



**Ana Patrícia da Silva
Marques**

**Espectroscopia de Infravermelho Próximo em
alimentos Pet Food- Validação**



**Ana Patrícia da Silva
Marques**

**Espectroscopia de Infravermelho Próximo em
alimentos Pet Food- Validação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica- Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química e coorientação da Doutora Elisabete Coelho, Bolseira de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro e da Mestre Susana Cláudia Santos, Diretora do Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Ovargado S.A.

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.”

Charles Darwin

o júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar com Agregação da Universidade de Aveiro

Orientador

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Carla Alexandra Pina da Cruz Nunes
Professora Auxiliar Convidada da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores da Universidade de Aveiro, Doutora Elisabete Coelho e Professor Doutor Manuel António Coimbra, pelo apoio transmitido e por me terem orientado nesta etapa.

Agradeço à minha orientadora da Ovargado, Mestre Susana Santos, ao Sr. Filipe Pode e à Dra. Lúgia Coelho pela oportunidade de poder estagiar na empresa, pelo conhecimento adquirido e pela oportunidade de poder visitar a Trouw Nutricion.

Agradeço ao Javier Romero e ao Carlos Fidalgo por me terem recebido tão bem na Trouw Nutricion e por me terem ajudado no meu trabalho.

Agradeço à Silliker por me fornecer a informação solicitada.

Ao Sr. Marinheiro um muito obrigado pelas horas de ensinamento e aconselhamento.

À Dr^a Rosário, ao Mestre João Ferreira, ao Mestre Renato Guimarães e a todos os colaboradores da Ovargado S.A. por me terem recebido bem e acompanhado no meu percurso na empresa.

Aos meus gatos e aos meus cães que me deram conforto e apoio à maneira deles.

Às minhas companheiras de Aveiro Íris Oliveira e Mariana Santoalha pelo companheirismo ao longo destes dois anos.

À minha amiga Ana Esteves pela sua amizade e lanches de engorda.

Agradeço ao meu namorado Rui Costa pelo seu apoio e dedicação nas horas mais difíceis e pelo Amor que me tem dado.

À minha avó que também teve um importante papel ao longo da minha vida.

E agradeço do fundo do meu coração aos meus pais Anabela da Silva Monteiro e Manuel Jorge Dias Marques pelo apoio e paciência. Sem eles eu nunca teria conseguido chegar onde cheguei, nem teria conseguido os meus objetivos. Muito obrigada pela vossa dedicação e Amor.

palavras-chave

Espectroscopia de Infravermelho Próximo; Validação; Pet Food; Composição Química.

resumo

As indústrias de alimentação animal necessitam diariamente de controlar a composição química dos alimentos produzidos. Precisam de formular alimentos nutricionalmente equilibrados com um custo de produção reduzido respeitando os limites legislativos impostos quanto às variações dos teores declarados nos rótulos dos produtos comercializados. A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) é uma técnica de análise rápida e precisa conseguindo determinar vários parâmetros químicos simultaneamente. Estas vantagens levaram a que seja utilizada como técnica de controlo rápido nas indústrias de alimentação animal. No entanto para que esta técnica determine de forma exata os parâmetros químicos pretendidos são exigidos modelos de calibração robustos. O objetivo deste trabalho, realizado em ambiente empresarial na empresa Ovargado S.A, teve como finalidade validar os modelos de calibração na determinação dos parâmetros químicos, tais como: Proteína Bruta, Gordura Bruta, Fibra Bruta e Cinza Bruta em alimentos Pet Food. Foram discutidos os valores fornecidos referentes às calibrações desenvolvidas e às validações cruzadas sendo realizadas comparações entre determinações efetuadas pelo NIR com análises determinadas laboratorialmente. Os dados recolhidos em ambos os casos correspondem aos anos de 2015, 2016 e 2017. Os valores apresentados referentes à validação cruzada demonstram que a determinação da composição química dos alimentos Pet Food pode ser determinada com exatidão. Foram obtidos valores de R^2 de 0,98; 0,92; 0,75 e 0,89 para a proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta respetivamente. A comparação realizada entre as análises do NIR com as análises externas demonstraram valores de R^2 de 0,97; 0,81; 0,16 e 0,80 para a proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta respetivamente. A fibra bruta foi o único parâmetro que em 2017 continuou a apresentar diferenças significativas. A existência de dispersão entre as análises de NIR e as análises externas e a diferença associada à determinação da fibra bruta, leva à necessidade de um maior controlo deste parâmetro, de modo a respeitar os limites impostos pela legislação quanto à rotulagem.

Tendo em consideração todos os resultados, a técnica NIR demonstrou ser capaz de determinar de forma exata a composição dos alimentos Pet Food produzidos pela Ovargado.

keywords

Near Infrared Spectroscopy; Validation; Pet Food; Chemical composition.

Abstract

Animal feed industry needs to control the chemical composition of the feed produced. There is a need to formulate nutritionally balanced foods at a low cost of production while respecting the legislative limits imposed on the labeling of marketed products. The Near Infrared Spectroscopy (NIR) is a rapid and accurate analysis technique that can determine several chemical parameters simultaneously. These advantages led to its use as a rapid control technique in the animal feed industries. However, to determine exactly the chemical parameters, a robust calibration model is required. This study aims to validate calibration models in the determination of the chemical parameters such as crude protein, crude fiber, crude fat and crude ash in Pet Food. Calibration and cross-validation values were discussed and comparisons were made between determinations performed by NIR with laboratory determined analyzes. The data collected in both cases corresponds to years 2015, 2016 and 2017. The values presented for cross-validation demonstrate that the determination of the chemical composition of Pet Food can be determined accurately. R^2 values of 0.98; 0.92; 0.75 and 0.89 were obtained for crude protein, crude fat, crude fiber and crude ash, respectively. The comparison between NIR and external analyses showed R^2 values of 0.97; 0.81; 0.16 and 0.80 for crude protein, crude fat, crude fiber and crude ash respectively, and non-significant differences for all parameters except for crude fiber. The existence of the dispersion between NIR and external analyzes and differences associated with the determination of crude fiber leads to the need for a larger control of the parameters, in order to respects the limits imposed by legislation. Taking into account all the results, it can be concluded that the NIR technique is able to determine in an accurate way the composition of Pet Food products produced by Ovargado.

Índice

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Local de Estágio- Ovargado	2
1.2. Alimentação animal.....	4
1.2.1. Composição química dos alimentos	4
1.2.2. Necessidades Nutricionais	7
1.2.2.1. Proteína	7
1.2.2.2. Gordura	8
1.2.2.3. Hidratos de Carbono	8
1.3. Matérias-Primas	10
1.4. Requisitos Legislativos.....	13
1.5. Espectroscopia de Infravermelho.....	15
1.5.1. História	15
1.5.2. Importância na Indústria	16
1.5.3. Princípios Teóricos	16
1.5.3.1. Zonas de Absorção Características	19
1.5.3.2. Fatores que afetam os espectros	20
1.6. Construção e Validação de Modelos de Calibração.....	21
1.6.1. Seleção de Amostras.....	22
1.6.2. Pré-tratamento	23
1.6.3. Modelagem estatística Multivariada – Calibração.....	23
1.6.4. Validação	25
1.7. Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho Próximo em Alimentos Compostos para Animais	27
1.7.1. Alimentos Compostos para vários tipos de Animais	27
1.7.2. Alimentos Compostos Pet Food	32
1.8. Objetivos.....	36
2. Materiais e Métodos	36
2.1. Delineamento Experimental.....	36
2.2. Material e Recolha de resultados.....	37
3. Resultados e Discussão.....	42

3.1.	Valores de Calibração e Validação da Reta Pet Food.....	42
3.2.	Intervalo de Valores de maior previsão das retas de calibração.....	48
3.3.	Avaliação dos parâmetros nutricionais através de análises externas	52
3.3.1.	Comparação dos valores obtidos por NIR com análises externas	53
3.4.	Considerações sobre a determinação da Fibra Bruta	71
4.	Considerações Finais	74
5.	Trabalho Futuro	75
6.	Referências Bibliográficas.....	76
7.	Anexos.....	83

Índice de Figuras

Figura 1 Unidades de fabricação da Ovargado S.A. Fonte: https://pt.linkedin.com/company/ovargado-s-a-	2
Figura 2 Transições vibracionais- overtones. (Adaptado de Prasad <i>et al.</i> , 2011).....	18
Figura 3 Espectros NIR não tratados de água medidos, com uma variação de temperatura de 6 a 80 ° C. (Adaptado de Segtnan <i>et al.</i> , 2001).....	21
Figura 4 Célula Retangular de análise de alimentos granulados. (Adaptado de Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004).....	28
Figura 5 Célula Retangular de análise 1/4.(Adaptado de Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004).....	28
Figura 6 Célula de análise redonda. (Adaptado de Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004).....	28
Figura 7 NirSystems 5000 e célula de análise retangular utilizados para análise de alimentos Pet Food.	39
Figura 8 Espectros de absorção de alimentos PetFood e zonas características.	41
Figura 9 Valores do coeficiente de correlação múltipla e do coeficiente de determinação, utilizados para avaliar a calibração e a validação cruzada.	43
Figura 10 Valores do erro padrão de calibração e do erro padrão da validação cruzada obtidos para as retas de calibração e para as validações cruzadas dos parâmetros em estudo.	45
Figura 11 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a proteína bruta.	49
Figura 12 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a gordura bruta.	50
Figura 13 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a fibra bruta.....	51
Figura 14 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a cinza bruta.....	51
Figura 15 Resultado fora dos limites estipulados.	52
Figura 16 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a proteína bruta em 2015.	54
Figura 17 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a proteína bruta em 2016.	55
Figura 18 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a proteína bruta em 2017.	56

Figura 19 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a gordura bruta em 2015.	57
Figura 20 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a gordura bruta em 2016.	58
Figura 21 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a gordura bruta em 2017.	59
Figura 22 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a fibra bruta em 2015.	60
Figura 23 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a fibra bruta em 2016.	60
Figura 24 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a fibra bruta em 2017.	61
Figura 25 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a cinza bruta em 2015.	62
Figura 26 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a cinza bruta em 2016.	63
Figura 27 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a cinza bruta em 2017.	64
Figura 28 Diferenças entre os dois métodos de análise, dos parâmetros em estudo ao longo dos três anos.	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 Frações do Sistema de Análise Proximal. (Adpatado de Ensminger <i>et al.</i> ; AOAC)	5
Tabela 2 Composição química média de matérias-primas (composição em %). (Adaptado de FEDNA 2016)	11
Tabela 3 Limites legislativos quanto ao valor declarado no rótulo. (Adaptado do Regulamento (CE) n°939/2010)	14
Tabela 4 Algumas zonas de absorção características. (Adaptado de Alomar <i>et al.</i> , 2006; Workman 2006)	19
Tabela 5 Resultados de validação obtidos para a determinação de vários parâmetros químicos em alimentos para coelhos e vários tipos de alimentos para animais.	30
Tabela 6 Resultados de validação obtidos para a determinação de vários parâmetros químicos em alimentos moídos e não moídos para vários tipos de alimentos para animais.	31
Tabela 7 Resultados de validação obtidos para a determinação de vários parâmetros químicos em alimentos para cães.	35
Tabela 8 Proporções de diferentes matérias-primas utilizados na produção dos diferentes alimentos (% em relação à constituição total).	38
Tabela 9 Caraterização química de vários alimentos Pet Food. (% Declaradas no rótulo).	39
Tabela 10 Zonas características observadas no espectro de absorção dos alimentos Pet Food. (Adaptado de Alomar <i>et al.</i> , 2006; Workman 2006)	41
Tabela 11 Informação do intervalo de valores que a técnica NIR consegue prever com exatidão. ...	48
Tabela 12 Percentagens de incerteza dos métodos utilizados para a determinação dos parâmetros químicos pelo laboratório externo.	53
Tabela 13 Composição relativa (%) das fibras insolúveis presentes no Trigo e no Milho. (Adaptado de Nyman <i>et al.</i> , 1984).....	72
Tabela 14 Comparação percentagem de fibra bruta com a fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido em Milho Nacional e Sêmea de Trigo. (Adaptado de FEDNA.)	73
Tabela 15 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Manutenção.	83
Tabela 16 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Manutenção Mix.	83
Tabela 17 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Cachorros.	84

Tabela 18 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Alta Energia.	84
Tabela 19 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Alta Energia Extra.	85
Tabela 20 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Gatos.	85
Tabela 21 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Manutenção.	86
Tabela 22 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Cachorros.	87
Tabela 23 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Alta Energia.	87
Tabela 24 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Alta Energia Extra.	88
Tabela 25 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Gatos.	88
Tabela 26 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Manutenção.	89
Tabela 27 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Manutenção Mix.	89
Tabela 28 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Cachorros.	90
Tabela 29 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Alta Energia.	90
Tabela 30 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Alta Energia Extra.	90
Tabela 31 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Gatos.	91

