

Aplicação da Espectroscopia de NIR para avaliação da homogeneidade em item de ensaio de proficiência

Gilberto Batista de Souza¹, Ana Rita de Araujo Nogueira¹, Mariana Dias²

¹ Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP; ² Buchi Latim America – Valinhos - SP

E-mail: gilberto.souza@embrapa.br

Resumo: Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) foi empregada para a avaliação da homogeneidade, item de ensaio de proficiência, de uma amostra de alfafa (*Medicago sativa* cv. Crioula). No estudo, espectro de NIR foi avaliado qualitativamente com o emprego de análise de componentes principais. Os resultados foram comparados aos obtidos com métodos químicos com o emprego da ANOVA de fator único e da ISO 13528:2005. Para ambos os procedimentos ficou evidenciado que a amostra de alfafa apresenta homogeneidade suficiente para ser utilizada em ensaio de proficiência.

Palavras-chave: ensaio de proficiência, homogeneidade, espectroscopia de infravermelho próximo, análise de componentes principais.

Abstract: Near infrared spectroscopy (NIRS) was used to evaluate the homogeneity, proficiency testing item, of a sample of alfalfa (*Medicago sativa* cv. Crioula). In the study, the NIR spectrum was qualitatively evaluated with the use of principal component analysis. The results were compared to those obtained with chemical methods with the single-factor ANOVA and ISO 13528:2005. For both procedures was evident that the alfalfa sample has sufficient homogeneity for use in proficiency testing.

Keywords: proficiency testing, homogeneity, near-infrared spectroscopy, principal component analysis

1. INTRODUÇÃO

Conforme citado na ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 que trata dos requisitos gerais para ensaios de proficiência, a avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio é um dos pré-requisitos técnicos atribuídos ao provedor de um ensaio de proficiência (EP) (item 4.4.3) [1]. Os provedores de EP geralmente utilizam amostras de certa forma semelhante aos materiais ensaiados na rotina dos laboratórios participantes. Esses materiais podem, entre outros, incluir alimentos,

água, solos e materiais ambientais. A maioria dos itens de ensaio, mesmo após a sua preparação, possui algum grau de heterogeneidade. Entretanto, é fundamental apresentarem homogeneidade aceitável, para que sua heterogeneidade não se torne mais uma variável na avaliação dos resultados. Para a avaliação da homogeneidade, o provedor do EP deve analisar um número representativo de frascos ou de unidades de itens de ensaio, escolhidos de forma aleatória, sistemática ou estratificada [2]. Os ensaios devem ser realizados em condições de repetibilidade, ou

seja, mesmo laboratório, mesmo analista e todas as amostras testadas no mesmo dia, sendo todos os procedimentos documentados e estatisticamente aceitáveis [2].

Para alguns tipos de itens de ensaio, a avaliação da homogeneidade requer a determinação de elementos que empregam procedimentos com muitas etapas analíticas, sendo morosos e de custo elevado. Como exemplo, a avaliação da homogeneidade em amostras de alimentos para animais (forrageiras e ingredientes de origem vegetal para ração), que emprega análises químicas para quantificar os teores de proteína, lipídios e fibras, dentre outras propriedades.

Por ser uma técnica não destrutiva e potencialmente precisa e rápida, é crescente o uso da espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) como alternativa aos métodos convencionais (métodos químicos) para a avaliação qualitativa e quantitativa dos alimentos para animais [3]. Assim, no presente trabalho foi proposto o emprego da técnica NIRS associada à quimiometria para avaliar a homogeneidade de uma amostra da leguminosa alfafa (*Medicago sativa* cv. Crioula), item de ensaio do “Ensaio de Proficiência para Laboratórios de Nutrição Animal” (EPLNA) organizado pela Embrapa Pecuária Sudeste.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram preparados 6 kg de material seco a 65°C e moído em moinho de facas em aço inoxidável de bancadas (moinho tipo Wiley), com peneiras de 1 mm de abertura (16 mesh). A seguir a amostra foi homogeneizada em homogeneizador de bancada em “Y” e envasada em frascos de polipropileno com tampa de pressão e lacre, sendo produzido um total de 120 unidades contendo 50 g de amostra. Para os testes de homogeneidade 10 frascos foram aleatoriamente selecionados. Inicialmente foram obtidos espectros NIR e em seguida realizados

ensaios químicos de proteína bruta (PB), fibra bruta (FB) e cinzas.

