic enzymes for improved, Performance of lactating dairy cows. In: 18th Florida Ruminant Nutrition Symposium, **Proceedings...** Gainesville: University of Florida. 2007. p. 92 – 110.
- AGELET, L. E.; HURBURGH, C. R. A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 246–260, 2010.
- AKIN, D. E.; ROBINSON, E. L.; BARTON, F. E.; HIMMELSBACH, D. S. Changes with Maturity in Anatomy , Histochemistry , Chemistry , and Tissue Digestibility of Bermudagrass Plant Parts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 179–186, 1977.
- ALFAIA, C. P. M.; ALVES, S. P.; MARTINS, S. I. V.; COSTA, A. S. H.; FONTES, C. M. G. A.; LEMOS, J. P. C.; BESSA, R. J. B.; PRATES, J. A. M. Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle , with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 939–946, 2009.
- ALLEN, M. S. Relationship Between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1447–1462, 1997.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D. R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **Journal of Nutrition**, v. 118, n. 2, p. 261–270, 1988.
- ALLEN, M. S.; PIANTONI, P. Carbohydrate Nutrition: Managing Energy Intake and Partitioning Through Lactation. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 577–597, 2014.
- ALLEN, M. S.; VOELKER, L. J. A. In vivo methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 2007. **Anais...** Pirassununga: Universidade de São Paulo, p. 72-89.
- ALLINSON, D. W.; OSBOURN, D. F. The cellulose-lignin complex in forages and its relationship to forage nutritive value. **The Journal of Agricultural Science**, v. 74, n. 1, p. 23–36, 1970.

ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; XAVIER, D. F. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no País. **Embrapa gado de Leite**, v. Comunicado, p. 3–6, 2002.

ANDRADE, C. M. S. de; ASSIS, G. M. L. de. **Capim-Xaraés: Cultivar de Gramínea Forrageira Recomendada para Pastagens no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2008.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis**, 18th ed., Gaithersburg, MA., USA, 2006.

ASTM E 1655 05, **Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**, 2000.

ATSUSHI, K.; AZUMA, J. ichi; TETSUO, K. Lignin-carbohydrate complexes and phenolic acids in bagasse. **Holzforschung**, v. 38, n. 3, p. 141–149, 1984.

BAILEY, R. W.; ULYATT, M. J. Pasture quality and ruminant nutrition: II. Carbohydrate and lignin composition of detergent- extracted residues from pasture grasses and legumes. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 3, p. 591–604, 1970.

BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. In: *The Biochemistry of Plants*. J. Preiss, ed. Academic Press, New York, NY, 1988. P. 297–371.

BALABIN, R. M.; SAFIEVA, R. Z. Gasoline classification by source and type based on near infrared (NIR) spectroscopy data. **Fuel**, v. 87, n. 7, p. 1096–1101, 2008.

BALSALOBRE, A. M.; CORSI, M.; SANTOS, P. M.; VIEIRA, I.; CÁRDENAS, R. R. Composição Química e Fracionamento do Nitrogênio e dos Carboidratos do Capim-Nutritional Quality of Irrigated Tanzaniagrass under Three Post Grazed Stubbles Intensities. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 519–528, 2003a.

BALSALOBRE, M. A. A.; CORSI, M.; SANTOS, P. M.; PENATI, M. A.; DEMETRIO, C. G. B. Cinética da degradação ruminal do capim tanzânia irrigado sob três níveis de resíduo pós-pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 SUPPL. 1, p. 1747–1762, 2003b.

BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 43, n. 5, p. 772–777, 1989.

BARTON, F. . I. Progress in near infrared spectroscopy: the people, the instrumentation, the applications. **NIR news**, v. 14, n. 2, p. 10–18, 2003.

BAUMGARDT, B. R.; TAYLOR, M. W.; CASON, J. L. Evaluation of Forages in the Laboratory. II. Simplified Artificial Rumen Procedure for Obtaining Repeatable Estimates of Forage Nutritive Value. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 1, p. 62–68, 1961.

BEN-GERA, I.; NORRIS, K. H. Direct spectrophotometric determination of fat and

moisture in meat products. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 1, p. 64–67, 1968.

BERNARDES, T. F.; SCHMIDT, P.; DANIEL, J. L. P. IV International Symposium on Forage Quality and Conservation. In: XVII International Silage Conference. Anais...Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2015. 621p.

BESLE, J.; JOUANY, J.; CORNU, A. Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 33–52, 1995.

BETEMPS, D. L.; FACHINELLO, J. C.; GALARA, S. P.; MACHADO, N. P.; REMORINI, D.; MASSAI, R.; AGATI, G. Espectroscopia do visível e infra-vermelho próximo para estimar sólidos solúveis e firmeza de polpa em função da época de colheita em pêssegos. **Ciencias Agrarias**, v. 35, n. 3, p. 1257–1266, 2014.

BIBBY, J., TOUTENBURG, H. In: Prediction and Improved Estimation in Linear Models. John Wiley & Sons, London, England, 1977. p. 16-19.

BIDLACK, J. E. **Cell-wall components and lignin biosynthesis in forages**. 1990. Iowa State University, 1990.

BIDLACK, J. E.; BUXTON, D. R. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 818, p. 809–818, 1992.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. In: Proceedings of the Oklahoma Academy of Science, **Anais...**1992.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286–290, 1985.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003.

BOLWELL, G. P. Synthesis of Cell Wall Components : Aspects of Control. v. 27, n. 5, p. 1235–1253, 1988.

BOTREL, M. A.; NOVAES, L. P.; ALVIM, M. J. **Características de forrageiras de algumas gramíneas tropicais**. [s.l: s.n.]

BOUDET, A. M.; GRIMA-PETTENATI, J. Lignin genetic engineering. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 1, p. 25–39, 1996.

BOUROCHE, J. M.; SAPORTA, G. Análise de dados. Zahar Editores, Rio de Janeiro, 116 p, 1982.

BRITO, C. J. F. A. De; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 SUPPL. 2, p. 1835–1844, 2003.

BÜCHI LABORTECHNIK. **Operation Manual, NIRCal 5.5**, 2016.

BUCKERIDGE, M. S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017–1023, 2010.

BURNS, J. C. ASAS Centennial Paper: Utilization of pasture and forages by ruminants: A historical perspective. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 12, p. 3647–3663, 2008.

BUXTON, D. R.; MERTENS, D. R.; MOORE, K. J.; BOYD, L. J.; OLDFIELD, J. E. Forage Quality for Ruminants: Plant and Animal Considerations. **The Professional Animal Scientist**, v. 11, n. 3, p. 121–131, 1995.

CACCAMO, M.; FERGUSON, J. D.; VEERKAMP, R. F.; SCHADT, I.; PETRIGLIERI, R.; AZZARO, G.; POZZEBON, A.; LICITRA, G. Association of total mixed ration particle fractions retained on the Penn State Particle Separator with milk, fat, and protein yield lactation curves at the cow level. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2502–2511, 2014.

CAIXETA, P. V.; SIMEONE, M. L. F.; GONTIJO, M. M.; NETO; GUIMARÃES, C. de C.; GOMES, P. C.; MEDEIROS, E. de P. Desenvolvimento de um modelo de regressão multivariado para determinação do teor de matéria seca em braquiária empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR). In: **Seminário de iniciação científica**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), 2013. p. 5.

CARMEN, G. B.; DOMINIQUE, B.; GOSSELINK, R. J. A.; VAN DAM, J. E. G. Characterization of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy, *Industrial Crops and Products*, v. 20, n. 2, 205–218, 2004.