Lista de Abreviaturas

AACC- American Association for Cereal Chemistry

ADL- Lenhina em Detergente Ácido

AOAC- Association of Official Analytical Chemists

Bias- Diferença média valores referência e valores previstos pelo NIR

DT- De-trending

EN- Norma Europeia

FB- Fibra Bruta

FDA- Fibra em Detergente Ácido

FDN- Fibra em Detergente Neutro

FEDNA- Fundação Espanhola para Desenvolvimento da Nutrição Animal

FIR- Espectroscopia de Infravermelho Distante

GB- Gordura Bruta

H- Distância de Mahalanobis

IACA- Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais

ISO- International Organization for Standardization

MIR- Espectroscopia de Infravermelho Médio

MLR- Regressão Linear Múltipla

MPLS- Regressão por Mínimos Quadrados Parciais Modificada

MSC- Correção da Dispersão Multiplicativa

NIR - Near Infrared Spectroscopy

NP – Norma Portuguesa

PB- Proteína Bruta

PCA- Análise por Componentes Principais

PCR- Regressão de Componentes Principais

PLS- Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

R²- Coeficiente de Determinação

RAP- Capacidade Relativa de Previsão

RMSECV- Erro Padrão Médio de Previsão da Validação Cruzada

RMSEP- Erro Padrão Médio de Previsão

RPD- Desvio Residual de Previsão

RSQ- Coeficiente de Correlação Múltipla

SD- Desvio Padrão

SD/SECV- Proporção entre o Desvio Padrão e o Erro Padrão Calibração Cruzada

SECV- Erro Padrão Calibração Cruzada

SEP- Erro Padrão de Previsão

SNV- Variação Padrão Normal

1. Introdução

A avaliação adequada da composição química dos alimentos compostos produzidos para animais tem sido um assunto que tem vindo a ser desenvolvido e melhorado pelas indústrias, dado à existência de especificidades a ter em conta na determinação dos seguintes parâmetros: proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), gordura bruta (GB) e cinza bruta (CB). A importância da determinação destes parâmetros diz respeito à existência de limites legislativos estabelecidos pelo Regulamento (CE) nº767/2009 com aferição do regulamento (CE) nº 939/2010 e à necessidade de formular alimentos capazes de suprimir as necessidades nutricionais dos animais. Para isso é necessário ter em conta o custo envolvido em toda a produção, fator que depende muitas vezes das matérias-primas disponíveis e da sua composição nutricional. (Williams e Starkey 1980; FEDNA 2016a; Givens *et al.*, 1997)

Apesar de existirem métodos de laboratório capazes de avaliar a composição química dos alimentos, existe uma dificuldade em adequar o grau de controlo dos alimentos devido ao número de parâmetros a analisar, o custo, a mão-de-obra e o tempo necessário para realizar cada determinação. (Alomar *et al.*, 2006) A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), surge como uma técnica de apoio a este tipo de indústrias, visto que consegue determinar de forma rápida e simultânea os parâmetros pretendidos. Contudo há a necessidade do desenvolvimento de calibrações robustas, uma vez que as matérias-primas e os alimentos apresentam estruturas moleculares complexas, devido ao uso de uma grande variedade de matérias-primas e subprodutos, que muitas vezes têm influência na consistência dos resultados NIR. (Boever *et al.*, 1995)

No âmbito do estágio na empresa Ovargado, o objetivo deste trabalho foi avaliar a validação da técnica de análise NIR, na determinação de diversos parâmetros como: proteína bruta, fibra bruta, gordura bruta e cinza bruta em alimentos para cães e gatos (Pet Food), para deste modo verificar a robustez da técnica na determinação desses parâmetros.

1.1. Local de Estágio- Ovargado

O estágio curricular relativo ao Mestrado em Bioquímica Alimentar da Universidade de Aveiro, foi realizado na empresa Ovargado, S.A. Uma empresa do sector agroalimentar que desenvolve as suas atividades na região de Ovar.

A Ovargado S.A. conta com mais de 30 anos de experiência. Devido às formulações equilibradas dos diferentes alimentos produzidos, assegura uma alimentação saudável e equilibrada aos diferentes tipos de animais (bovinos, suínos, ovinos, frangos, galinhas, coelhos, pássaros, cães e gatos)

Esta empresa é hoje a única empresa portuguesa que possui a capacidade de fabrico de alimentos farinados, granulados, extrudados e multi-particulados para todas as espécies zootécnicas terrestres.

É constituída por duas unidades de fabrico, como podemos observar na Figura 1. A primeira unidade de fabrico (imagem da esquerda) é responsável pelo fabrico de alimentos compostos e mistura de cereais para animais aptos ao consumo humano (aves, bovinos, ovinos, coelhos, suínos) e a segunda unidade de fabrico (imagem da direita) é responsável pelo fabrico de alimentos compostos para animais de companhia (cães, gatos e pássaros).



Figura 1 Unidades de fabricação da Ovargado S.A. Fonte: <https://pt.linkedin.com/company/ovargado-s-a->

Diariamente a Ovargado S.A. receciona nas suas instalações centenas de toneladas de diferentes matérias-primas, utilizadas para a formulação de diferentes alimentos. Assim há a necessidade de um elevado controlo da composição química de cada matéria-prima rececionada e de cada alimento produzido. Para tal

a empresa utiliza como método rápido de análise, a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), que realiza o acompanhamento no controlo da composição química, desde a receção da matéria-prima até à produção final do alimento.

O controlo da composição química das matérias-primas é realizado logo após a receção. Deste modo é possível, através da análise rápida do NIR, obter de forma quase instantânea os resultados dos parâmetros pretendidos para as diferentes matérias-primas, para que a incorporação destas assegure o resultado expectável e se comprove as especificações, podendo neste ponto levar a um ajuste de preço ou rejeição da amostra.

A produção dos alimentos compostos tem como base um processo produtivo otimizado e automático sujeito a erros de operador e de operação, obrigando a controlos que confirmem as especificações do alimento produzido quer para controlo interno, quer para o cumprimento legislativo.

Além do controlo efetuado através da técnica NIR a Ovargado S.A. possui um plano de análises externas, que visam confirmar os resultados obtidos pela tecnologia NIR e também a verificação do cumprimento dos limites legislativos.

1.2. Alimentação animal

O sector dos alimentos compostos para animais é considerado um dos sectores mais importantes das indústrias agroalimentares, uma vez que representa o principal fator de custo das produções pecuárias, tendo conseqüentemente reflexos diretos nos preços dos produtos alimentares essenciais para alimentar os portugueses (carne, peixe, ovos e leite). Este sector é ainda indispensável na alimentação de um elevado número de animais de companhia e outros destinados a atividades lúdicas de lazer. (IACA 2010)

O crescimento da indústria de alimentação de animais de companhia (Pet Food) tem-se refletido tanto em Portugal como no resto do Mundo, pois cada vez mais os animais têm sido criados como membros da família levando a que exista um aumento da preocupação pelo seu bem-estar, o que conseqüentemente leva a um crescimento da oferta e da procura de produtos de melhor qualidade de modo a proporcionar uma melhor qualidade de vida. (AEP 2012)

Os alimentos Pet Food são formulados tendo em consideração os diferentes estágios de vida dos animais de companhia (filhotes, animais em fase de crescimento e animais em fase de manutenção), sendo que cada etapa apresenta necessidades nutricionais diferentes. (Thompson 2011)

Deste modo a determinação da composição nutricional (composição química) é um parâmetro essencial na verificação correta da formulação adequada dos alimentos. (Martin Jr *et al.*, 1983)

1.2.1. Composição química dos alimentos

A informação sobre a composição química dos alimentos baseia-se num sistema analítico, denominado Sistema de Análise Proximal ou Sistema de Análise de Weende. (McDonald *et al.*, 2010)

O Sistema de Análise Proximal, fraciona os constituintes alimentares em seis frações, como se pode visualizar na tabela 1. (Ensminger *et al.*, 1993) Na tabela são ainda visíveis o resumo do procedimento de determinação assim como os métodos oficiais usados.

Tabela 1 Frações do Sistema de Análise Proximal. (Adaptado de Ensminger et al.,; AOAC)

Frações	Componentes maioritários	Procedimento de Determinação	Método Oficial (Aprovado por AOAC e/ou AOCS)
Humidade (matéria seca por diferença)	Água e quaisquer compostos voláteis (100% - H ₂ O = % matéria seca)	A amostra é colocada a uma temperatura acima do ponto de ebulição da água até peso constante. A perda de peso é igual à quantidade de água.	Método AOAC 930.15 (gravimétrico)
Cinza (matéria mineral)	Elementos Minerais	A amostra é queimada, quando submetida a temperaturas de 500° a 600° C, por 2h.	Método AOAC 942.05 (gravimétrico)
Proteína Bruta (proteína média 16% N; em que N× 6,25 = proteína bruta)	Proteínas, aminoácidos e azoto não proteico	Determinação do azoto pelo método de Kjeldahl, pela digestão com ácido sulfúrico.	Método AOAC 992.15 (combustão)
Extrato Etéreo (gordura)	Gorduras, óleos, ceras, vitaminas solúveis em gordura e matéria corante.	Extração com éter de petróleo, éter etílico ou <i>n</i> -hexano.	Método AOAC 954.02 (gravimétrico)
Fibra Bruta	Celulose, hemicelulose e lenhina.	Porção orgânica do resíduo após desengorduramento e digestão com o uso de uma solução ácida e alcalina.	Método AOCS-AOAC 962.09 (gravimétrico)
Hidratos de Carbono (também conhecidos como extrato isento de azoto)	Amido, açúcares, alguma celulose, hemiceluloses, pectinas e lenhina.	Restante, ou seja, 100 menos a soma das outras frações.	Determinação Amido: Método AOAC 2014.10 (enzimático colorimétrico)

A informação da fibra bruta do ponto de vista nutricional tem sido contestada. Uma vez que, a determinação desta pode não representar a estimativa real da parte insolúvel do alimento, dado que a sua determinação através de digestão ácida e alcalina causam um ataque parcial da celulose, levando a que a sua extração não seja total, e proporciona a remoção parcial da lenhina. (Dougall 1956) Em média são removidas 80% de hemicelulose e 50 a 90% de lenhina pela extração sequencial ácida e alcalina e há uma recuperação de 50 a 80% de celulose. (Möller 2014)

O trabalho desenvolvido por Peter Van Soest na década 1960, proporcionou uma abordagem diferente para o fracionamento da matéria orgânica, mais precisamente na FB. Este propôs dividir a FB em fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lenhina em detergente ácido (ADL). (Van Soest *et al.*, 1991) A FDA é o resíduo após refluxo com 0,5 M de ácido sulfúrico e brometo de cetiltrimetilamónio, representando as frações de lenhina e celulose do material vegetal, incluindo também a sílica. A sua determinação é particularmente útil nas forragens, uma vez que existe uma boa correlação entre ela e a digestibilidade do alimento. (McDonald *et al.*, 2010) A FDN é o resíduo resultante após a extração com soluções neutras a vapor de Dodecil sulfato de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético, sendo constituído por hemiceluloses, lenhina e celulose. (McDonald *et al.*, 2010). A FDA representa a porção de fibra menos digerível, é constituída por lenhina, celulose, sílica e formas insolúveis de azoto. A FDN contém componentes da parede celular da planta, onde estão incluídas as hemiceluloses, celulose, lenhina, sílica e cutinas. Embora a lenhina seja indigestível, as hemiceluloses e a celulose podem ser fermentadas por microrganismos característicos dos animais ruminantes. (Mertens 2002; Boever *et al.* 1995) O fracionamento da fibra teve uma grande importância principalmente para a formulação de alimentos compostos para ruminantes, uma vez que estes conseguem utilizar uma parte da fibra insolúvel do alimento, a fibra em detergente neutro. (Júnior *et al.*, 2007)

1.2.2. Necessidades Nutricionais

1.2.2.1. Proteína

As proteínas são compostos orgânicos complexos de elevado peso molecular constituídas por carbono, hidrogénio e oxigénio, onde também contêm azoto e geralmente enxofre. (McDonald *et al.*, 2010) Estas consistem numa sequência linear de resíduos de aminoácidos que se encontram ligados através de ligações covalentes, sendo as principais unidades de construção das proteínas. (Phillips *et al.*, 1994)

Estas têm um papel fundamental na alimentação do animal, uma vez que estão relacionadas com os processos vitais das células. As proteínas do corpo são formadas por vários aminoácidos e o organismo necessita deles para sintetizar as próprias proteínas. No entanto os animais não conseguem sintetizar todos os aminoácidos, sendo necessário fornecer-lhes uma quantidade mínima de proteína para atender às suas necessidades. (Andriguetto *et al.*, 1981)

A necessidade de proteína para cães e gatos varia, sendo baseada na idade do animal, estado de desenvolvimento e saúde. Produtos destinados ao consumo de cães e gatos adultos, é recomendado uma percentagem mínima de proteína de 18% e 26%, enquanto que, para cães e gatos em fase de crescimento o teor recomendado é de 22,5% a 30%. (FEDIAF 2016)

Alguns dos aminoácidos considerados como essenciais para estes animais são a arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. (McDonald *et al.*, 2010) No entanto, a taurina um aminoácido considerado não essencial para a maioria dos mamíferos é essencial para os gatos, uma vez que estes não conseguem sintetizá-la. A deficiência deste aminoácido resulta em anormalidades no desenvolvimento do sistema nervoso central, da retina, bem como mudanças no sistema cardiovascular e reprodutivo. (Schuller-Levis e Park 2003)

1.2.2.2. Gordura

As gorduras para além de serem fontes de energia, têm um papel fundamental no fornecimento de ácidos gordos que têm papéis nutricionais específicos no corpo do animal, para além de serem um fator importante na palatibilidade. Assim como acontece com as proteínas, existem ácidos gordos denominados de essenciais, pois os mamíferos não os conseguem sintetizar. Para tal estes ácidos gordos devem ser fornecidos na dieta. Temos como exemplo os ácidos linoleico e linolénico, que fazem parte de membranas responsáveis pelo transporte de lípidos e certas enzimas lipoproteicas. (McDonald *et al.*, 2010)

São recomendadas percentagens mínimas de gordura em alimentos para cães em fase de crescimento de 8,5% e 5,5% para alimentos destinados a cães em fase adulta. Quanto aos alimentos para gatos é recomendada uma percentagem mínima de 9% de gordura para gatos em fase de crescimento e adultos. (FEDIAF 2016)

1.2.2.3. Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono são uma ampla categoria de compostos. Os hidratos de carbono podem ser de reserva, sendo o mais encontrado neste tipo de alimento o amido, este é considerado como a forma mais económica de fornecer energia, na forma de glucose, que irá ser absorvida de uma maneira muito eficiente pelo trato intestinal. Não existindo um requisito dietético mínimo reconhecido. (Hilton 1990)

Os hidratos de carbono também são estruturais, estes nutricionalmente são designados por fibras, estas são compostas por um amplo número de estruturas sendo a celulose a mais representativa. (Thompson 2008)

As fibras, insolúveis, são constituídas principalmente por três polímeros: celulose, hemiceluloses e lenhina.