Os espectros NIR foram obtidos no modo de reflectância difusa, por meio do software Operator 1.2 (Buchi, Flawil, Suíça), abrangendo a região espectral de 10.000 a 4.000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans por amostra. Foram realizadas três repetições para cada frasco. Para a avaliação qualitativa da homogeneidade e interpretação dos dados utilizou-se a análise multivariada de componentes principais (PCA) executadas no software Pirouette® 4.0. Utilizou-se como pré-tratamento normalização dos espectros NIR.

Os ensaios químicos de PB, FB e cinzas foram realizados com duas repetições, em condições de repetibilidade e de acordo com os procedimentos operacionais padrão do laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Proteína bruta foi determinada pelo método Kjeldhal, fibra bruta pelo método Ankom e cinzas por calcinação a 550 °C [4]. A homogeneidade foi avaliada por meio do teste F utilizando análises de variância de fator único (ANOVA), sem excluir valores dispersos e considerado o valor tabelado de $F_{0,05;9;10} = 3,02$. Para obter os valores dos desvios padrão dentro dos frascos ou desvios padrão analítico (s_w), os valores dos desvios padrão entre os frascos (s_s) e o grau de heterogeneidade (H), foram utilizadas as equações descritas no anexo B da ISO 13528:2005 [5]. O desvio padrão obtido pela equação de Horwitz (σ) multiplicado por 0,3 foi considerado como valor crítico para estabelecer se a amostra apresentava homogeneidade suficiente para os ensaios avaliados [6].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os valores das componentes da ANOVA de fator único, média quadrada entre frascos (QM_{entre}), média quadrada dentro do frasco (QM_{dentro}), os valores de F

calculados ($F_c = QM_{\text{entre}}/QM_{\text{dentro}}$) e os valores das probabilidades de o material ser homogêneo – *valor-p* (hipótese nula). Como é possível observar, não houve diferença estatística significativa, uma vez que os valores de F_c para os três tipos de ensaio avaliados foram inferiores ao valor de F tabelado. Dessa forma, considera-se a hipótese nula como verdadeira, ou seja, no nível de confiança de 95% o material apresentou homogeneidade suficiente para o ensaio de proficiência.

Tabela 1. Valores das componentes da ANOVA para os ensaios de PB, fibras e cinzas.

Ensaio	QM _{entre}	QM _{dentro}	F _c	valor-P
PB	0,1534	0,1385	1,108	0,4346
FB	0,6179	0,5662	1,091	0,4434
Cinzas	0,0824	0,1192	0,692	0,7046

QM_{entre} = média quadrada entre frascos; QM_{dentro} = média quadrada dentro do frasco; *valor-P* = probabilidade de significância.

Entretanto aplicando-se o critério previsto na ISO 13528:2005, conforme apresentado na tabela 2, para PB o valor do desvio padrão entre frascos (s_w) foi inferior ao valor $0,3x\sigma$ indicando grau de heterogeneidade não significativa.

Para os ensaios FB e cinzas os valores dos desvios padrão entre frascos foram maiores do que $0,3x\sigma$, indicando grau de heterogeneidade significativa. Dessa forma, conforme previsto na norma ISO 13528:2005, os valores de s_s para os ensaios de FB e cinzas deverão ser incluídos ao desvio padrão alvo para o ensaio de proficiência.

$$H = \frac{s_s \times 100}{x} \quad (1)$$

Com relação ao grau de heterogeneidade (H), este foi calculado pela equação 1. Para os ensaios de PB, FB e cinzas os valores podem ser considerados satisfatórios, pois são inferiores aos obtidos por meio do desvio padrão de Horwitz, respectivamente 2,27%, 1,96% e 3,44%.