Censo Agropecuário IBGE 2017. Disponível em:

<[https://censos,ibge.gov,br/agro/2017/templates/censoagro/resultadosagro/estabelecimentos.html](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censoagro/resultadosagro/estabelecimentos.html)>. Acessado em 07/08/2018.

CHAI, T.; DRAXLER, R. R. Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)? -Arguments against avoiding RMSE in the literature. **Geoscientific Model Development**, v. 7, n. 3, p. 1247–1250, 2014.

CHANG, X. F.; CHANDRA, R.; BERLETH, T.; BEATSON, R. P. Rapid, microscale, acetyl bromide-based method for high-throughput determination of lignin content in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6825–6834, 2008.

CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610–621, 2017. CHESSON, A. Mechanistic Models of Forage Cell Wall. In: **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p. 347–376.

CHESSON, A.; GORDON, A. H.; LOMAX, J. A. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. **Journal of the Science of Food**

and Agriculture, v. 34, n. 12, p. 1330–1340, 1983.

CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S. K. Organosolv Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Poplars. 2. Catalyst Effects and the Combined Severity Parameter. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 29, n. 2, p. 156–162, 1990.

CLARK, D. H.; LAMB, R. C. Near Infrared Reflectance Spectroscopy: A Survey of Wavelength Selection To Determine Dry Matter Digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 7, p. 2200–2205, 1991.

CLINE, S. P.; SMITH, P. M. Opportunities for lignin valorization: an exploratory process. **Energy, Sustainability and Society**, v. 7, n. 1, 2017.

CLUTTON-BROCK, J. A Natural History of Domesticated Mammals, Cambridge University Press, UK, 1999. 238 p.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

CONRAD, H. R.; WEISS, W. P.; ODWONGO, W. O.; SHOCKEY, W. L. Estimating Net Energy Lactation from Components of Cell Solubles and Cell Walls¹. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 427–436, 1984.

D. N. MOWAT, M. L. KWAIN, J. E. W. Lignification and *in vitro* cell wall digestibility of plant parts. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 49, p. 499–504, 1969.

DALEY, C. A.; ABBOTT, A.; DOYLE, P. S.; NADER, G. A.; LARSON, S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 10, p. 1–12, 2010.

DARDENNE, P.; SINNAEVE, G.; BAETEN, V. Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: Which method? **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 8, n. 4, p. 229–237, 2000.

DEAVILLE, E.; FLINN, P. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. In: Givens, D.I., E. Owen, R.F.E. Axford, and H.M. Omedi (Eds.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. CABI Publishing, Wallingford, UK, 2000. p. 301-320.

DE PALMA, A. S. V.; BARRA, N. C.; HERLING, V. R.; GOMIDE, C. A.; NETTO, A. S. Suplementação com aditivos nutricionais e minerais orgânicos no desempenho de bezerros Nelore recém-desmamados em pastagem. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 11, p. 1071–1078, 2015.

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

DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R.; CONRAD, H. R. Digestibility of forage hemicellulose and pectin by rumen bacteria *in vitro* and the effect of lignification

Thereon. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 4, p. 508–512, 1962.

DEL SANTO, V. R.; SOUZA, G. B. De; NOGUEIRA, A. R. de A.; PICCHI, C. M. C.; GARCIA, C. H. Determinação das propriedades das forrageiras por meio de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS). In: Encontro nacional sobre métodos dos laboratórios da Embrapa. Novas perspectivas para os laboratórios da Embrapa, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas, RS: 2010.

DELMER, D. P. Cellulose Biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, n. 1, p. 259–290, 1987.

DEMINICIS, B. B.; ARAÚJO, R. P.; NORBERTO SILVA, R.; ABREU, M. L. C.; GUERRA, R. N.; NICOLINI, B. R.; FILHO, A. D. P.; RODRIGUES, P. do R. Composição químico-bromatológica do feno de capim elefante amonizado com uréia. **PUBVET**, v. 8, n. 13, p. 1551–1697, 2014.

DERESZ, F.; PAIM-COSTA, M. L.; CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; RODRIGUES DE ABREU, J. B. Composição química, digestibilidade e disponibilidade de capim-elefante cv. Napier manejado sob pastejo rotativo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 863–869, 2006.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a Determinação de Ácidos Fenólicos na Parede Celular de Forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1634–1639, 2002.

DHANOVA, M. S.; LISTER, S. J.; SANDERSON, R.; BARNES, R. J. The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra. **Near Infrared Spectroscopy**, v. 2, p. 43–47, 1994.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 700–707, 2002.

DIAS-FILHO, M. B. **Sistemas Silvopastoris na Recuperação de Pastagens Degradadas**. Belém, PA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Amazônia Oriental, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. 33p.

DIAS FILHO, M. B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. 1ª ed. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

DIAS, M.; DEL SANTO, V. R.; SOUZA, G. B. Desenvolvimento de modelo de calibração por meio de NIR para a espécie de forrageira alfafa (Medicago Sativa). In: Encontro nacional sobre metodologias e gestão de laboratórios da Embrapa, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012.

DILLON, A. J. P. Cellulases. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Said, S.; Pietro, R. C. L. R. (Eds.) Editora Legis Summa, 2004. p. 243-269.

DRACKLEY, J. K.; DONKIN, S. S.; REYNOLDS, C. K. Major Advances in Fundamental Dairy Cattle Nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1324–1336, 2006.

DWARI, S.; MONDAL, A. K. Systematic studies (morphology, anatomy and palynology) of economically viable grass *Brachiaria mutica* (Forsskil) Stapf in Eastern India. **African Journal of Plant Science**, v. 5, n. 5, p. 296–304, 2011.

EL MANSOURI N-E.; SALVADÓ J. Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p.116-24, 2007.

EMBRAPA. 2º Workshop da Rede NIR Embrapa. (M. L. F. Simeone, M. M. G. Neto, G. B. de Souza, C. Pasquini, Eds.) In: Documentos 151, Sete Lagoas, MG. **Anais...** Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

ENGELS, F. M. Some Properties of Cell Wall layers Determining Ruminant Digestion. In: CHESSON, A.; ORSKOV, E. R. (Ed.). **Physico-Chemical Characterisation of Plant Residues for Industrial and Feed Use**. London: Applied Science Publishers, 1989. p. 80–87.

ENGELS, F. M.; JUNG, H. G. Alfalfa Stem Tissues : Cell-wall Development and Lignification. **Annals of Botany**, v. 82, p. 561–568, 1998.

EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; VALLE, C. B. do; DIFANTE, G. dos S.; BARBOSA, R. A.; CACERE, E. R. Valor nutritivo da forragem e produção animal em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 98–106, 2009.

ESBENSEN, K. H. **Multivariate data analysis** - In practice, 5th ed., Oslo, 2004.

FAHEY, G. C.; MCLAREN, G. A.; WILLIAMS, J. E. Lignin Digestibility by Lambs Fed both Low Quality and High Quality Roughages, **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 4, p. 941–946, 1979.

FAHEY, L. M.; NIEUWOUDT, M. K.; HARRIS, P. J. Using near infrared spectroscopy to predict the lignin content and monosaccharide compositions of *Pinus radiata* wood cell walls. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 507–514, 2018.

FAHEY, L. M.; NIEUWOUDT, M. K.; HARRIS, P. J.; FAHEY MICHÉL K NIEUWOUDT PHILIP J HARRIS, L. M.; FAHEY Á P J HARRIS, L. M.; NIEUWOUDT, M. K. Predicting the cell-wall compositions of *Pinus radiata* (radiata pine) wood using ATR and transmission FTIR spectroscopies. **Cellulose**, v. 24, n. 12, p. 5275–5293, 2017.

FAN, L. T.; LEE, Y.-H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 1, p. 177–199, 1980.