A celulose é um polímero linear de unidades de D-glucose ligadas por ligações β - (1 \rightarrow 4). As hemiceluloses são polímeros heterogéneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glucose, galactose) e ácido glucurónico. Dentro das hemiceluloses fazem parte polímeros como xilanas, arabinoxilanas, xiloglucanas, mananas, glucuronoxilanas e arabinogalactanas. (Nyman *et al.*, 1984)

A lenhina é composta basicamente por unidades de fenilpropano ligadas entre si pelo acoplamento irregular de C-C e C-O. Inclui três monómeros estruturais básicos: monómero de p-fenilo (tipo H) derivado do álcool cumarílico, monómero de guaiacilo (tipo G) derivado do álcool coniferílico e pelo monómero siringilo (tipo S) derivado do álcool sinapílico. (Chen 2014)

As moléculas de celulose organizam-se de forma a juntarem-se em feixes que vão determinar a estrutura das paredes celulares, onde também vão estabelecer ligações com as hemiceluloses e a lenhina. As moléculas de celulose e hemicelulose estão ligadas principalmente por uma ligação de pontes de hidrogénio, existindo também o estabelecimento de ligações covalentes entre as hemiceluloses a lenhina. As ligações entre hemiceluloses e lenhina referem-se principalmente a ligações entre resíduos de galactose, resíduos de arabinose nas cadeias laterais das moléculas de hemiceluloses e lenhina. (Chen 2014)

A fibra insolúvel, quando adicionada em quantidades adequadas em alimentos destinados a animais omnívoros, ou em alimentos Pet Food, onde se incluem os animais de companhia (cães e gatos), vai ser responsável por proporcionar vários benefícios, onde se incluem efeitos sobre a proliferação de bactérias benéficas e a diminuição da proliferação de bactérias patogênicas. (Goulart *et al.*, 2016)

As fibras solúveis (pectinas, gomas) ao serem fermentadas por bactérias intestinais no cólon, contribuem para a produção de ácidos gordos de cadeia curta que vão atuar como fonte de energia para a mucosa intestinal, além de protegerem os animais contra várias doenças, bem como, diarreias e inflamações intestinais. Estes ácidos gordos vão contribuir para a redução do pH do cólon, para a manutenção do equilíbrio da microflora intestinal, para a estimulação de absorção de sódio e água, entre outros. (Goulart *et al.*, 2016)

No caso dos alimentos destinados a gatos, segundo a literatura, a percentagem de fibra não deve ser superior a 10%. Relativamente aos cães adultos, a sua dieta deve incluir percentagens de fibra entre 2,5-4,5%. (National Research Council 2006)

1.3. Matérias-Primas

As agroindústrias servem-se de uma vasta gama de matérias-primas para formular alimentos compostos responsáveis por suprimir as necessidades nutricionais de todas as espécies animais, sejam eles animais de criação ou animais de companhia. (McDonald *et al.*, 2010)

Estes alimentos podem ser constituídos essencialmente por cereais, leguminosas, oleaginosas e subprodutos de origem agroindustrial. Nos alimentos compostos para cães e gatos (Pet Food), onde se foca este trabalho, as matérias-primas utilizadas podem ser divididas em duas categorias, os de origem vegetal - cereais, leguminosas, oleaginosas e subprodutos de origem agroindustrial e os de origem animal - subprodutos das indústrias de carne (frango, bovinos, suínos, ovinos, peixe, etc.). (Thompson 2011) Estas matérias-primas vão ser utilizadas como fontes de proteína, fibra e gordura.

Algumas fontes de lípidos mais usadas são as gorduras provenientes de aves e outros animais, óleo de peixe, manteiga, banha, ovos e gorduras provenientes de fontes vegetais como óleos e grãos oleaginosos. (Gray 2015) O milho também pode ser utilizado como fonte de gordura. (FEDNA 2016) Como fontes de proteína temos algumas que se podem destacar para este tipo de animais, nomeadamente a farinha de subprodutos de aves, normalmente frango, farinha de carne e osso e farinha de peixes. (Thompson 2008) Relativamente às fontes de fibra temos por exemplo a sêmea de trigo, casca de soja, polpa de beterraba e vagens de alfarroba seca. (Thompson 2008)

A tabela 2 apresenta a composição química de algumas matérias-primas aqui descritas.

Tabela 2 Composição química média de matérias-primas (composição em %). (Adaptado de FEDNA 2016)

	Proteína Bruta	Gordura Bruta	Fibra Bruta	Cinza Bruta
Milho	8,1	3,8	2,2	1,2
Sêmea de trigo	15,1	3,5	9,8	5,0
Polpa de Beterraba	9,30	0,69	19,5	6,06
Casca de Soja	11,8	2,5	32,7	4,7
Farinha de Peixe	70,0	9,5	0,4	12,5
Farinha de Aves	64,8	13,0	1,2	15,8
Farinha de Carne e Osso 57/13/24	56,6	13,1	1,0	23,6
Farinha de Carne e Osso 52/14/25	52,3	14,1	1,0	25,2
Farinha de Carne e Osso 50/14/26	49,3	14,4	1,0	26,0
Farinha de Carne e Osso 44/15/28	43,7	15,4	1,0	28,0

1.3.1. Variação da composição química e do preço das matérias-primas

O preço das matérias-primas apresenta uma grande influência nas indústrias de alimentação animal uma vez que o preço destas pode variar consideravelmente. (Beghi *et al.*, 2014) Alguns dos fatores responsáveis pela variabilidade dos seus preços são a sazonalidade, as condições meteorológicas e os preços dos produtos praticados nos

mercados internacionais. (INE 2013) Podendo ainda ser influenciado devido a um ou outro constituinte que contribui para a sua valorização, por exemplo, o teor em proteína ou amido. (Beghi *et al.*, 2014)

O relatório elaborado pela Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA), confirma a realidade da variação de preços. Estes divulgam que em 2010, entre julho e dezembro, os preços aumentaram consideravelmente - 65% para cereais, 74% para trigo forrageiro, 74% para a cevada e 33% para o milho, levando conseqüentemente a um aumento do custo de produção. (IACA 2010)

Para além do preço das matérias-primas poder variar consideravelmente, a sua composição química também não se mantém constante.

A variação da composição química das matérias-primas pode ser influenciada por diversos fatores: diferentes variedades de cereais, altura de colheita e colheitas realizadas em locais distintos. (Bruno Soares *et al.*, 1998)

As farinhas de carne, utilizadas como sendo a principal fonte proteica nos alimentos compostos Pet Food (obtidas por aquecimento, secagem e moagem de animais e produtos de abate, de corte e de supermercados) podem também apresentar variações na sua composição química devido à heterogeneidade do produto inicial e da utilização de misturas de carne de espécies distintas. Esta variabilidade leva a que as farinhas de carne sejam muitas vezes classificadas com três números, como podemos ver na tabela 1 (ex: 57/13/24) em que cada número é responsável por indicar o seu teor em proteína bruta, gordura bruta e cinza bruta respetivamente. (FEDNA 2011)

Não existem regulamentos que indiquem os valores médios de aceitação de uma matéria-prima. No entanto, existem fundações que desenvolveram guias de modo a oferecer uma orientação dos requisitos que estas devem apresentar. A Fundação Espanhola para o Desenvolvimento da Nutrição Animal (FEDNA), é uma das fundações que juntamente com colaboradores fornece os requisitos de aceitação para as indústrias de alimentação animal.

1.4. Requisitos Legislativos

Para além da necessidade do controlo dos parâmetros químicos para a produção de alimentos equilibrados nutricionalmente, existem limites legislativos a ter em conta quanto à rotulagem. Estes limites foram criados devido à existência de possíveis variações dos parâmetros químicos durante a produção.

O Regulamento (CE) nº 939/2010 que altera o Regulamento (CE) nº 767/2009 indica quais as tolerâncias a ter em conta quanto à rotulagem. As tolerâncias são estabelecidas quando a composição de um alimento composto para animais se desvia do valor constante do rótulo relativamente à sua composição química. São mencionados, entre outros, os teores declarados de proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta, cinza bruta e humidade.

Na existência de uma variação na composição de um alimento composto relativamente ao valor do rótulo, aplica-se as tolerâncias descritas na tabela 3.

Tabela 3 Limites legislativos quanto ao valor declarado no rótulo. (Adaptado do Regulamento (CE) nº939/2010)

Matéria gorda bruta, proteína bruta e cinza bruta
$\pm 3\%$ da massa ou volume total para teores declarados de 24% ou superiores $\pm 12,5$ do teor declarado caso este seja inferior a 24%, mas não inferior a 8% (podendo as tolerâncias variar) $\pm 1\%$ da massa ou do volume total para teores declarados inferiores a 8%
Fibra bruta
$\pm 3,5\%$ da massa ou volume total para teores declarados de 20% ou superiores $\pm 17,5\%$ do teor declarado caso este seja inferior a 20%, mas não inferior a 10% (podendo as tolerâncias variar) $\pm 1,7\%$ da massa ou do volume total para teores declarados inferiores a 10%
Humidade
$\pm 8\%$ do teor declarado caso este seja superior ou igual a 12,5% (podendo as tolerâncias variar) $\pm 1\%$ da massa ou do volume total para teores declarados inferiores a 12,5%, mas não inferiores a 5% $\pm 20\%$ do teor declarado caso este seja inferior a 5% mas não inferior a 2% (podendo as tolerâncias variar) $\pm 0,4\%$ da massa ou do volume total para teores declarados inferiores a 2%
Relativamente a alimentos compostos para animais de companhia, os valores de GB e PB apresentam uma tolerância de $\pm 2\%$ quando o teor declarado da massa ou volume total for inferior a 16%.