Tabela 2. Resultados parâmetro obtidos no teste de homogeneidade.

Ensaio	X	s _w	s _s	σ	0,3 x σ	H
	g/100g					%
PB	19,37	0,372	0,086	0,440	0,132	0,45
FB	25,94	0,752	0,161	0,509	0,153	0,62
Cinzas	8,45	0,345	0,136	0,291	0,087	1,60

X = média; s_w = desvios padrão analítico; s_s = desvios padrão entre os frascos; σ = desvio padrão de Horwitz; H = grau de heterogeneidade.

Considerando a avaliação qualitativa da homogeneidade por meio dos espectros NIR dos mesmos itens de ensaio utilizados para os ensaios laboratoriais, foi realizada análise de PCA com os dados de refletância.

A primeira componente principal (Fator 1-PC1) respondeu por 68,6% da variância e a segunda componente principal (Fator 2-PC2) respondeu por 26,3% da variância. Dessa forma, a PCA foi realizada considerando as duas primeiras componentes principais, uma vez que responderam por 94,9% da variância, ou seja, informação total do modelo.

Uma vez que a PCA possibilita o agrupamento das amostras considerando a similaridade da composição química determinada nos espectros NIR, é possível observar na figura 1 que houve boa correlação entre as amostras (frascos) e as suas repetições analíticas, num intervalo de 95% de confiança (o intervalo delimitado pelo círculo no gráfico da PCA).

Para a verificação de *outliers* foi utilizado o método da distância de Mahalanobis e, conforme pode ser observado na figura 2, não foi detectado nenhum item de ensaio como *outlier*.

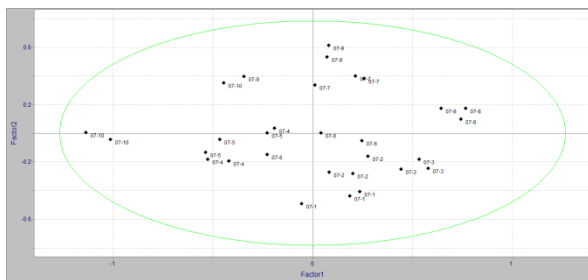


Figura 1. Análise de PCA para a amostra de *Medicago sativa* cv. Crioula.

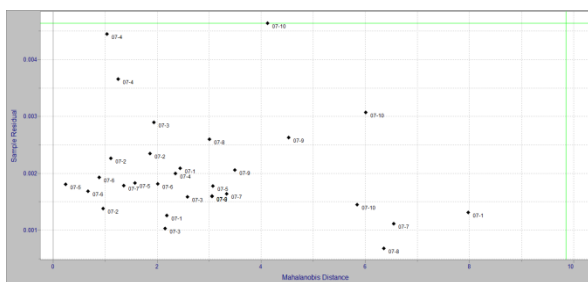


Figura 2. Gráfico para detecção de *outliers*.

4. CONCLUSÃO

Por meio da aplicação da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS), foi possível avaliar de forma qualitativa a homogeneidade da amostra de alfafa (*Medicago sativa* cv. Crioula), item de ensaio de proficiência, sendo os resultados comparáveis ao método convencional pela análise de variância de fator único e ISO 13528:2005. Dessa forma, a técnica NIRS pode ser utilizada para avaliar de forma qualitativa a homogeneidade de itens de ensaio de

proficiência, fornecendo resultados rápidos e evitando o emprego de reagentes tóxicos.

6. REFERÊNCIAS

[1] ABNT NBR ISO/IEC 17043. Avaliação da conformidade – Requisitos gerais para ensaios de proficiência. ABNT, p. 46, 2011.

[2] ABNT ISO GUIA 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. ABNT, p.25, 2004.

[3] FAO 2012. Conducting national feed assessments, by Michael B. Coughenour & Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Manual No. 15. Rome, Italy. P.212.

[4] NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. p. 334.

[5] ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.

[6] THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem.*, **78**, n.1, p.145–196, 2006.

AGRADECIMENTOS

INCTAA, CNPq.