FAO. **The state of food and agriculture: Livestock in balance**. [s.l: s.n.]

FAO; OPAS. **América Latina e o Caribe - Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional: Sistemas alimentares sustentáveis para acabar com a fome e a má**

nutrição. Santiago, Chile: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), 2017.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. de. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238–243, 2010.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria** – Conceitos, Métodos e Aplicações, 1 ed, Campinas, Unicamp, 2015.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. O. Quimiometria 1: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

FERRIS, C. P.; GORDON, F. J.; PATTERSON, D. C.; MAYNE, C. S.; KILPATRICK, D. J. The influence of dairy cow genetic merit on the direct and residual response to level of concentrate supplementation. **Journal of Agricultural Science**, v. 132, n. 4, p. 467–481, 1999.

FONNESBECK, P. V, Estimating nutritive value from chemical analyses. In: FONNESBECK, P. V.; HARRIS L. E.; KEARL L. C. (Eds.), First international symposium feed composition, animal nutrient requirements, and computerization of diets. Utah Agr. Exp. Stn. Utah State University, Logan, **Proceedings...** p. 219–231, 1976.

FONTANELI, R. S.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; DÜRR, J. W.; APPELT, J. V.; BORTOLINI, F.; HAUBERT, F. A. Predição da composição química de bermudas (*Cynodon spp.*) pela espectroscopia de reflectância no infravermelho proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 838–842, 2004.

FRANCIS, C. A.; PRAGER, M.; LAING, D. R.; FLOR, C. A. Genotype x environment interactions in bush bean cultivars in monoculture and associated with maize, **Crop Science**, v. 18, p. 237–242, 1978.

FREITAS, J. C.; SANTOS, S. A.; TOMICH, T. R.; FRANCO, G. L. Predição do valor nutritivo de gramínea nativa e exótica no pantanal por meio do método de reflectância no infravermelho próximo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 2, p. 251–259, 2016.

FREUDENBERG, K., NEISH, A. C. Constitution and Biosynthesis of Lignin, **Molecular-Biology Biochemistry and Biophysics**, v. 2, Berlin: Springer-Verlag, 1968. 129 p.

FUKUSHIMA, R. S. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by ruminal microorganisms, 1989. 125 p. Thesis (Ph.D. in Animal Nutrition) - The Ohio State University, Columbus, OH: OSU, 1989.

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A. Modificação do método colorimétrico “lignina solúvel em brometo de acetila” na estimativa da lignina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 2, p. 192–203, 1995.

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. **Journal of Animal**

Science, v. 78, n. 12, p. 3135–3143, 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S. C. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effects of lignin on forage digestion by ruminal microorganisms. **Journal of animal science**, v. 69, n. 1, p. 295–304, 1991.

FUKUSHIMA, R. S.; GARIPPO, G.; HABITANTE, A. M. Q. B.; LACERDA, R. S. Extração da Lignina e Emprego da Mesma em Curvas de Calibração para a Mensuração da Lignina em Produtos Vegetais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1302–1311, 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3133–3139, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3713–3720, 2004.

FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S. Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3505–3509, 2011.

FUKUSHIMA, R.S.; KERLEY, M.S.; PORTER, J.H.; KALLENBACH, R. Emprego do método lignina brometo de acetila para quantificar o teor de lignina em gramíneas. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 46, 2009. Maringá. **Anais...** Maringá: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009. (CD-ROM).

FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S.; RAMOS, M. H.; PORTER, J. H.; KALLENBACH, R. L. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with *in vitro* forage degradability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 25–37, 2015.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. D. F. Correlação entre digestibilidade *in vitro* da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 302–309, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Photocatalytic interaction of resazurin N-Oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture media. **Anaerobe**, v. 8, n. 1, p. 29–34, 2002.

GASQUES, J. G.; BACCHI, M. R. P.; BASTOS, E. T. Crescimento e Produtividade da Agricultura Brasileira. **Carta de Conjuntura - IPEA**, v. 38, n. 1º trimestre, p. 1–9, 2018.

GASPAR, A. **Física Séria Brasil**, Editora Ática, São Paulo, 2004. 495 p.

GAZZONI, D. L. **2050, desafios e oportunidades para o agronegócio**. Disponível em:

<http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=1085:catid=28&Itemid=23>.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least-Squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1–17, 1986.

GERON, L. J. V.; DA SILVA CABRAL, L.; TRAUTMANN-MACHADO, R. J.; ZEOULA, L. M.; OLIVEIRA, E. B.; GARCIA, J.; GOÑALVES, M. R.; AGUIAR, R. P. S. Avaliação do teor de fibra em detergente neutro e ácido por meio de diferentes procedimentos aplicados às plantas forrageiras. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1533–1542, 2014.

GICHANGI, E. M.; NJARUI, D. M. G.; GATHERU, M. Plant shoots and roots biomass of *Brachiaria* grasses and their effects on soil carbon in the semi-arid tropics of Kenya. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 20, p. 65–74, 2017.

GIDDINGS, T. H.; BROWER, D. L.; STAEHELIN, L. A. Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias Denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. **Journal of Cell Biology**, v. 84, n. 2, p. 327–339, 1980.

GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation : interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 55, p. 295–334, 1995.

GIGER, S. Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. **Annales de Zootechnie**, v. 34, n. 1, p. 85–122, 1985.

GIVENS, D. I.; COTTYN, B. G.; DEWEY, P. J. S.; STEG, A. A comparison of the neutral detergent-cellulase method with other laboratory methods for predicting the digestibility in vivo of maize silage from three European countries. **Animal Feed Science and Technology**, v. 54, p. 55–64, 1995.

GOBBI, K. F.; LUGÃO, S. M. B.; BETT, V.; ABRAHÃO, J. J. S.; TACAIAMA, A. A. K. Massa de forragem e características morfológicas de gramíneas do gênero *Brachiaria* na região do arenito caiué/PR. **Boletim de Indústria Animal**, v. 75, p. 1–9, 2018.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analyses (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications)**. Washington, DC: United States Department of Agriculture (ARS-USDA), 1970.

GOMES, D. I.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. de C.; FUKUSHIMA, R. S.; DE SOUZA, M. A.; VALENTE, T. N. P.; PAULINO, M. F.; DE QUEIROZ, A. C. Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n. 3–4, p. 206–222, 2011.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2609–2614, 1998.

HACKMANN, T. J.; SPAIN, J. N. Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. **Journal of Dairy**

Science, v. 93, n. 4, p. 1320–1334, 2010.

HAHLBROCK, K.; GRISEBACH, H. Enzymic Controls in the and Fla Vonoids1. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, p. 105–130, 1979.

HALIM, R. A.; BUXTON, D. R.; HATTENDORF, M. J.; CARLSON, R. E. Water-Stress Effects on Alfalfa Forage Quality After Adjustment for Maturity Differences. **Agronomy Journal**, v. 81, n. 2, p. 189, 1989.

HALL, J. W.; MCNEIL, B.; ROLLINS, M. J.; DRAPER, I.; THOMPSON, B. G.; MACALONEY, G. Near-Infrared Spectroscopic Determination of Acetate , Ammonium , Biomass , and Glycerol in an Industrial Escherichia coli Fermentation. **Applied Spectroscopy**, v. 50, n. 1, p. 102–108, 1996.

HARE, M. D.; PIZARRO, E. A.; PHENGPHET, S.; SONGSIRI, T.; SUTIN, N. Evaluation of new hybrid *Brachiaria* lines in Thailand. 1. Forage production and quality. **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, v. 3, n. 2, p. 83, 2015.

HARTLEY, R. D. p-Coumaric and ferulic acid components of cell-walls of ryegrass and their relationship with lignin and digestibility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 1347, 1972.