1.5. Espectroscopia de Infravermelho

1.5.1. História

A região da radiação infravermelha foi descoberta, acidentalmente, no ano de 1800 por um astrónomo de nome Sir William Herschel, quando estudava a contribuição de cada uma das cores da luz solar no aumento da temperatura das substâncias expostas. (Pasquini 2003) Durante a sua experiência decidiu posicionar o termómetro para além da zona do vermelho visível, observando que a temperatura continuava a aumentar, sendo assim descoberta a existência de mais energia para além do espectro visível. (Prasad *et al.*, 2011; Esteve Agelet e Hurburgh 2010) Esta zona do infravermelho, foi denominada por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR- Near Infrared Spectroscopy), por se encontrar a um comprimento de onda próximo do espectro visível. (Pasquini 2003)

Mais tarde, no início de 1880 o prato fotográfico de Niepce e Daguerre (desenvolvido em 1829) teve uma grande importância para a espectroscopia de infravermelho, uma vez que Abney e Festing, conseguiram registar fotograficamente, os espectros de compostos orgânicos, relacionando-os com a presença de ligações com átomos de hidrogénio. (Prasad *et al.*, 2011; Workman e Weyer 2012)

O trabalho desenvolvido por Abney e Festing, conjuntamente com W.W. Coblentz, foi construído o primeiro espectrómetro, usando como materiais, um prisma de pedrasal e uma termopilha sensível, conectada a um espelho de galvanómetro. Com este espectrómetro, Coblentz, por volta do ano de 1905, conseguiu reunir várias centenas de espectros de compostos, percebendo que existiam determinados padrões nos espectros, uma vez que observava zonas de absorção característicos para cada composto. (Burns e Ciurczak 2008)

No entanto, a espectroscopia de infravermelho teve um período de latência, entre os anos de 1800 e 1950, devido à existência de outros métodos analíticos que tinham a capacidade de fornecer resultados mais inequívocos. Tendo o seu reconhecimento no sector agroalimentar, apenas na década de 1950, após o trabalho desenvolvido por Karl Norris, especialmente na medição direta de amostras sólidas. (Sun,2008; García-Sánchez 2017; Workman e Weyer 2012)

1.5.2. Importância na Indústria

O desenvolvimento da tecnologia NIR para a determinação da humidade e composição química dos alimentos no sector agroalimentar, teve uma grande importância a nível económico dos produtos, como o trigo, em que o seu valor económico é baseado no peso seco e no teor de proteína. (Workman e Weyer 2012)

Desde a descoberta da técnica NIR, esta tem sido utilizada como uma técnica rápida de análise, no controlo rotineiro e na monitorização dos parâmetros de controlo, como a composição nutricional de matérias-primas e produtos alimentares. Permitindo o aumento da eficiência durante a produção e deteção de problemas antecipadamente, de modo a se obter um alimento final com as características pretendidas. (Ozaki *et al.*, 2007; Baeten *et al.*, 2015)

No entanto, a interpretação das bandas de absorção é uma tarefa muito complicada, devido à existência de bandas de absorção muitas das vezes sobrepostas e bandas de absorção correspondentes a combinações de ligações. Este problema levou a que Karl Norris desenvolve-se técnicas de tratamentos de dados, possibilitando a extração de toda a informação presente nos espectros de absorção, despertando assim maior interesse nesta técnica. (Paper, 1991; Ozaki *et al.*, 2007)

Devido ao avanço desta técnica, a indústria alimentar utiliza-a no controlo da composição química das matérias-primas, produtos intermédios e produtos finais. (Kawano 2002)

1.5.3. Princípios Teóricos

A espectroscopia de infravermelho situa-se acima da parte visível do espectro eletromagnético, encontrando-se entre os 780 e os 100000 nm. Esta zona pode ainda ser dividida em três técnicas distintas: infravermelho próximo (NIR- *Near Infrared Spectroscopy*) que se encontra compreendido entre os 780-2500 nm, infravermelho médio (MIR- *Mid Infrared Spectroscopy*), compreendido entre os 2500-40000 nm e o infravermelho distante (FIR- *Far Infrared Spectroscopy*), compreendido entre os 40000-100000 nm. (Workman 2006; Sun 2008; Luykx e Ruth 2008)

Das três técnicas apresentadas, o NIR é o mais amplamente utilizado pelas indústrias de alimentação animal, sendo usado para o controlo de qualidade de matérias-

primas, produtos intermédios e produtos finais. (Siesler *et al.*, 2008) Sendo a técnica NIR a técnica em que este trabalho se irá focar.

A base desta tecnologia reside na absorção de energia por grupos funcionais que contêm hidrogênio em compostos orgânicos presentes nos alimentos. (McDonald *et al.*, 2010) Sendo que os espectros de absorção correspondem principalmente a ligações de C-H, O-H, N-H e S-H, que são as moléculas mais comuns encontradas nos compostos orgânicos. (Porep *et al.*, 2015)

A técnica NIR, apresenta como princípio fundamental a energia absorvida por uma amostra quando esta é irradiada. No entanto, a luz absorvida vai depender de uma característica que pode ser usada para a determinação dos grupos funcionais presentes na amostra, a frequência de vibração única característica de cada grupo. (Givens *et al.*, 1997; Luykx e Ruth 2008)

Quando a radiação de infravermelho passa através da amostra, esta apenas vai ser absorvida, se a frequência corresponder à frequência de vibração da molécula, fazendo com que num determinado comprimento de onda, apenas algumas sejam absorvidas. Ou seja, a intensidade de absorção versus o comprimento de onda constitui o espectro de absorção da amostra. (Pasquini 2003) No entanto, para que ocorra vibração molecular, é necessário que a radiação infravermelha consiga interagir com a molécula, que só vai acontecer quando a deslocação dos átomos de um modo vibratório, possa produzir uma alteração no momento dipolar da molécula - a intensidade de um determinado espectro de absorção está associada à magnitude da mudança do momento dipolar. (Pasquini 2003)

A energia que não foi absorvida, irá ser refletida fornecendo informações sobre a sua composição. Estas absorções, ou dados espectrais, para nos fornecerem as informações da concentração do analito que pretendemos, têm de ser relacionados primeiramente com a composição química conhecida das amostras, determinadas pelos métodos de laboratório e é através de um método de regressão linear múltipla que conseguimos essa relação. (McDonald *et al.*, 2010)

Como dito anteriormente, os espectros NIR são complexos devido a bandas de absorção altamente sobrepostas e bandas fracas de absorção associadas a *overtones* e combinações de ligações. (Qu *et al.*, 2015) Estas combinações surgem quando existe a interação de duas ou mais vibrações que ocorrem simultaneamente e os *overtones* correspondem à transição da molécula do estado fundamental para estados de excitação

diferentes. Quando ocorre uma transição do estado fundamental da molécula para o segundo estado excitado originam-se bandas fracas denominadas de 1º *Overtone*, com a transição do estado fundamental para o terceiro estado excitado originam-se bandas fracas denominadas de 2º *Overtone* e da transição do estado fundamental para o quarto ou quinto estado excitado originam-se bandas correspondentes ao 3º e ao 4º *Overtone*. (Figura 2) (Prasad *et al.*, 2011)

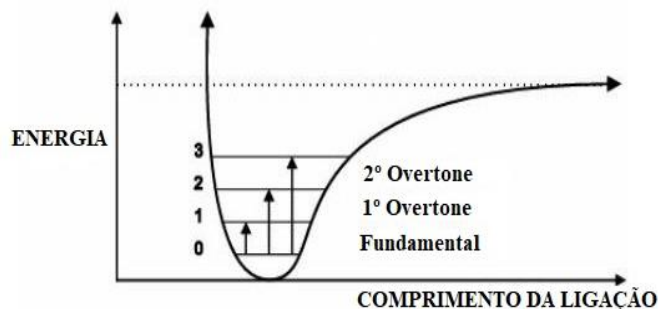


Figura 2 Transições vibracionais- overtone. (Adaptado de Prasad et al. 2011)

A técnica NIR tem sido usada principalmente para a determinação de compostos orgânicos. No entanto, muitos estudos demonstram que é possível fazer a determinação de compostos inorgânicos. Ao contrário das ligações orgânicas que possuem bandas de absorção na região do NIR, os compostos inorgânicos só conseguem ser detetados em complexos orgânicos e quelatos. (Givens *et al.*, 1997) Qualquer composto inorgânico que forme ligações covalentes dentro de um fragmento de um ião molecular, catião ou anião vai produzir um espectro de absorção característico com grupos de frequências associados. Determinados aspetos relacionados a compostos inorgânicos sob a forma de sais de ácidos carboxílicos, compostos de amina e amónio que podem ser estendidos a complexos metálicos, fragmentos químicos associados a grupos hetero-oxi (grupos com ligações X-O, onde o X pode ser: nitratos, sulfatos, fosfatos, silicatos, etc.) e compostos de carbonilo e metais de transição foram tidos em conta para a sua determinação. Os espectros de absorção dos compostos inorgânicos podem ser afetados pela estrutura e orientação do ião ou do complexo. (Coates 2000)

1.5.3.1. Zonas de Absorção Características

As frequências de vibração típicas de cada molécula permitem identificar algumas zonas que correspondem a absorções típicas para a proteína, fibra e gordura. A tabela 4 apresenta os comprimentos de onda característicos de cada parâmetro.

Tabela 4 Algumas zonas de absorção características. (Adaptado de Alomar *et al.*, 2006; Workman 2006)

Localização Característica das Bandas de Absorção		
Proteína	Fibra	Gordura
975-1015 nm	985-995 nm	896-915 nm
1480-1550 nm	1170 nm	911-935 nm
1620-1700 nm	1410-1420 nm	1010-1025 nm
1980 nm	1417-1440 nm	1415 nm
2030-2080 nm	1490 nm	1760 nm
2148-2200 nm	1500 nm	2070 nm
	1685	2140 nm
	1780 nm	2310 nm
	1820 nm	2346 nm
	2200 nm	2380 nm
	2335 nm	
	2340 nm	
	2347 nm	
	2348 nm	
	2352 nm	
	2488 nm	

Apesar do objetivo deste trabalho não incluir a capacidade da técnica NIR em determinar o teor de amido nem o teor de humidade nos alimentos Pet Food, estes apresentam também algumas zonas de absorção características.

Para o amido temos os comprimentos de onda 850-900 nm, 1010-1030 nm, 1450 nm, 2100 nm, 2280-2330 nm e 2500 nm. Para a determinação da humidade, os comprimentos de onda associados são os seguintes: 950 – 980 nm, 1440-1470 nm e 1920-1940 nm. (Workman 2006)

Para além das zonas aqui representadas como sendo características para a determinação da fibra e do amido, existem ainda zonas em comum relativamente ao amido e à fibra. Os hidratos de carbono não estruturais (amido e açúcares) têm o inconveniente de não se poderem diferenciar da celulose (hidrato de carbono estrutural), uma vez que apresentam zonas de absorção em comum, temos como exemplo os seguintes comprimentos de onda: 858 a 868 nm, 894 a 906 nm, 916 a 918 nm, 2096 a 2106 nm, 2276 nm, e de 2330 a 2336 nm. (Vásquez *et al.*, 2004)

1.5.3.2. Fatores que afetam os espectros

Existem vários fatores que podem influenciar os espectros NIR: temperatura, tamanho das partículas e distribuição do tamanho das partículas.

Os alimentos para os animais, ao serem compostos por uma grande variedade de ingredientes (soja, aveia, trigo, alfafa, colza, farinha de carne, farinha de peixe, entre outros) apresentam uma ampla gama de partículas que diferenciam no seu tamanho e forma, podendo provocar a alteração das características de reflexão e dispersão, durante a análise NIR, pela alteração da densidade da amostra. (Williams e Starkey 1980) A influência da utilização de vários ingredientes durante a análise NIR é discutida por Williams e Starkey, (1980), uma vez que podem afetar as reflexões ou dispersões da luz. Este estudo ilustra o tipo de influência que algumas matérias-primas têm sobre a medição dos teores de proteína em alimentos compostos, concluindo que é necessário haver a inclusão, na calibração, alimentos com matérias-primas suscetíveis de serem utilizadas em futuras formulações.

A temperatura irá influenciar a intensidade das vibrações, uma vez que as ligações de hidrogénio são consideradas ligações fracas, provocando consequentemente alterações nas bandas de absorção. Temos como exemplo, as bandas de absorção da água que quando influenciadas pela temperatura, mudam para frequências mais altas (comprimentos de onda mais baixos). (Shah *et al.*, 2016; Hageman *et al.*, 2005; Cozzolino *et al.*, 2007; Büning-Pfaue 2003)

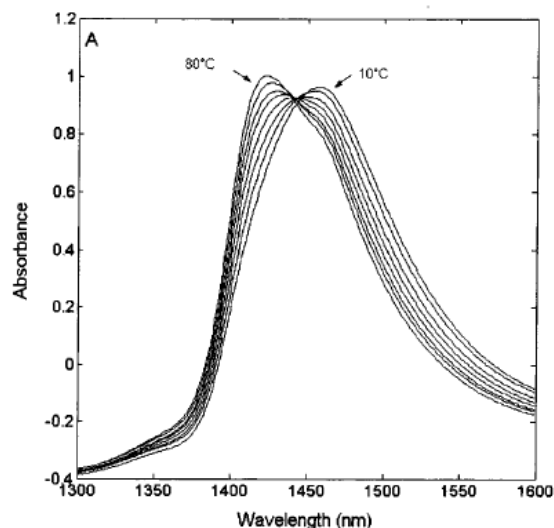


Figura 3 Espectros NIR não tratados de água medidos, com uma variação de temperatura de 6 a 80 ° C. (Adaptado de Segtnan et al. 2001)

O facto das ligações intermoleculares serem geralmente enfraquecidas pelas mudanças de temperatura, leva a que estas mudem a posição da banda de absorção de acordo com a temperatura da amostra, como se verificou ao ser efetuada uma variação da temperatura de 6°C a 80°C, provocando uma mudança da banda de absorção da água de 1460nm para 1424nm. (Figura 3) (Segtnan *et al.*, 2001)

1.6. Construção e Validação de Modelos de Calibração

A espectroscopia NIR baseia-se na correlação (curvas de calibração) entre a absorção da luz e a composição química da amostra. Para tal, para ser utilizada nas análises de rotina, necessita do desenvolvimento de um sistema de calibração robusto para a determinação precisa dos vários parâmetros pretendidos. (Rahman *et al.*, 2015; Park *et al.*, 1998)

Esta técnica é capaz de fornecer uma grande quantidade de dados espectrais que contêm grandes quantidades de informação sobre as propriedades químicas das moléculas responsáveis por fornecer informações analíticas úteis. No entanto, estes dados também contêm ruído, incertezas, variabilidades, interações, não-linearidades e características não reconhecidas, levando a que a interpretação destes dados seja desafiante. (Sun 2008)