HATFIELD, R. D. Structural Polysaccharides in Forages and Their Degradability. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 39–46, 1989.

HATFIELD, R. D.; JUNG, H. G.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 51–58, 1994.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. **Crop Science**, v. 39, n. 1, p. 27–37, 1999.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 832–839, 2005.

HENNEBERG, W.; STOHMANN, F. U"ber das Erhaltungsfutter vollja'hrigen Rindviehs. *J. Landwirtsch.* v.3, p. 485–551, 1859.

HERSCHEL, W. Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 90, p. 284–292, 1800.

HERTH, W. Plasma-membrane rosettes involved in localized wall thickening during xylem vessel formation of *Lepidium sativum* L. **Planta**, v. 164, n. 1, p. 12–21, 1985.

HIBBERT, H. Studies on Lignin and Related Compounds. XXXVII. The Structure of Lignin and the Nature of Plant Synthesis. **Journal of the american chemical society**, v. 61, n. 3, p. 725–731, 1939.

HIGUCHI, T.; ITO, Y.; KAWAMURA, I. p-Hydroxyphenylpropane component of Grass Lignin and Role of Tyrosine-Ammonia Lyase in Its Formation. **Phytochemistry**, v. 6, p. 875–881, 1967.

HIGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIMADA, M.; KAWAMURA, I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. **Phytochemistry**, v. 6, n. 11, p. 1551–1556, 1967.

HINDLE, P. H.; BJØRSVIK, H.-R.; MARTENS, H.; OSBORNE, B. G.; WILLIAMS, P.; WORKMAN, J. J.; SIESLER, H. W.; JEROME J. WORKMAN, J.; BURNS, D. A.; DAHM, D. J.; GRIFFITH, P. R.; CIURCZAK, E. W.; FRANKHUIZEN, R. **Handbook of near-infrared analysis**. 3. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.

HOFMANN, R. R. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. **Oecologia**, v. 78, n. 4, p. 443–457, 1989.

HOFMANN, R. R.; STEWART, D. R. M. Grazer of browser: a classification based on the stomach structure and feeding habits of East African ruminants. **Mammalia**, v. 36, n. 1, p. 226–240, 1972.

HOPKINS, D. What is a Norris derivative? **NIR news**, v. 12, n. 3, p. 3–5, 2001. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1255/nirn.611>>.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of Educational Psychology**, v. 24, n. 6, p. 417–441, 1933.

HOUTMAN, C. j.; ATALLA, R. H. Cellulose-Lignin interactions. **Plant Physiology**, v. 107, n. 1 995, p. 977–984, 1995.

HUANG, Y.; LU, R.; CHEN, K. Prediction of firmness parameters of tomatoes by portable visible and near-infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 185–198, 2018.

HUNT, W. H.; FULK, D. W.; ELDER, B.; NORRIS, K. Collaborative study on infrared reflectance devices for determination of protein in hard red winter wheat, and for protein and oil in soybeans. **Cereal Foods World** v. 22, n. 10, p. 534-536, 1977.

HUNTINGTON, J. A.; GIVENS, D. I. Studies on in situ degradation of feeds in the rumen: 1 . Effect of species , bag mobility and incubation sequence on dry matter disappearance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 64, p. 227–241, 1997.

IAASTD, International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development. McIntyre, B. D.; Herren, H. R.; Wakhungu, J.; Watson, R. T. (Ed.). **Global Report**. Washington,DC. 2009. 590p.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006, Segunda Apuração. Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Rio de Janeiro,RJ: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012.

IBGE. **Censo Agropecuário 2017. Resultados preliminares**. 1ª ed. Rio de Janeiro,RJ: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; MEIKLE, P. J.; NG, K.; RHODES, D. I.; STONE B. A. Cell wall biosynthesis and its regulation, In: Jung, H, G.; Buxton, D, R.; Hatfield, R,D.; Ralph, J, (Eds) Forage cell wall structure and digestibility, American Society of Agronomy, Madison, p. 621–683, 1993.

IYAMA, K.; WALLIS, A. F. A. Determination of Lignin in Herbaceous Plants by an Improved Acetyl Bromide Procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, p. 145–161, 1990.

ILRI; CIAT; ICARDA. **More Meat, Milk, and Fish by and for the Poor**. [s.l: s.n.]

IOWERTH, D.; JONES, H.; HAYWARD, M. V. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 5, p. 711–718, 1975.

IPEAN, I. de P. e E. A. do N.-. Capim Braquiária. In: **Culturas da Amazônia**. 1ª ed. Belém,PA: Setor de Inf. e Divulgação, 1968. p. 9.

JERÓNIMO, J.; MOURA, M. A. N. de. **Cálculo**. [s.l.] Wikilivros, 2008. v. 1

JOHNSON, D. B.; MOORE, W. E.; ZANG, L. C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples, **TAPPI**, v. 44p. 793, 1961.

JUNG, H.-J. G.; VOGEL, K. P. Lignification of switchgrass and big bluestem plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 59, p. 169–176, 1992.

JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2774–2790, 1995.

JUNG, H. G.; BUXTON, D. R. Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and in-vitro degradability for stem internodes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 66, n. 3, p. 313–322, 1994.

JUNG, H. G.; CASLER, M. D. Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth bromegrass fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1–3, p. 63–68, 1991.

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell Wall Lignification and Degradability. In: USDA; MINNESOTA, U. OF (Ed.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison,WI: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p. 315–346.

JUNG, H. G.; ENGELS, F. M. Alfalfa stem tissues: Cell wall deposition, composition, and degradability. **Crop Science**, v. 42, n. 2, p. 524–534, 2002.

JUNG, H. G. G.; MERTENS, D. R. R.; PAYNE, A. J. J. Correlation of Acid Detergent Lignin and Klason Lignin with Digestibility of Forage Dry Matter and Neutral Detergent Fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1622–1628, 1997.

JUNG, H. J. G.; RAETH-KNIGHT, M.; LINN, J. G. Forage fiber digestibility: Measurement, variability, and impact, In: 65th Minnesota Nutrition Conference, **Proceedings...** St, Paul, MN, University of Minnesota, Minneapolis, p. 105– 125, 2004.

JUNG, H. G.; SMITH, R. R.; ENDRES, C. S. Cell wall composition and degradability of stem tissue from lucerne divergently selected for lignin and *in vitro* dry-matter disappearance. **Grass and Forage Science**, v. 49, n. 3, p. 295–304, 1994.

JUNG, H. G.; VAREL, V. H. Influence of Forage Type on Ruminant Bacterial Populations and Subsequent *In Vitro* Fiber Digestion. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 6, p. 1526–1535, 1988.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of animal science**, v. 62, n. 6, p. 1703–1712, 1986.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) *Griseb.* no Brasil. 1ª ed. Planaltina,DF: **Embrapa Cerrados**, 2006.

KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P.; TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The Structure of Plant Cell Walls. **Plant physiology**, v. 51, n. 1, p. 188–196, 1973.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Technometrics Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KHALIL, H. P. S. A.; ALWANI, M. S.; OMAR, A. K. M. Chemical composition, anatomy, lignin distribution, and cell wall structure of Malaysian plant waste fibers. **BioResources**, v. 1, p. 220–232, 2006.

KIM, Y.; SINGH, M.; KAYS, S. E. Near-infrared spectroscopic analysis of macronutrients and energy in homogenized meals. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1248–1255, 2007.

KOHN, R. A.; KALSCHEUR, K. F.; HANIGAN, M. Evaluation of Models for Balancing the Protein Requirements of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3402–3414, 1998.

KOHN, R. A.; KALSCHEUR, K. F.; RUSSEK-COHEN, E. Evaluation of Models to Estimate Urinary Nitrogen and Expected Milk Urea Nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 227–233, 2002.

KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. **Japan Agricultural Research ...**, v. 21, p. 47–52, 1987.

KOURTI, T.; MACGREGOR, J. F. Process analysis, monitoring and diagnosis, using multivariate projection methods. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 28, n. 1, p. 3–21, 1995.

KOVÁCS, L.; JURKOVICH, V.; BAKONY, M.; SZENCI, O.; PÓTI, P.; TŐZSÉR, J.

Welfare implication of measuring heart rate and heart rate variability in dairy cattle: literature review and conclusions for future research. **Animal**, v. 8, n. 2, p. 316–30, 2014.

KOWALSKI, B. R. Chemometrics : views and propositions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 15, n. 4, p. 201–203, 1975.

KOWALSKI, B. R.; BENDER, C. F. Pattern Recognition . 1 A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 16, p. 5632–5639, 1972.

KRAMER, R. Introduction. In: **Chemometric techniques for quantitative analysis**. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 1998. p. 16.

KUOPPALA, K.; RINNE, M.; AHVENJÄRVI, S.; NOUSIAINEN, J.; HUHTANEN, P. The effect of harvesting strategy of grass silage on digestion and nutrient supply in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 3253–3263, 2010.

KVIEN, I.; TANEM, B. S.; OKSMAN, K. Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3160–3165, 2005.

LABORTECHNIK, B. **NIRCal 5.6 Operation Manual**, 2016.

LANZAS, C.; SNIFFEN, C. J.; SEO, S.; TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 3–4, p. 167–190, 2007.

LEAN, I. J.; GOLDER, H. M.; HALL, M. B. Feeding, Evaluating, and Controlling Rumen Function. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 539–575, 2014.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 455–496, 1990.

LOUW-GAUME, A. E.; SCHWEIZER, N.; RAO, I. M.; GAUME, A. J.; FROSSARD, E. Temporal differences in plant growth and root exudation of two *Brachiaria* grasses in response to low phosphorus supply. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 5, n. 3, p. 103, 2017.

LOW, S. Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) Toxicity in Grazing Ruminants. **Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 971–990, 2015.

LOWRY, J. B.; CONLAN, L. L.; SCHLINKB, A. C.; MCSWEENEY, C. S. Acid Detergent Dispersible Lignin in Tropical Grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 41–49, 1994.

LUND, P. The effect of forage type on passage kinetics and digestibility of fibre in dairy cows, Thesis (Doctor of Philosophy), The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark; 2002.

- LUTZ E. E.; TORRES M. B.; SALGUEZ M. L.; ARELOVICH H. M.; HERRERO J. C. Proteína, pared celular y digestibilidad *in vitro* en pasto Ilorón (*Eragrostis curvula*) por reflectancia de rayos infra-rojos. *Revista Argentina de Producción Animal*, v.4, p. 423-429, 1984.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. van; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.
- MADEIRA, T. B.; WATANABE, L. S.; BOVOLENTA, Y. R.; NIXDORF, S. L. Espectroscopia de infravermelho próximo e quimiometria: potencial para controle de qualidade de cafés. In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, **Anais...**2015.
- MCCLURE, W. F.; SANDORFY, C.; BUCHET, R.; LACHENAL, G.; OZAKI, Y.; MORITA, S.; DU, Y.; WILLIAMS, P.; TSUCHIKAWA, S. **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd., 2006.
- MCDUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva I. The composition and output of sheep's saliva. **Journal of Biochemistry**, v. 43, p. 99–109, 1949.
- MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463–1481, 1997.
- MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function, **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1548-1558, 1987.
- MERTENS, D. R. Regulation of forage intake, In: Forage Quality, Evaluation, and Utilization. G. C. Fahey, Jr., M. Collins, D. R. Mertens, L. E. Moser (Eds.), **American Society of Agronomy**, Madison, WI. 1994. 450p.
- METROHM. **NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing process**. Herisau, Suíça, 2013.
- MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L. D.; COELHO, K. O.; RODRIGUES, P. H. M. Validação de modelos de predição das concentrações de nitrogênio ureico no leite do rebanho de vacas holandesas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n. 1, p. 73–80, 2006.
- MITCHELL, P. L. Misuse of regression for empirical validation of models. **Agricultural systems**, v. 54, n. 3, p. 313–326, 1997.
- MOHNEN, D.; BAR-PELED, M.; SOMERVILLE, C. Cell wall polysaccharide synthesis. In: HIMMEL, M. (Ed.). **Biomass Recalcitrance: Deconstructing Plant Cell Wall Bioenergy**. Oxford: Blackwell, 2008. p. 94–187.
- MONRROY, M.; GUTIÉRREZ, D.; MIRANDA, M.; HERNÁNDEZ, K.; GARCÍA, J. R. Determination of *Brachiaria* spp. forage quality by near-infrared spectroscopy and partial least squares regression. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 62, n. 2, p. 3472–3477, 2017.

MONTAGNER, D. B.; ARAÚJO, A. R. de; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; ZIMMER, A. H.; ANDRADE, R. A. S. **Potencial produtivo dos capins BRS Piatã e BRS Paiguás em sistema de integração lavoura-pecuária**. 1ª ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2018.

MOORE, J. E.; MOTT, G. O. Structural Inhibitors of Quality in Tropical Grasses. In: **Anti-Quality Components of Forages**. Madison, WI.: CSSA, Special Publication, 1973. p. 53–98.

MORRISON, I. M. A Semi-micro Method for the Determination of Lignin and its Use in Predicting the Digestibility of Forage Crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 455–463, 1972a.

MORRISON, I. M. Improvements in the Acetyl Bromide Technique to Determine Lignin and Digestibility and its Application to Legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 1463–1469, 1972b.

MORRISON, I. M. Lignin-carbohydrate complexes from *Lolium perenne*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 7, p. 1161–1165, 1974.

MUELLER-HARVEY, I.; HARTLEY, R. D.; HARRIS, P. J.; CURZON, E. H. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. **Carbohydrate Research**, v. 148, n. 1, p. 71–85, 1986.

MUNAKATA, R.; INOUE, T.; KOEDUKA, T.; SASAKI, K.; TSURUMARU, Y.; SUGIYAMA, A.; UTO, Y.; HORI, H.; AZUMA, J.; YAZAKI, K. Characterization of Coumarin-Specific Prenyltransferase Activities in *Citrus limon* Peel. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 7, p. 1389–1393, 2012.

MUTAI, C.; NJUGUNA, J.; GHIMIRE, S. *Brachiaria* Grasses (*Brachiaria* spp.) harbor a diverse bacterial community with multiple attributes beneficial to plant growth and development. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 5, p. 1–11, 2017.

NANBU, T.; SHIMADA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, K.; KOH, T.; MACHINO, M.; OHNO, H.; YAMAMOTO, M.; SAKAGAMI, H. Anti-UV activity of lignin-carbohydrate complex and related compounds. **In Vivo**, v. 27, n. 1, p. 133–140, 2013.

NIE, Z.; HAN, J.; LIU, T.; LIU, X. Hot Topic: Application of Support Vector Machine Method in Prediction of Alfalfa Protein Fractions by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2361–2369, 2008.

NOCEK, J. E. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 1005–1028, 1997.

NOJIRI, M.; KONDO, T. Application of regioselectively substituted methylcelluloses to characterize the reaction mechanism of cellulase. **Macromolecules**, v. 29, n. 7, p. 2392–2395, 1996.