A quimiometria surge face à necessidade de extrair todas as informações relevantes dos espectros utilizando métodos matemáticos e estatísticos de modo a processar os dados das medições efetuadas. (Roussel *et al.*, 2014) É uma técnica de análise multivariada caracterizada pela construção de um modelo matemático que irá extrair toda a informação contida nos espectros, relacionando as várias variáveis analíticas (espectros NIR) com as propriedades (concentrações) dos analitos. Assim é possível estabelecer métodos de classificação para amostras desconhecidas (análise qualitativa) ou realizar métodos que determinem o teor de analitos desconhecidos (análise quantitativa). (Blanco e Villarroya 2002)

O procedimento usual para a construção de um modelo de calibração, envolve a seleção de amostras, a aquisição dos espectros e resultados das análises de referência, pré-tratamento de dados, modelagem estatística multivariada (calibração) e validação. (Martin 1992)

1.6.1. Seleção de Amostras

O primeiro passo para o desenvolvimento de um modelo de calibração é a seleção de amostras com a intenção de criar uma biblioteca espectral. O grupo de amostras selecionado deve ser bem definido e deve ter em conta as características físicas da amostra, uma vez que as medições podem ser influenciadas devido à textura, tamanho e geometria das partículas que constituem a amostra, provocando a baixa seletividade das informações espectrais do NIR. (García-Sánchez 2017)

Segundo a literatura, não existe um número fixo de amostras que devem ser utilizadas para a construção de modelos robustos. Estas podem variar de apenas 20 a 30, para amostras mais homogêneas, ou algumas centenas de amostras como é o caso das indústrias alimentares - uma vez que apresentam uma grande complexidade na composição química devido à sua heterogeneidade. (Esteve Agelet e Hurburgh 2010)

O conjunto de amostras selecionadas devem ser representativas das amostras a analisar no futuro. Uma boa seleção da amostra vai ajudar a tornar esta técnica num método robusto e amplo na sua aplicabilidade. No caso das indústrias alimentares devem ser usadas o maior número possível de matérias-primas na construção destes modelos devido à grande variação da sua composição química, assim como devem ser selecionados alimentos compostos representativos da vasta gama de formulações

possíveis devido à disponibilidade de matérias-primas que podem ser usadas em formulações futuras. (Honigs 1985; Martin 1992)

1.6.2. Pré-tratamento

Após a recolha de todas as amostras e dos respetivos valores de referência, é necessário um pré-tratamento. O pré-tratamento é responsável por remover as possíveis interferências que podem influenciar a exatidão do modelo- perturbações externas tais como: variações na temperatura, diferenças instrumentais e tamanhos diferentes das partículas.

Existem diferentes tipos de pré-tratamentos: normalização, derivadas (primeira ou segunda), correção da dispersão multiplicativa (MSC), variação padrão normal (SNV), método de Savitzky-Golay, método de Norris, *de-trending* (DT), tendência, entre outros, sendo que o melhor pré-tratamento a ser usado vai depender do sistema a ser analisado.

Após o pré-tratamento é ainda necessário haver uma redução das variáveis, devido à grande quantidade de informações fornecidas pelos espectros, excluindo aquelas que não se encontram correlacionadas, a análise de componentes principais (PCA) é a técnica mais utilizada para este fim. (Blanco e Villarroya 2002; Cao 2013; García-Sánchez 2017)

1.6.3. Modelagem estatística Multivariada – Calibração

Após a recolha de todas as informações e terem sido utilizados os pré-tratamentos adequados, torna-se necessário criar uma correlação entre os dados espectrais e os resultados analíticos. (García-Sánchez 2017) Esta correlação é realizada através da utilização de métodos de regressão multivariada, aplicados para a classificação e quantificação.

As ferramentas mais utilizadas são a regressão de componentes principais (PCR), a regressão linear múltipla (MLR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). O método escolhido vai depender da finalidade da análise, das características da amostra e da complexidade do sistema. Para uma melhor compreensão dos métodos multivariados é necessário saber que estes são interpretados como métodos de reconhecimento de padrões, onde podem ser classificados como supervisionados ou não supervisionados -

estabelecem critérios matemáticos que permitem encontrar semelhanças entre uma amostra e uma classe, ou entre duas amostras. As semelhanças são expressas pelo coeficiente de determinação (R^2) ou pela distância de Mahalanobis (H). Segundo a literatura, espectros cuja distância de Mahalanobis seja superiores a 3, são considerados como *outliers* e descartados da população espectral. (Blanco e Villarroya 2002; Martín *et.*, 2006)

Depois da construção do modelo, a calibração deve ser avaliada, comparando as concentrações previstas pela calibração, com os valores de referência, determinados pelos métodos laboratoriais.

1.6.4. Validação

Após o desenvolvimento do modelo de calibração é necessário, antes da sua utilização, testar a capacidade de prever amostras desconhecidas que não se encontram presentes no conjunto de calibração. Os resultados obtidos devem ser comparados com os valores de referência de modo a verificar as suas semelhanças. (Broad *et al.*, 2006; Roberts e Cozzolino 2016)

Existem dois tipos de validação: validação independente, também denominada de validação externa, e a validação cruzada.

A validação externa requer um conjunto de validação separado do conjunto de calibração, que deve ser grande e representativo dos parâmetros em estudo de modo a fornecer estimativas relevantes e confiáveis da capacidade de previsão do modelo de calibração, já a validação cruzada procura validar o modelo de calibração sem usar dados externos. Para que se efetue uma calibração cruzada, são excluídas amostras ou um grupo de amostras do conjunto de calibração de forma sucessiva, sendo que após cada remoção é feita uma nova calibração, e assim sucessivamente até todas as amostras terem sido excluídas uma vez. (Sun 2008)

A validação ideal, deveria ser aquela que utiliza amostras não usadas para a calibração. No entanto, como nem sempre é possível, a validação cruzada pode fornecer também uma boa avaliação sobre o desempenho do modelo de calibração. (Esteve Agelet e Hurburgh 2010)

1.6.4.1. Critérios de avaliação do modelo de Calibração

São usados vários critérios estatísticos para descrever o desempenho do modelo de calibração para uma análise quantitativa, nomeadamente o erro padrão de previsão (SEP) ou erro padrão da validação cruzada (SECV), o Bias, o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio residual de previsão (RPD). (Sun 2008) Em alguns casos também podem ser utilizados erro padrão médio de previsão (RMSEP), quando usada uma validação externa, ou o erro padrão médio de validação cruzada (RMSECV) quando usada uma validação cruzada. (Beghi *et al.*, 2014)

O SEP e o SECV são os critérios estatísticos responsáveis por fornecer a informação sobre a exatidão da calibração, muitas vezes os valores do SEP são relatados juntamente com os valores do Bias, que representa a diferença média entre os valores determinados pelos valores de referência e os valores do NIR, estes devem apresentar um valor o mais baixo possível.

O R^2 vai indicar o quanto os resultados determinados pelo NIR estão explicados pelos valores obtidos pelos métodos de referência, permitindo determinar a correlação existente entre os valores obtidos pelo NIR e os valores obtidos pelos métodos de referência. (Asuero *et al.*, 2006) A exatidão da previsão dos modelos pode ser considerada excelente quando $R^2 \geq 0,91$, boa quando $0,90 \geq R^2 \geq 0,82$, moderadamente bem-sucedido quando $0,81 \geq R^2 \geq 0,66$ e mal sucedido quando $R^2 \leq 0,65$. (Lequeue *et al.*, 2016; Sun 2008)

O RPD é usado para discutir a capacidade do modelo prever dados futuros, caso este apresente valores superiores a 8, o modelo pode ser usado para qualquer finalidade, já valores inferiores a 2,3 indicam que o modelo apresenta um mau desempenho. (Beghi *et al.*, 2014)

Apesar de serem estes os critérios mais usados, existem outros, como o coeficiente de correlação múltipla (RSQ) e a capacidade relativa de previsão (RAP), este integra o valor do SEP, e tal como o R^2 , varia de 0 a 1, quanto mais perto de 1 for o RAP e o RSQ melhor vai ser a capacidade de previsão. (Xiccato *et al.*, 2003; Kumaravelu 2015)

O RSQ é responsável por explicar a relação entre os valores das duas variáveis (valores do NIR e valores análises externas), a correlação aumenta quando a correlação entre as variáveis aumenta. (Lira 2004)

Segundo Fontaine, Schirmer and Jutta, (2002), os resultados do SECV por si só não conseguem refletir claramente a utilidade da calibração, sendo utilizada em alguns casos, a proporção do desvio padrão (SD) da população de calibração com o SECV. Caso esta proporção (SD/SECV) apresente valores superiores a 3, indica a existência de uma boa previsão dos valores, enquanto que valores abaixo de 2 indicam a aplicabilidade reduzida da técnica.

Os erros (SEP, SEC, SECV, RMSEP, RMSECV e o Bias) apresentam como unidades as mesmas que os valores de referência. Os restantes fatores estatísticos não apresentam nenhuma unidade associada. (Esteve Agelet e Hurburgh 2010)

1.7. Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho Próximo em Alimentos Compostos para Animais

A técnica NIR é particularmente útil no contexto de fabricação de alimentos compostos, onde é necessária uma análise rápida de matérias-primas e produtos acabados para misturas eficientes e padrões de controle de qualidade. (McDonald *et al.*, 2010) No entanto, a existência de matrizes complexas neste tipo de alimentos podem levar à existência de fatores que influenciam a análise pelo NIR. (Fernández-Ahumada *et al.*, 2008)

Neste capítulo irão ser mostrados alguns estudos efetuados por vários autores, que utilizaram a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) na determinação de vários parâmetros, em diversos tipos de alimentos para animais, utilizando zonas espectrais distintas, assim como diferentes pré-tratamentos, métodos de análise multivariada e tipos de validação. As tabelas 5, 6 e 7 apresentam de forma resumida estas informações e ainda os resultados de validação obtidos de cada parâmetro estudado pelos autores.

1.7.1. Alimentos Compostos para vários tipos de Animais

A técnica de espectroscopia NIR foi testada por Xiccato *et al.*, (2003) na avaliação da composição química de alimentos formulados para Coelhos. Neste estudo foi avaliada a capacidade desta técnica em prever os teores de proteína bruta (PB), gordura bruta (GB), fibra bruta (FB), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e lenhina em detergente ácido (LDA). Os resultados da validação cruzada realizada por este estudo demonstraram que os valores de previsão da PB foram satisfatórios, podendo ser explicados pela baixa variabilidade proveniente das fontes proteicas, sendo usadas apenas três fontes proteicas nestas formulações (farelo de soja, farelo de girassol e farelo de alfafa), ao contrário das previsões de FB, FDN e ADL que obtiveram valores mais baixos. A PB, GB e FDA obtiveram valores de $R^2 \geq 0,82$ e valores de $RAP \geq 0,85$, enquanto que a previsão de FB, FDN e lenhina em detergente ácido obteve valores de $R^2 \leq 0,60$ e valores de $RAP \leq 0,62$.

A previsão baixa da FDN leva a que o valor determinado possa não apresentar o valor real de FDN presente no alimento e conseqüentemente pode influenciar negativamente a nutrição dos coelhos. Valores baixos de fibra nos alimentos para coelhos podem provocar

doenças no trato digestivo do animal provocando vários problemas como a diminuição dos movimentos peristálticos e o aumento de risco de diarreias. (Naranjo Herrera *et al.*, 2001)

Diferentes tipos de alimentos formulados para vários tipos de animais (suínos, bovinos, ovinos, galinhas e coelhos de diferentes estados de desenvolvimento e com diferentes formatos) foram também utilizados por Martín *et al.*, (2006) para avaliar a técnica NIR em determinar a PB, GB e FB. Os resultados obtidos por este estudo confirmam a capacidade da técnica NIR em determinar os parâmetros analisados, tendo sido obtidos valores de $RSQ \geq 0,84$, e erros (SEP e Bias) não significativos. A calibração desenvolvida para determinar os parâmetros previstos ao apresentarem valores de RSQ altos e valores de erro não significativos demonstram que os valores obtidos pela técnica NIR são comparáveis aos valores analisados pelos métodos de referência. Deste modo as empresas conseguem determinar a composição química dos alimentos com eficiência, controlar o preço envolvido durante a produção e respeitar os limites de variação toleráveis pela legislação.

A influência do tamanho e da textura das amostras na análise por NIR foi estudada por Pérez-Mar e Garrido-Varo, (2004). A técnica foi utilizada para determinar os teores de PB, GB, FB e CB em alimentos compostos de diferentes tipos de animais (cordeiros, galinhas, suínos, avestruzes, equinos, coelhos, bovinos, gatos e cães) que variavam de forma considerável em termos da sua composição. Neste estudo foram utilizados dois grupos de amostras que diferenciavam na sua forma de preparação - amostras moídas e amostras não moídas.

Os alimentos na forma não moída foram analisados usando uma célula de análise retangular (Figura 4), e os alimentos moídos, foram analisados usando dois tipos de células de análise, uma célula retangular $\frac{1}{4}$ (Figura 5) e uma célula redonda (Figura 6).