NORMAN, A. G.; JENKINS, S. H. CCLXXXIV. the determination of lignin. II. errors

introduced by the presence of proteins. **Biochemical Journal**, v. 28, n. 6, p. 2160–2168, 1934.

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

NORRIS, K. H. Instrumental techniques for measuring quality of agricultural crops. In: M., L. (Ed.). **Post-Harvest Physiology and Crop Preservation**. Boston, MA: Springer, 1983. p. 471–484.

NORRIS, K. H. Understanding and correcting the factors which affect diffuse transmittance spectra. **NIRnews**, v. 12, n. 3, p. 6-9, 2001.

NORRIS, K. H.; BUTLER, W. L. Techniques for obtaining absorption spectra on intact biological samples. **Ire Transactions on bio-medical electronics**, v. 8, n. 3, p. 153–157, 1961.

NORRIS, K. H.; HART, J. R. 4. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 4, n. 1–4, p. 23–30, 1965.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de Carboidratos Estruturais, In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**, Jaboticabal: Funep. P. 193- 238, 2011.

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th ed. ed. [s.l.] National Academy Press, 2001. v. 6, 381p.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows, **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 589-596, 1999.

OHLSSON, C. Growth, development, and composition of temperate forage legumes and grasses in varying environments, Ph.D. dissertation, Iowa State Univ., Ames (Diss. Abstr.) 1991.

OLIVIERI, A. C.; FABER, N. M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS, J. H.; MARK, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 633–661, 2006.

OSBORNE, B. G. Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry, applications, theory and instrumentation**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd., 2000. p. 1–14.

OZAKI, Y. Near-Infrared Spectroscopy — Its Versatility in Analytical Chemistry. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 545–563, 2012.

PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, J. A.; QUEIROZ, D. S.; SILVA, E. A. M. da. Correlações entre Componentes Anatômicos , Químicos e Digestibilidade *In Vitro* da

Chemical and Anatomical Traits , and *in Vitro* Dry Matter Digestibility Correlations in. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 955–963, 2001.

PAN, X.; KADLA, J. F.; EHARA, K.; GILKES, N.; SADDLER, J. N. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5806–5813, 2006.

PANDE, H.; ROY, D. N. Delignification kinetics of soda pulping of kenaf. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 16, n. 3, p. 311–325, 1996.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. In: **Lignocellulosic Materials**. 1989. p. 53–87.

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

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8–36, 2018.

PEREIRA, L. E. T.; POLIZEL, G. H. G. **Princípios e recomendações para o manejo de pastagens**. Pirassununga: PRCEU-pró-reitoria de cultura e extensão universitária, 2016.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PEZZOPANE, J. R. M.; BOSI, C.; NICODEMO, M. L. F.; SANTOS, P. M.; DA CRUZ, P. G.; PARMEJIANI, R. S. Microclimate and soil moisture in a silvopastoral system in southeastern Brazil. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 110–119, 2015.

PHILLIPS, M. The chemistry of lignin. **Chemical Reviews**, v. 14, n. 1, p. 103–170, 1934. PICA-CIAMARRA, U.; OTTE, J. The “Livestock Revolution”: Rhetoric and reality. **Outlook on Agriculture**, v. 40, n. 1, p. 7–19, 2011.

PIMENTEL, J. J. de O.; DE PAULA LANA, R.; GRAÇA, D. D. S.; DE MATOS, L. L.; TEIXEIRA, R. M. A. Teores de proteína bruta no concentrado e níveis de suplementação para vacas leiteiras em pastagens de capim-braquiária cv. Marandu no período da seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 418–425, 2011.

PIRES, F. F.; PRATES, Ê. R. Uso da Técnica da Espectrofotometria de Refletância no Infravermelho Proximal (NIRS) na Predição da Composição Química da Alfafa (*Medicago sativa*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. p, 1076-1081, 1998.

POMBO, G. V.; VALLE, T. D.; BRADI, R. A.; BUENO, I. C. S. Acurácia, precisão e robustez de indicadores internos para predição da digestibilidade aparente total de matéria seca em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 769–775, 2016.

PONNAMPALAM, E. N.; MANN, N. J.; SINCLAIR, A. J. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids , conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts : potential impact on human health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 21–29, 2005.

POTTS, J. R. M.; WEKLYCH, R.; CONN, E. E. The 4-Hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 16, p. 5019–5026, 1974.

PULS, J.; SCHMIDT, O.; GRANZOW, C. α -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 2, p. 83–88, 1987.

QUEIROZ, M. A. A.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMIDE, C. A.; BRAGA, M. R. Substitution of crude cell wall for neutral detergent fibre in the equations of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System that predict carbohydrate fractions : application to sunflower (*Helianthus annuus* L .). **Animal**, v. 2, n. 7, p. 1087–1092, 2008.

RABOTNIKOF, C. M.; PLANAS, G. M.; COLOMER, J. S.; STRITZLER, N. P. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for predicting forage quality of perennial warm-season grasses in La Pampa, Argentina. **Annales de Zootechnie**, v. 44, n. 1, p. 97–100, 1995.

RAFFRENATO, E.; FIEVISOHN, R.; COTANCH, K. W.; GRANT, R. J.; CHASE, L. E.; VAN AMBURGH, M. E. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on *in vitro* and *in vivo* neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 8119–8131, 2017.

RALPH, J.; HELM, R. F. Lignin/Hydroxycinnamic Acid/Polysaccharide Complexes: Synthetic Models for Regiochemical Characterization. In: USDA (Ed.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison,WI: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p. 201–246.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

RAO, I.; PETERS, M.; CASTRO, A.; SCHULTZE-KRAFT, R.; WHITE, D.; FISHER, M.; MILES, J.; LASCANO, C.; BLUMMEL, M.; BUNGENSTAB, D.; TAPASCO, J.; HYMAN, G.; BOLLIGER, A.; PAUL, B.; VAN DER HOEK, R.; MAASS, B.; TIEMANN, T.; CUCHILLO, M.; DOUXCHAMPS, S.; VILLANUEVA, C.; RINCÓN, Á.; AYARZA, M.; ROSENSTOCK, T.; SUBBARAO, G.; ARANGO, J.; CARDOSO, J.; WORTHINGTON, M.; CHIRINDA, N.; NOTENBAERT, A.; JENET, A.; SCHMIDT, A.; VIVAS, N.; LEFROY, R.; FAHRNEY, K.; GUIMARÃES, E.; TOHME, J.; COOK, S.; HERRERO, M.; CHACÓN, M.; SEARCHINGER, T.; RUDEL, T. LivestockPlus - The sustainable intensification of forage-based agricultural systems to improve livelihoods and ecosystem services in the tropics. **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, v. 3, n. 2, p. 59, 2015.

RAYMOND, W. F. The Nutritive Value Of Forage Crops. **Advances in Agronomy**, v. 21, p. 1–108, 1969.

REED, J. D.; MCDOWELL, R. T. E.; VAN SOEST, P. J.; HORVATH, P. R. J. Condensed tannins: A factor limiting the use of cassava forage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 3, p. 213–220, 1982.

REEVES, J. B. Lignin and Fiber Compositional Changes in Forages Over a Growing Season and Their Effects on *In Vitro* Digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 8, p. 1583–1594, 1987.

REEVES, J. B. Relationships between crude protein and determination of nondispersible lignin. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 4, p. 692–699, 1997.

REEVES, J. B.; BLOSSER, T. H.; COLENBRANDER, V. F. Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Analyzing Undried Silage. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 79–88, 1989.

REIS, R. B.; COMBS, D. K. Effects of Increasing Levels of Grain Supplementation on Rumen Environment and Lactation Performance of Dairy Cows Grazing Grass-Legume Pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2888–2898, 2000.

RESTAINO, E. a; FERNÁNDEZ, E. G.; LA MANNA, A.; COZZOLINO, D. Prediction of the Nutritive Value of Pasture Silage by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). **Chilean journal of agricultural research**, v. 69, n. December, p. 560–566, 2009.

RINNAN, Å.; BERG, F. van den; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, 2009.

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The Detergent System of Analysis, In: James, W. P. T.; THEANDER, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fiber in Food*, Marcel Dekker, New York, Cap. 9, p. 123-158, 1981.

RODRIGUES, P. H. M.; DA COSTA GOMES, R.; DE SIQUEIRA, R. F.; MEYER, P. M.; RODRIGUES, R. R. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com o uso de indicadores em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1118–1126, 2010.

ROGALSKI, A. Infrared detectors: Status and trends. **Progress in Quantum Electronics**, v. 27, n. 2–3, p. 59–210, 2003.

ROGERS, L. A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, v. 164, n. 1, p. 17–30, 2004.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 2008.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 2008

SABALLOS, A.; SATTLER, S. E.; SANCHEZ, E.; FOSTER, T. P.; XIN, Z.; KANG, C.; PEDERSEN, J. F.; VERMERRIS, W. Brown midrib2 (Bmr2) encodes the major 4-coumarate: Coenzyme A ligase involved in lignin biosynthesis in sorghum (*Sorghum*

bicolor (L.) Moench). **The Plant Journal**, v. 70, n. 5, p. 818–830, 2012.

SABALLOS, A.; VERMERRIS, W.; RIVERA, L.; EJETA, G. Allelic Association, Chemical Characterization and Saccharification Properties of brown midrib Mutants of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **BioEnergy Research**, v. 1, n. 3–4, p. 193–204, 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAKAGAMI, H.; IWAMOTO, S.; MATSUTA, T.; SATOH, K.; SHIMADA, C.; KANAMOTO, T.; TERAOKUBO, S.; NAKASHIMA, H.; MORITA, Y.; OHKUBO, A.; TSUDA, T.; SUNAGA, K.; KITAJIMA, M.; OIZUMI, H.; OIZUMI, T. Comparative study of biological activity of three commercial products of *Sasa senanensis* Rehder leaf extract. **In Vivo**, v. 26, n. 2, p. 259–264, 2012.

SALLEH, N. M.; ISMAIL, S.; IBRAHIM, M. N. M. Radical scavenging activity of lignin extracted from oil palm empty fruit bunch and its effect on glutathione-s-transferase enzymes activity. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 81–87, 2015.

SANTOS, P. M.; VINHOLIS, M. de M. B.; DIAS-FILHO, M. B.; VOLTOLINI, T. V.; MITTELMANN, A.; PEZZOPANE, J. R. M.; EVANGELISTA, S. R. M.; MOURA, M. S. B. de; GOMIDE, C. A. de M.; CAVALCANTE, A. C. R.; CORRÊA, C. G.; BETTIOL, G. M.; SANTOS, R. M.; ANGELOTTI, F.; OLIVEIRA, P. P. A.; SOUZA, F. H.; ALMEIDA, I. R. de; BOSI, C.; CRUZ, P. G. da; ANDRADE, A. S.; ARAUJO, L. C. de; PELLEGRINO, G. Q. **Produção animal no Brasil: caracterização, simulação de cenários para pastagens e alternativas de adaptação às mudanças climáticas**. 1^a ed. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2015.

SAVIOLI, N. M. de F.; FUKUSHIMA, R. S. Extração da Lignina com o Reagente Brometo de Acetila : Influência da Espécie Forrageira , Estádio de Maturidade e Parte da Planta. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1969–1981, 2000.

SAVIOLI, N. M. de F.; FUKUSHIMA, R. S.; LIMA, C. G. de; GOMIDE, C. A. Rendimento e comportamento espectrofotométrico da lignina extraída de preparações de parede celular, fibra em detergente neutro ou fibra em detergente ácido. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 988–996, 2000.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; LALLEMAND, J. Y.; GUITTET, E.; ROLANDO, C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1359–1362, 1985.

SECA, a M. L.; CAVALEIRO, J. a S.; DOMINGUES, F. M. J.; SILVESTRE, a J. D.; EVTUGUIN, D.; NETO, C. P. Structural characterization of the bark and core lignins from kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3100–3108, 1998.

- SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. [s.l.: s.n.]
- SHADIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.
- SHEAFFER, C. C.; PETERSON, P. R.; HALL, M. H.; STORDAHL, J. B. Drought effects on yield and quality of perennial grasses in the North Central States, **Journal of Production Agriculture**, v. 5, p. 556, 1992.
- SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O. The application of near infrared reflectance spectroscopy (nirs) to forage analysis. In: FAHEY JR, G. C. (Ed.). **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1994. p. 406–449.
- SHIMOJO, M.; GOTO, I. A study on the relation between disappearance of dry matter and acetyl bromide lignin of tropical grass. **Japan Journal of Zootechnical Science**, v. 55, n. 11, p. 838–842, 1984.
- SILVEIRA, F. Q. P.; XIMENES, F. A.; CACAIS, A. O. G.; MILAGRES, A. M. F.; MEDEIROS, C. L.; PULS, J.; FERREIRA FILHO, E. X. Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 8, p. 947–952, 1999.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ªEd. LTC Livros Técnicos e Científicos S.A., Rio de Janeiro, 2000.
- SIMEONE, M. L.; SOUZA, G. B.; GONTIJO NETO, M. M.; GUIMARÃES, C. C.; MEDEIROS, E.; BARROCAS, G. E. G.; PASQUINI, C. Use of NIR and PLS to Predict Chemical Composition of *Brachiaria*. In: 17th International Conference on Near Infrared Spectroscopy – Poster Presentation, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR: Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), 2015.
- SINCLAIR, K. D.; GARNSWORTHY, P. C.; MANN, G. E.; SINCLAIR, L. A. Reducing dietary protein in dairy cow diets: Implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. **Animal**, v. 8, n. 2, p. 262–274, 2014.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.
- SMITH, J.; SONES, K.; GRACE, D.; MACMILLAN, S.; TARAWALI, S.; HERRERO, M. Beyond milk, meat, and eggs: Role of livestock in food and nutrition security. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 1, p. 6–13, 2013.
- SMITH, L. W.; GOERING, H. K.; GORDON, C. H. Relationships of Forage Compositions With Rates of Cell Wall Digestion and Indigestibility of Cell Walls. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 8, p. 1140–1147, 1972.
- SOARES FILHO, C. V.; RODRIGUES, L. R. A.; PERRI, H. S. V. Produção e valor nutritivo de dez gramíneas forrageiras na região Noroeste do Estado de São Paulo. **Acta**

Scientiarum Maringá, v. 24, n. 5, p. 1377–1384, 2002.

SOMERVILLE, C. Cellulose Synthesis in Higher Plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 53–78, 2006.

SOUZA, D. M.; MADARI, B. E.; GUIMARÃES, F. F. Aplicação de técnicas multivariadas e inteligência artificial na análise de espectros de infravermelho para determinação de matéria orgânica em amostras de solos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1738–1745, 2012.

SOUZA, J. A. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; GRANGEIRO JR, S.; PIMENTEL, M. F.; DE SANTANA, D. P.; SIMÕES, S. S. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 35–41, 2012.

STAINES, M. V. H.; MORRIS, R. J.; BOLLAND, M. D. A.; MCDONNELL, R. P. Performance of five pasture-based dairy systems with increasing levels of nitrogen fertiliser and associated stocking rates. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 61, n. 1, p. 1–26, 2017.