Figura 4 Célula Retangular de análise de alimentos granulados. (Adaptado de Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004)



Figura 5 Célula Retangular de análise 1/4. (Adaptado de Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004)



Figura 6 Célula de análise redonda. (Adaptado de Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004)

Os valores obtidos após efetuada a validação cruzada apresentaram valores de previsão para a determinação de PB, GB e FB semelhantes nas amostras não moídas e nas amostras moídas, exibindo valores de $R^2 \geq 0,87$ para as amostras não moídas, valores de $R^2 \geq 0,84$ para amostras moídas analisadas na célula circular e valores de $R^2 \geq 0,85$ para amostras moídas analisadas na célula retangular $\frac{1}{4}$. Quanto aos valores de RPD, os valores obtidos demonstraram-se satisfatórios. As análises efetuadas entre amostras moídas e não moídas não apresentam diferenças significativas, tendo sido verificado a boa capacidade do NIR em determinar estes parâmetros em ambos os modos de análise.

Relativamente à determinação da parte inorgânica dos alimentos foram obtidos valores de R^2 também eles superiores a 0,85, valores de SECV inferiores a 0,69 e valores de RPD superiores a 2,58. No entanto é de notar que foram obtidos valores ligeiramente melhores nas determinações em que a amostra foi moída.

Tabela 5 Resultados de validação obtidos para a determinação de vários parâmetros químicos em alimentos para coelhos e vários tipos de alimentos para animais.

Alimento Composto	Zona Espectral	Pré-tratamento	Método de Análise Multivariada	Tipo Validação	Parâmetros Analisados	Resultados Validação						Autores
						R ²	SEP	Bias	SECV	RAP	RSQ	
Coelhos 164 amostras	1100-2500	-	PLS	Cruzada	PB	0,86	0,56	-	-	0,95	-	(Xiccato <i>et al.</i> , 2003)
					GB	0,93	0,42	-	-	0,98	-	
					FB	0,60	1,6	-	-	0,65	-	
					NDF	0,50	3,2	-	-	0,62	-	
					ADF	0,82	1,4	-	-	0,85	-	
					ADL	0,59	1,6	-	-	0,62	-	
Vários Animais 72 amostras	110-2000	MSC + PCA	PLS	Cruzada	PB	-	0,13	-0,07	0,10	-	0,99	(Martín, Farcía e Hernández 2006)
					GB	-	0,02	0,09	0,03	-	0,93	
					FB	-	0,06	-0,24	0,09	-	0,85	

PB: Proteína Bruta; **GB:** Gordura Bruta; **FB:** Fibra Bruta; **NDF:** Fibra em detergente neutro; **ADF:** Fibra em detergente ácido; **ADL:** Lenhina em detergente ácido; **PLS:** regressão por mínimos quadrados parciais; **R²:** Coeficiente de determinação; **SEP:** erro padrão de previsão; **SECV:** erro padrão da validação cruzada; **RAP:** capacidade relativa de previsão; **RSQ:** coeficiente de correlação múltipla

Tabela 6 Resultados de validação obtidos para a determinação de vários parâmetros químicos em alimentos moídos e não moídos para vários tipos de alimentos para animais.

Alimento Composto	Região Espectral (nm)	Forma de Análise	Célula de Análise	Pré-Tratamento	Método de Análise Multivariada	Tipo Validação	Parâmetros Analisados	Resultados Validação			Autores
								R ²	SECV	RPD	
Vários Animais 433+178 amostras	400-2498	Não Moída	Retangular	Derivadas	PLS	Cruzada	PB	0,97	0,55	5,84	(Pérez-Mar e Garrido-Varo 2004)
							GB	0,94	0,61	3,90	
							FB	0,98	0,52	7,06	
							CB	0,85	0,69	2,58	
		Moída	Circular				PB	0,98	0,52	7,20	
							GB	0,96	0,45	4,96	
							FB	0,97	0,63	5,76	
							CB	0,90	0,61	3,11	
		Moída	Retangular 1/4				PB	0,98	0,5	7,20	
							GB	0,95	0,47	4,57	
							FB	0,98	0,46	8,07	
							CB	0,90	0,61	3,11	

PB: Proteína Bruta; **GB:** Gordura Bruta; **FB:** Fibra Bruta; **CB:** Cinza Bruta **PLS:** regressão por mínimos quadrados parciais; **R²:** Coeficiente de determinação; **SEP:** erro padrão de previsão; **SECV:** erro padrão da validação cruzada; **RPD:** desvio residual de previsão

1.7.2. Alimentos Compostos Pet Food

Nesta secção irão ser abordados dois trabalhos, realizados por Alomar *et al.*, (2006) e De Marchi *et al.*, (2016), que utilizaram a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) para determinar o teor de proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), gordura bruta (GB) e cinza bruta (CB) em alimentos para cães. É de notar que apenas o segundo estudo determinou a percentagem de cinza bruta. A tabela 7 apresenta de forma resumida todas as informações sobre as zonas da região espectral selecionada, os pré-tratamentos utilizados, os métodos de análise multivariada utilizados e todos os resultados obtidos para a validação cruzada realizada em ambos os casos. Os valores obtidos na validação cruzada dizem respeito ao coeficiente de determinação (R^2) e ao erro padrão da validação cruzada (SECV), sendo ainda usado para validar as calibrações o valor do erro padrão da validação cruzada (SD/SECV) e o valor do desvio residual de previsão (RPD).

Nos dois estudos os valores de SECV foram considerados baixos para os autores, tendo sido obtidos valores de SECV para a previsão de proteína bruta de 0,5 e 0,66, valores de SECV para a previsão de fibra bruta de 0,31 e 0,29, valores de SECV para a previsão de gordura bruta de 0,89 e 0,83 e um valor de SECV para a previsão de cinza bruta de 0,78.

Analisando em primeiro lugar a capacidade do NIR em prever a proteína bruta, em ambos os estudos foi possível visualizar que foram obtidos valores de R^2 de 0,97 e 0,99, valores estes que indicam a capacidade excelente de previsão deste parâmetro. O valor do SD/SECV muito acima de 3 (SD/SECV igual a 9,0 e 6,06), assim como um valor de RPD de 6,06 no estudo desenvolvido por De Marchi *et al.*, (2016) vem confirmar a alta aplicabilidade da técnica NIR em prever o teor de proteína bruta. (Beghi *et al.*, 2014; Fontaine *et al.*, 2002)

Relativamente à previsão da fibra bruta os valores de R^2 foram maiores no primeiro estudo comparativamente ao segundo (R^2 igual a 0,91 e 0,86), no entanto apesar de ter sido obtido um valor de R^2 maior no primeiro estudo ambos demonstraram ter uma boa capacidade para prever este parâmetro e mais uma vez os valores de SD/SECV e RPD, apesar de terem sido mais baixos do que os valores obtidos para a previsão da proteína bruta, demonstram a aplicabilidade da técnica NIR em prever este parâmetro (SD/SECV igual a 3,3 e 2,70 e valor de RPD de 2,70 no segundo estudo. (Beghi *et al.*, 2014; Fontaine *et al.*, 2002)

A previsão da gordura bruta foi o parâmetro que teve valores um pouco mais baixos de R^2 no entanto estes valores (R^2 de 0,89 e 0,83) aliados aos valores de SD/SECV (3,1 e 2,45) e RPD,2,45, demonstram que existe aplicabilidade da técnica NIR e com uma previsão considerada boa da gordura bruta presente nos alimentos para cães. (Beghi *et al.*, 2014; Fontaine *et al.*, 2002)

A determinação da cinza bruta presente nestes alimentos apresentou um valor de R^2 mais baixo em comparação com os restantes parâmetros, no entanto um valor de R^2 de 0,78 indica que a capacidade de previsão deste parâmetro é possível embora menos bem-sucedida. Foi obtido um valor de 2,13 tanto para o SD/SECV como para o RPD indicando que a técnica NIR pode ser aplicada para determinar este parâmetro. (Beghi *et al.*, 2014; Fontaine *et al.*, 2002) Estes estudos apresentaram na sua maioria uma boa capacidade na previsão dos parâmetros em estudo, proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta. Relativamente às frações da fibra apenas o estudo realizado por Xiccato *et al.*, (2003) faz referência a estes parâmetros, tendo sido obtidos bons resultados de previsão para a fibra em detergente ácido, mas resultados de previsão mais baixos para a fibra em detergente neutro e para a lenhina. Isto deve-se ao baixo sinal do NIR na determinação da lenhina e também à má reprodutibilidade do método de referência na determinação deste parâmetro. (Xiccato *et al.*, 2003)

Apesar de terem sido obtidos valores de validação que indicaram a robustez da técnica NIR em determinar a PB, GB, FB e CB, utilizando a mesma calibração, nos estudos realizados por Pérez-Mar e Garrido-Varo, (2004) e Martín *et al.*, (2006), são recomendadas calibrações diferenciadas para os vários tipos de animais, uma vez que a composição dos seus alimentos pode variar consideravelmente. Alimentos que apresentem grandes quantidades de minerais podem influenciar os valores de absorção dos espectros, e devem também eles dispor de uma calibração diferenciada dos restantes alimentos. (Williams e Starkey 1980).

As calibrações desenvolvidas por Alomar *et al.*, (2006) e De Marchi *et al.*, (2016) para a determinação da proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta, em alimentos para cães demonstraram a aplicabilidade desta técnica na determinação precisa da sua composição química.

No caso de existirem incorporações de pré-misturas de vitaminas e suplementos em proporções normalmente utilizadas, não há propensão à ocorrência de erros graves, desde

que sejam tomadas as precauções devidas durante a calibração, sendo possível prever a composição destes alimentos com exatidão. (Williams e Starkey 1980)

Tabela 7 Resultados de validação obtidos para a determinação de vários parâmetros químicos em alimentos para cães.

Alimento Composto	Região Espectral (nm)	Pré-Tratamento	Método de Análise Multivariada	Tipo Validação	Parâmetros Analisados	Resultados Validação				Autores
						R ²	SECV	SD/SECV	RPD	
Cães 59 amostras	-	Derivadas SNV	PLS	Cruzada	PB	0,99	0,5	9,0	-	(Alomar <i>et al.</i> , 2006)
					FB	0,91	0,31	3,3	-	
					GB	0,89	1,24	3,1	-	
Cães 649 amostras	570-1842	SNV DT	MPLS	Cruzada	PB	0,97	0,66	6,06	6,06	(De Marchi <i>et al.</i> , 2016)
					FB	0,86	0,29	2,70	2,70	
					GB	0,83	1,01	2,45	2,45	
					CB	0,78	0,69	2,13	2,13	

PB: Proteína Bruta; **GB:** Gordura Bruta; **FB:** Fibra Bruta; **CB:** Cinza Bruta **PLS:** regressão por mínimos quadrados parciais; **MPLS:** regressão por mínimos quadrados parciais modificado; **R²:** Coeficiente de determinação; **SD/SECV:** erro padrão da validação cruzada; **SECV:** erro padrão da validação cruzada; **RPD:** desvio residual de previsão.

1.8. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo avaliar a robustez da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), em determinar com exatidão a composição química dos alimentos Pet Food produzidos pela empresa Ovargado S.A.

O trabalho encontra-se dividido em duas partes. A primeira parte discute os resultados da calibração e da validação cruzada fornecidos pelo Master Lad da Trouw Nutricion, empresa responsável pela construção das retas de calibração utilizadas pela Ovargado. E a segunda parte do trabalho vai comparar os resultados obtidos pelo NIR com resultados de análises externas, deste modo foi não só possível verificar as diferenças existentes entre os dois métodos de análise, como também foi possível perceber se estas diferenças podem ter implicações a nível da rotulagem.

2. Materiais e Métodos

2.1. Delineamento Experimental

A primeira parte apresenta os resultados fornecidos pela empresa responsável pela construção das retas de calibração, utilizadas para determinar os parâmetros químicos dos alimentos Pet Food produzidos pela Ovargado S.A. Parâmetros estes que dizem respeito à caracterização química dos alimentos em termos do seu teor em proteína bruta (PB), gordura bruta (GB), fibra bruta (FB) e cinza bruta (CB). Foram fornecidos os valores obtidos para as calibrações e validações cruzadas de todos os parâmetros referidos, dos anos de 2015, 2016 e 2017, assim como os intervalos de valores que esta técnica consegue prever com exatidão. Estes valores vão ser discutidos de forma a verificar se ocorreram melhorias ao longo destes três anos e se os valores da validação cruzada demonstram se a técnica NIR apresenta uma boa capacidade de previsão dos parâmetros. Os valores fornecidos das calibrações, de todos os parâmetros, dizem respeito aos valores do coeficiente de correlação múltipla (RSQ) e ao erro padrão de calibração (SEC). Os valores fornecidos das validações cruzadas dizem respeito aos valores do coeficiente de determinação (R^2) e ao erro padrão da validação cruzada (SECV). Onde os valores de RSQ e R^2 são responsáveis por explicar a relação existente entre os valores das duas variáveis, ou seja, a relação existente entre os valores previstos pelo NIR e os valores determinados pelos métodos de referência utilizados para realizar a calibração.