STARK, E.; LUCHTER, K.; MARGOSHES, M. Near-Infrared Analysis (NIRA): A Technology for Quantitative and Qualitative Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 22, n. 4, p. 335–399, 1986.

STARR, C.; MORGAN, A. G.; SMITH, D. B. An evaluation of near infra-red reflectance analysis in some plant breeding programmes. **The Journal of Agricultural Science**, v. 97, n. 1, p. 107–118, 1981.

STEVENSON, T. T.; MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of Plant Cell Walls. **Plant Physiology**, v. 80, p. 1012–1019, 1986.

STREFFER, F. Lignocellulose to Biogas and other Products. **JSM Biotechnology & Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2014.

STUART, B. H., **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**, Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, Ltd., 2004.

SULLIVAN, J. T. Studies of the hemicelluloses of forage plants. **Journal of animal science**, v. 25, n. 1, p. 83–86, 1966.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L.-F.; TAKABE, K. Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall. In: **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p. 247–270.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. Quantitative Analysis of Cell Wall Components. In: **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p. 83–104.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Dietary Fiber. 3. Improved Procedures for Analysis of Dietary Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 330–

336, 1986.

THORSTENSSON, E. M. G.; BUXTON, D. R.; CHERNEY, J. H. Apparent inhibition to digestion by lignin in normal and brown midrib stems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, n. 2, p. 183–188, 1992.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A Two-stage Technique for the *in vitro* Digestion of Forage Crops. **Grass and Forage Science**, v. 18, n. 2, p. 104–111, jun. 1963. 2018.

TURNER, S. R.; SOMERVILLE, C. R. Collapsed Xylem Phenotype of Arabidopsis Identifies Mutants Deficient in Cellulose Deposition in the Secondary Cell Wall. **The Plant Cell**, v. 9, n. May, p. 689–701, 1997.

UNCTAD: United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), New York and Geneva. **State of Commodity Dependence**. 2014. 202p.

VAN SOEST, P. J., Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages, **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 119–128, 1967.

VAN SOEST, P. J., **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 2nd ed., Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY, 476p, 1994.

VAN SOEST, P. J. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds . II . A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. **Journal of the A.O.A.C.**, v. 46, n. 5, p. 829–835, 1963.

VAN SOEST, P. J.; MERTENS, D. R.; DEINUM B. Preharvest factors influencing quality of conserved forages. **Journal of Animal Science**, v. 47, p. 712-720, 1978.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds . IV . Determination of Plant Cell-Wall Constituents. **JOURNAL OF THE A.O.A.C.**, v. 50, n. 1, p. 50–55, 1967.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergent Fiber with Permanganate. **Journal of the A.O.A.C.**, v. 51, n. 4, p. 780–785, 1968.

VARGA, G. A.; KOLVER, E. S. Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. In: The Journal of Nutrition, 5, **Anais...**1997.

VIANA, L. C.; TRUGILHO, P. F.; HEIN, P. R. G.; SILVA, J. R. M. da; LIMA, J. T. Modelos de calibração e a espectroscopia no infravermelho próximo para a predição das propriedades químicas e da densidade básica da madeira de Eucalyptus. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 2, p. 367–376, 2010.

VOGEL, A. I. Análise Química Quantitativa, 5 ed., Editora: Guanabara Koogan S,A, Rio de Janeiro. 1992. p. 521-588.

VOGEL, K. P.; SLEPER, D. A. Alteration of plants via genetics and plant breeding. In: GEORGE C. FAHEY, J. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison, WI: ASA, CSSA, SSSA, 1994. p. 891–921.

WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I.; DEWITT, D. L. Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries. **Reactions**, v. 62, p. 294–296, 1999.

WANG, Y.; MCALLISTER, T. A.; LORA, J. H. Effects of purified lignin on *in vitro* rumen metabolism and growth performance of feedlot cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 3, p. 392–399, 2017.

WARD, A.; NIELSEN, A. L.; MØLLER, H. Rapid assessment of mineral concentration in meadow grasses by near infrared reflectance spectroscopy. **Sensors**, v. 11, n. 5, p. 4830–4839, 2011.

WEIMER, P. J. Microbial and Molecular Mechanisms of Cell Wall Degradation-Session Synopsis. In: **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p. 53711.

WILLIAMS, P. C. Application of near infrared reflectance spectroscopy to analysis of cereal grains and oilseeds. **Cereal Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 561-576, 1975.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. Near-infrared technology in the agricultural and food industries, 2^a ed, Saint Paul, MN: **American Association of Cereal Chemistry**, 2001. 296 p.

WILMAN, D.; ALTIMIMI, M. A. K. The Digestibility and Chemical Composition of Plant Parts in Italian and Perennial Ryegrass during Primary Growth. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 7, p. 595–602, 1982.

WILSON, J. R. Cell Wall Characteristics in Relation to Forage Digestion by Ruminants. **The Journal of Agricultural Science**, v. 122, n. 2, p. 173–182, 1994.

WILSON, J. R. Environmental and nutritional factors affecting herbage quality, In: Hacker, J.B, (Ed.), **Nutritional Limits to Animal Production from Pastures**, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, p. 111-131, 1982.

WILSON, J. R.; MINSON, D. J., Influence of temperature on digestibility of the tropical legume *Macroptilium atropurpureum*, **Grass Forage Science**, v. 38, n. 39, 1983.

WOLD, S. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37–52, 1987.

WOLD, S. Chemometrics and intelligent laboratory systems Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? **Chemometrics and Intelligent Laboratory**

Systems, v. 30, p. 109–115, 1995.

WOODMAN, H. E. The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism. **The Journal of Agricultural Science**, v. 17, n. 3, p. 333–338, 1927.

WOODMAN, H. E.; STEWART, J. The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism III. The action of cellulose-splitting bacteria on the fibre of certain typical feeding stuffs. **The Journal of Agricultural Science**, v. 22, n. 3, p. 527–547, 1932.

WORKMAN, J. J. Review of process and non-invasive near-infrared and infrared spectroscopy: 1993-1999. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 34, n. 1–2, p. 1–89, 1999.

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M.; BOTREL, M. de A.; VILELA, D. **Características e potencialidades de pastagens de braquiárias para produção de leite**. 1ª ed. Juiz de Fora, MG: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2002. 31p.

ZEDER, M. A.; HESSE, B. The Initial Domestication of Goats (*Capra hircus*) in the Zagros Mountains 10 , 000 Years Ago. **Science**, v. 287, n. March, p. 2254–2257, 2000.

APÊNDICE

Exemplos de calibrações que foram feitas (propriedade predita vs. propriedade original) e alguns aspectos de comprimentos de onda após pré tratamentos

a)

b)

Pretreated Spectra

c)

d)

e)

f)

g)

h)

i)

j)

Calibrações e comprimentos de onda: a) propriedade predita vs. propriedade original para matéria seca; b) propriedade predita vs. propriedade original para matéria mineral e espectro pré-tratado; c) propriedade predita vs. propriedade original para parede celular e espectro pré-tratado; d) propriedade predita vs. propriedade original para fibra em detergente neutro; e) propriedade predita vs. propriedade original para fibra em detergente ácido e espectro pré-tratado; f) propriedade predita vs. propriedade original para lignina em detergente ácido e espectro pré-tratado; g) propriedade predita vs. propriedade original para lignina em brometo de acetila a partir de parede celular e espectro pré-tratado; h) propriedade predita vs. propriedade original para lignina em brometo de acetila a partir de fibra em detergente neutro e espectro pré-tratado; i) propriedade predita vs. propriedade original para digestibilidade *in vitro* da matéria seca e espectro pré-tratado e j) propriedade predita vs. propriedade original para digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.