A segunda parte do trabalho diz respeito à comparação das determinações realizadas pelo NIR com os resultados das análises realizadas num laboratório externo à Ovargado. Foram recolhidos valores das previsões do NIR e das determinações do laboratório externo dos mesmos parâmetros estudados na primeira parte do trabalho- proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta, também dos anos de 2015, 2016 e 2017. Esta parte do trabalho teve como objetivo verificar se as diferenças existentes entre os dois métodos de análise são significativamente diferentes, para deste modo verificar se a técnica NIR é capaz de determinar com exatidão os parâmetros.

2.2. Material e Recolha de resultados

Todos os resultados da calibração e da validação cruzada foram fornecidos pelo Master Lab da Trouw Nutricion situado em Madrid- empresa responsável pelo desenvolvimento das retas NIR.

Os resultados recolhidos para comparar os dois métodos de análise são divididos em três grupos. No primeiro grupo, foram recolhidos no total 64 resultados de 6 alimentos diferentes, referentes ao ano 2015 - 15 resultados do alimento Manutenção, 9 resultados do alimento Manutenção Mix, 10 resultados de alimentos para Cachorros, 11 resultados para o Alta Energia, 8 resultados para o Alta Energia Extra e 12 resultados de alimentos para Gatos.

O segundo grupo faz referência à recolha de resultados do ano 2016, também de 6 alimentos diferentes. No total foram recolhidos 70 resultados - 14 resultados do alimento Manutenção, 11 resultados do alimento Manutenção Mix, 11 resultados de alimentos para Cachorros, 9 resultados para o Alta Energia, 7 resultados para o Alta Energia Extra e 18 resultados de alimentos para Gatos.

O terceiro grupo apresenta os resultados recolhidos do ano de 2017, também ele de 6 alimentos diferentes. No total foram recolhidos 30 resultados -7 resultados do alimento Manutenção, 8 resultados do alimento Manutenção Mix, 4 resultados de alimentos para Cachorros, 3 resultados para o Alta Energia, 2 resultados para o Alta Energia Extra e 6 resultados de alimentos para Gatos.

Na tabela 8 pode-se visualizar as proporções das diferentes matérias-primas utilizadas na produção dos diferentes alimentos, estas proporções estão descritas em percentagem em relação à constituição final do alimento.

Tabela 8 Proporções de diferentes matérias-primas utilizados na produção dos diferentes alimentos (% em relação à constituição total).

	Manutenção e Manutenção Mix	Cachorros	Gatos	Alta Energia	Alta Energia Extra
Milho	45	30	30	32	27
Sêmea de Trigo	20	18	18	18	17
Farinha de Carne	28	32	30	34	34
Farinha de Aves	3	10	10	10	13
Farinha de Peixe	-	0,7	0,7	-	-
Palatibilizante	-	2	2,7	-	2
Polpa de Beterraba	2	0,7	0,7	1	1
Gordura de Aves	1	3	4	3	4
Sal	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Aditivos	0,4	3	3,3	1,4	1,4

A tabela 9 indica a composição química dos diferentes alimentos, estes valores correspondem às percentagens declaradas nos rótulos.

Os diferentes alimentos estudados podem ser caracterizados principalmente segundo o seu teor em proteína bruta e gordura bruta. O fato dos alimentos apresentarem diferentes teores de proteína bruta deve-se a estes serem destinados a diferentes animais de companhia ou a diferentes faixas etárias, como por exemplo: os alimentos Manutenção e Manutenção Mix são destinados a cães adultos num regime de alimentação de manutenção, enquanto que o alimento Cachorros, destina-se a cães jovens que ainda se encontram em fase de crescimento e o alimento para Gatos destinado aos felinos. Temos ainda os

alimentos Alta Energia e Alta Energia Extra caracterizados por apresentarem teores de gordura e proteína mais elevados.

Tabela 9 Caracterização química de vários alimentos Pet Food. (% Declaradas no rótulo).

	Proteína Bruta	Fibra Bruta	Gordura Bruta	Cinza Bruta
Manutenção	22	4	8	10
Manutenção Mix	22	4	8	10
Cachorros	29	3	11	12
Alta Energia	27	3,5	12	12
Alta Energia Extra	32	3,5	15	12
Gatos	28	3	12	11

A determinação da composição química das amostras dos diferentes alimentos utilizados neste trabalho foi realizada utilizando o NIRSystems 5000, com a característica de operar em toda a gama de comprimentos de onda do infravermelho próximo e uma célula de análise retangular. (Figura 7)



Figura 7 NirSystems 5000 e célula de análise retangular utilizados para análise de alimentos Pet Food.

Os pré-tratamentos mais utilizados para a construção das retas foram: derivadas, SNV e de-trending. O método de regressão normalmente utilizado corresponde ao MPLS –

regressão por mínimos quadrados parcial modificado. Os parâmetros utilizados para avaliar a calibração foram o coeficiente de correlação múltipla (RSQ) e o erro padrão de calibração (SEC). De forma a avaliar a capacidade da técnica NIR em prever a composição química de amostras desconhecidas, a validação escolhida para este fim foi a validação cruzada, onde foram utilizados os valores do coeficiente de determinação (R^2) e o erro padrão da calibração cruzada (SECV) de modo a avaliar a técnica NIR.

Foi construído, em Excel, um gráfico com 189 espectros NIR (figura 10), com a informação das absorções de amostras Pet Food analisadas, fornecidas pelo Master Lab da Trouw Nutricion.

Pelo espectro apresentado é visível a recolha de absorções a partir dos 1100 nm até perto dos 2500 nm. Comparando com os valores do ponto 1.5.3.1., que aborda as zonas de absorção características, foi possível assinalar no espectro algumas dessas zonas. As zonas assinaladas com a cor vermelha fazem referência às zonas de absorção da proteína, as zonas a verde fazem referência às zonas de absorção da fibra e a amarelo estão assinaladas as zonas absorção características da gordura. Na tabela 10 estão representados os valores dos comprimentos de onda associados às zonas de absorção identificadas na figura 8.

São ainda observadas outras zonas de absorção não identificadas, associadas a outras zonas como as zonas características da humidade que não são abordadas neste trabalho.

Espectros de Absorção PetFood

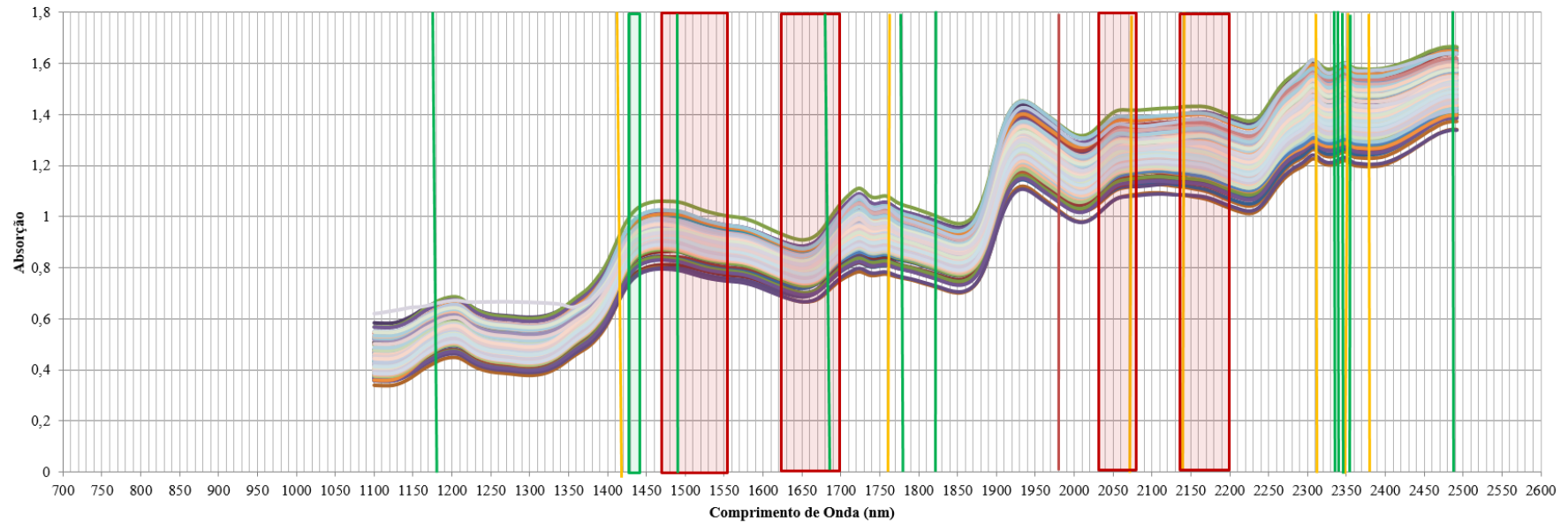


Figura 8 Espectros de absorção de alimentos PetFood e zonas características.

Tabela 10 Zonas características observadas no espectro de absorção dos alimentos Pet Food. (Adaptado de Alomar et al., 2006; Workman 2006)

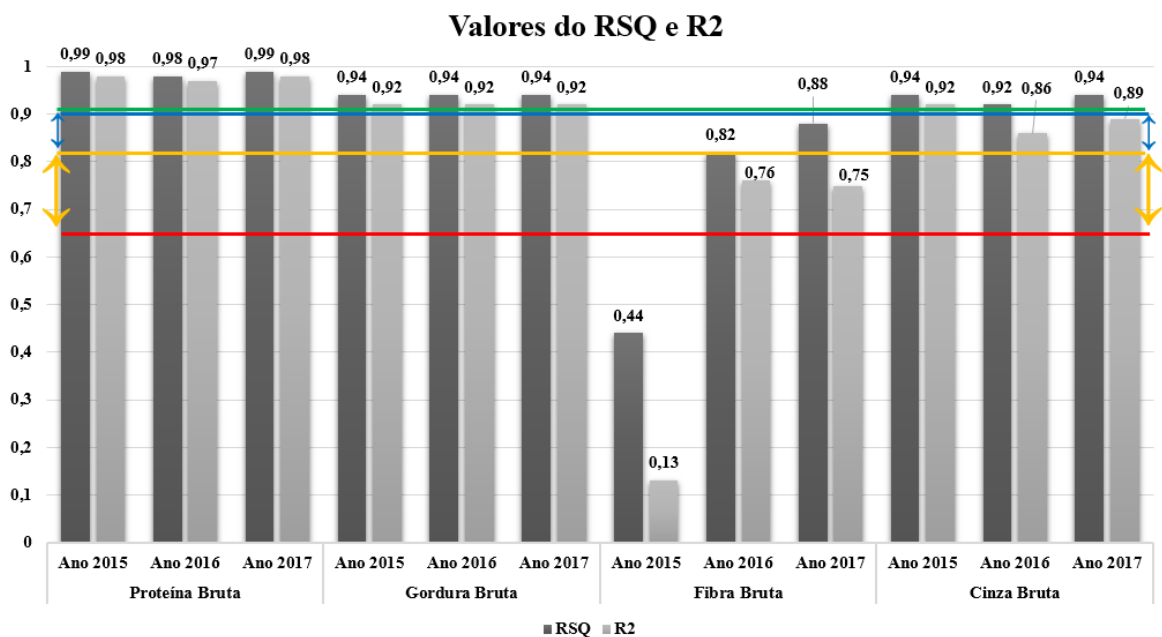
	Zona de Absorção Característica
Proteína (cor vermelha)	1480-1550 nm; 1620-1700 nm; 1980 nm; 2030-2080 nm; 2148-2200 nm
Fibra (cor verde)	1170 nm; 1410-1420 nm; 1417-1440 nm; 1490 nm; 1685 nm; 1780 nm; 1820 nm; 2335 nm; 2340 nm; 2347 nm; 2352 nm; 2488 nm
Gordura (cor amarela)	1415 nm; 1760 nm; 2070 nm; 2140 nm; 2310 nm; 2346 nm; 2380 nm

3. Resultados e Discussão

3.1. Valores de Calibração e Validação da Reta Pet Food

Com os valores fornecidos pelo MasterLab da Trouw Nutricion foi possível construir gráficos de barras com os valores do coeficiente de correlação múltipla (RSQ), os valores do coeficiente de determinação (R^2), os valores do erro padrão de calibração (SEC) e os valores do erro padrão da validação cruzada (SECV). Os valores do RSQ e SEC referem-se aos parâmetros utilizados para avaliar a calibração e os valores do R^2 e SECV referem-se aos parâmetros utilizados para avaliar a validação cruzada. Com estes gráficos é possível ter uma melhor visão das alterações dos valores de RSQ e R^2 que ocorreram ao longo dos anos (2015, 2016 e 2017) para cada parâmetro (proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta) e as diferenças entre os valores obtidos para as calibrações e para as validações cruzadas (SEC e SECV).

É importante realçar que o RSQ pode ser analisado da mesma forma que o R^2 . A figura 9 apresenta os gráficos de barras construídos para o RSQ e para o R^2 . Estes valores podem variar entre 0 e 1, não tendo nenhuma unidade de medida associada sendo que valores acima de 0,91 demonstram que o NIR apresenta uma previsão excelente dos parâmetros. Já valores entre 0,82 e 0,90 demonstram que o NIR apresenta uma capacidade de previsão boa dos parâmetros. Por outro lado, valores entre 0,66 e 0,81 demonstram que o NIR apresenta uma capacidade de previsão moderadamente bem-sucedida e valores inferiores a 0,65 representa que a técnica NIR não apresenta capacidade de determinar os parâmetros com exatidão. (Lequeue *et al.*, 2016; Sun 2008)



Legenda:

- Valores >0,91 previsão excelente
- Valores entre 0,82 e 0,90 previsão boa
- Valores entre 0,66 e 0,81 previsão moderada
- Valores < 0,65 não apresenta capacidade de previsão

Adaptado de (Lequeue *et al.*, 2016; Sun 2008)

Figura 9 Valores do coeficiente de correlação múltipla e do coeficiente de determinação, utilizados para avaliar a calibração e a validação cruzada.

Numa primeira análise à figura 9 é possível visualizar que os valores não se mantêm entre a calibração e a validação cruzada, daí a necessidade da realização de uma validação de modo a verificar a real capacidade das retas de calibração desenvolvidas em prever os parâmetros pretendidos. Apesar de serem visíveis alterações, existem parâmetros, como no caso da proteína bruta e da gordura bruta que demonstram alterações pouco significativas.

Focando nos valores do RSQ, pelo gráfico é possível verificar que este se encontra muito próximo do valor máximo em ambos os anos, para os parâmetros de fibra bruta, gordura bruta e cinza bruta. Estes valores ao apresentarem um valor superior a 0,91 indica que, comparando aos valores previstos pelo NIR aos valores determinados pelo método de

referência, a técnica NIR apresentou uma capacidade excelente em prever estes parâmetros.

A fibra bruta foi o parâmetro que apresentou um valor de RSQ mais pequeno, tendo apresentado um valor muito baixo em 2015 de 0,13. Em 2016, aumentou para 0,82 e em 2017 apresentou um valor de RSQ igual a 0,88. Isto indica que os resultados obtidos pela técnica NIR sofreram uma grande melhoria desde 2015 conseguindo neste momento prever com uma exatidão boa a fibra bruta.

Analisando agora cada parâmetro químico, em termos dos valores do coeficiente de determinação (R^2), valor este referente à validação cruzada, é possível dizer que a proteína bruta foi o parâmetro que desde o ano de 2015 teve o valor mais alto de R^2 (valores superiores a 0,97). Demonstra que a técnica NIR apresentou desde 2015 uma capacidade excelente de previsão deste parâmetro.

A gordura bruta foi o único parâmetro químico onde não foram visíveis variações desde 2015. No entanto, a não visualização da melhoria deste parâmetro não afeta em nada a capacidade da técnica NIR em prever este parâmetro, uma vez que este apresenta um valor de R^2 superior a 0,92 indicando que para este parâmetro a técnica NIR também apresenta uma capacidade excelente de previsão.

Analisando os valores do R^2 para a cinza bruta, esta teve um valor maior no ano 2015 tendo baixado em 2017 para um R^2 igual a 0,89. Apesar deste parâmetro ter apresentado um valor de R^2 mais baixo que os apresentados anteriormente, esta técnica apresenta uma boa capacidade de previsão para este parâmetro.

Já a fibra bruta foi o parâmetro químico com a maior evolução desde 2015. Pelo gráfico podemos visualizar que no ano de 2015 o R^2 foi de apenas de 0,13, passando para 0,76 no ano de 2016 e baixando ligeiramente no ano de 2017 para um R^2 igual a 0,75. De fato, a fibra bruta foi o parâmetro químico que apresentou valores mais baixos de R^2 . No entanto ao encontrar-se entre os valores de 0,66 e 0,81 é possível considerar que a técnica NIR apresenta uma capacidade moderadamente bem-sucedida na determinação deste parâmetro.

Se compararmos com os valores do R^2 dos estudos realizados por Alomar *et al.*, (2006) e De Marchi *et al.*, (2016) apresentados no ponto 1.7.2. deste trabalho, com os valores de R^2 para o ano de 2017 (ano atual) aqui apresentados é possível dizer que a capacidade de previsão dos parâmetros GB e CB foram melhores para as retas de

calibração da Ovargado. A FB continua a ser o parâmetro que apresentou uma capacidade de previsão mais baixa.

No geral é possível referir que a técnica NIR apresenta uma ótima capacidade de previsão, sendo que a reta de calibração construída para a fibra bruta pode ainda ser melhorada, de modo a que a capacidade de previsão para este parâmetro seja melhor.

A figura 10 representa os valores do erro padrão de calibração e do erro padrão da validação cruzada obtidos para as calibrações e para as validações cruzadas. Pretende-se que os valores destes erros sejam os mais reduzidos possíveis, apresentando valores o mais próximo possível dos erros dos métodos de referência. Os valores aqui apresentados foram considerados os valores mais baixos obtidos para estas calibrações e como se pode ver pela figura os erros foram todos inferiores a 1%, tanto na calibração como na validação cruzada.

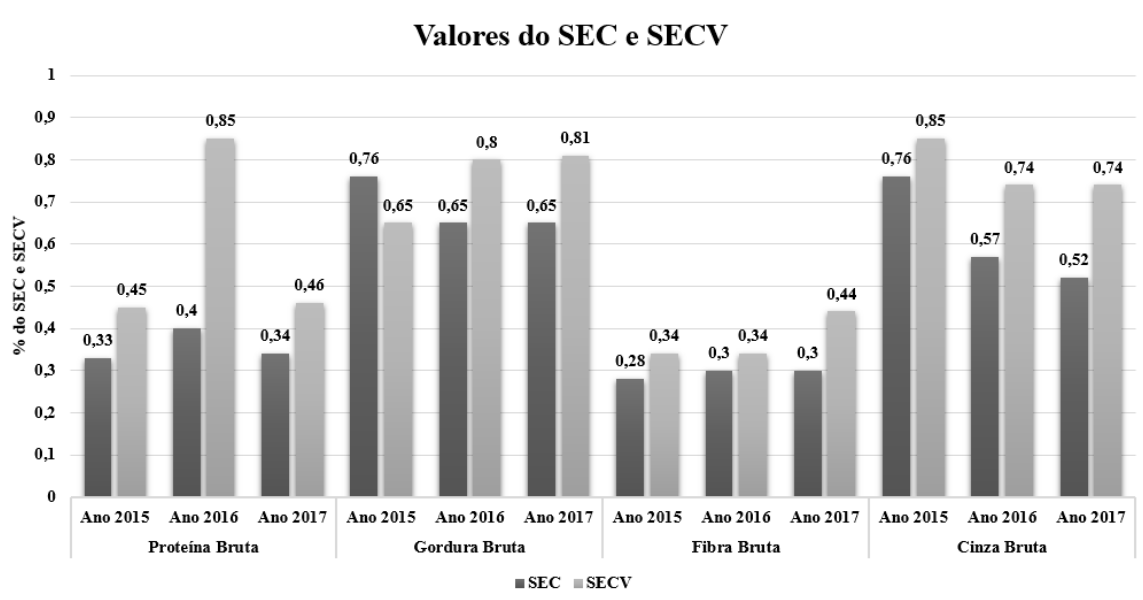


Figura 10 Valores do erro padrão de calibração e do erro padrão da validação cruzada obtidos para as retas de calibração e para as validações cruzadas dos parâmetros em estudo.

Ao contrário do que ocorreu aos valores apresentados do RSQ e do R^2 , os valores do SEC (parâmetro que se refere à calibração) são menores comparativamente aos valores obtidos para o SECV (parâmetro que se refere à validação cruzada). Assim sendo, foram obtidos erros maiores nas validações cruzadas.

O valor de SEC que diz respeito ao erro existente entre os valores previstos pelo NIR com os valores determinados pelos métodos de referência no geral (ao longo dos três anos)

apresentou valores mais baixos para a proteína bruta e para a fibra bruta, tendo sido conseguidos valores de SEC no ano de 2017 de 0,34 e 0,3 para os respectivos parâmetros.

A gordura bruta foi o parâmetro onde se obteve um valor de SEC maior em comparação com os restantes parâmetros, apresentando em 2017 um valor de SEC de 0,65.

A cinza bruta foi o segundo parâmetro com um SEC mais alto, apresentando no ano de 2017 um valor de 0,52, tendo sido o valor mais baixo obtido ao longo dos três anos para este parâmetro.

De seguida vão ser discutidos os valores obtidos para a validação cruzada de modo a ver a melhoria existente ao longo dos três anos. Estes vão ser comparados com os estudos descritos no ponto 1.6.4.1. deste trabalho.

A proteína bruta sofreu alterações ao longo dos três anos em estudo, tendo apresentado um valor de SECV maior, igual a 0,85 no ano de 2016. No entanto esse valor sofreu uma redução em 2017, apresentando de momento um valor de SECV igual a 0,46.

Para os valores do SECV para a gordura bruta foi visível uma maior mudança do ano de 2015 para o ano 2016 sofrendo um aumento de um SECV de 0,65 para um SECV de 0,80 e 0,81 (ano 2016 e 2017).

A fibra bruta obteve o mesmo valor de SECV para os anos de 2015 e 2016 (SECV=0,34) havendo um pequeno aumento para o ano de 2017 que apresentou um SECV de 0,44.

A cinza bruta apresenta uma diminuição do valor do SECV do ano 2015 para o ano 2016, mantendo-se com o mesmo valor no ano 2017 (SECV=0,74).

Em comparação com os estudos apresentados por Alomar *et al.*, (2006) e De Marchi *et al.*, (2016) apenas foram obtidos valores mais baixos de SECV para os parâmetros proteína bruta e gordura bruta. Em que os estudos apresentaram um SECV de 0,5 e 0,66 para a proteína bruta enquanto que a validação cruzada realizada para a reta da Ovargado apresentou um valor de 0,46. Os valores de SECV para a determinação da gordura bruta nos estudos foram de 1,24 e 1,01 valores estes superiores ao da validação cruzada da reta da Ovargado para o mesmo parâmetro (SECV=0,81).

É importante referir que o equipamento utilizado para desenvolver a reta de calibração dos alimentos Pet Food não é o mesmo utilizado para realizar as análises diárias na Ovargado. Tendo isto em conta, as variações visíveis existentes entre os critérios podem ser influenciadas pela diferença de equipamentos (diferenças provocadas pela resposta do

equipamento), entre outros fatores: mudanças na constituição física ou química das amostras e mudanças de ambiente. As diferenças provocadas pelas mudanças da composição física ou química da amostra podem ser influenciadas devido a variações do tamanho da partícula ou da textura da amostra e ainda das matérias-primas utilizadas, que podem ocorrer entre lotes, já as diferenças provocadas pela resposta do instrumento podem ocorrer quando os dados previstos são determinados num instrumento diferente daquele usado para realizar a calibração, a substituição de partes do instrumento ou o envelhecimento destas, pode também contribuir para essas diferenças. As mudanças de ambiente também podem induzir alterações nos espectros, uma vez que não é efetuado a subtração do background que iria diminuir o ruído provocado pelo ambiente, as variações de temperatura e humidade podem ter uma forte influência nos valores medidos, causando mudanças nas bandas de absorção e não-linearidades nas intensidades de absorção dos espectros. (Feudale *et al.*, 2002)

Tendo em conta os erros de SECV escolhidos como sendo os mais baixos e tendo em conta os coeficientes de determinação (R^2), pode-se dizer que as retas de calibração desenvolvidas para a determinação de proteína bruta, gordura bruta e cinza bruta conseguem determinar de forma precisa, assim como conseguem determinar a fibra bruta.

3.2. Intervalo de Valores de maior previsão das retas de calibração

Para além de terem sido fornecidos os valores referentes à calibração e à validação cruzada, foram também fornecidos intervalos de valores, estipulados para cada parâmetro, em que a técnica NIR consegue prever com exatidão. A tabela 11 apresenta os intervalos de valores estipulados para cada parâmetro ao longo dos três anos.

Tabela 11 Informação do intervalo de valores que a técnica NIR consegue prever com exatidão.

		Intervalo de Valores		
		Média	Mínimo	Máximo
2015	PB	27,91	17,63	38,20
	GB	13,33	3,64	23,02
	FB	1,85	0,71	2,98
	CB	13,33	3,64	23,02
2016	PB	28,30	17,89	38,71
	GB	13,08	4,32	21,85
	FB	2,20	0,0064	4,40
	CB	9,17	2,98	15,37
2017	PB	27,30	14,63	39,97
	GB	13,09	4,32	21,85
	FB	2,78	0,10	5,47
	CB	10,00	3,19	16,81

Estes intervalos são determinados pelos responsáveis que desenvolvem a reta de calibração. Após ser realizada a validação estes verificam quais os valores que obtiveram melhores resultados de previsão, e assim são estipulados os intervalos de valores que a técnica NIR consegue prever com maior exatidão. Pela análise desta tabela podemos verificar que os intervalos de valores não são contantes ao longo dos três anos, isto acontece devido aos ajustes que a reta vai sofrendo.

Sabendo a informação dos valores da composição química declarados nos rótulos, dos diferentes alimentos e o intervalo de valores que o NIR consegue determinar com exatidão, foi possível construir gráficos comparativos, distintos para cada parâmetro, de modo a visualizar com maior facilidade se os intervalos de valores definidos abrangem os valores declarados nos rótulos e as variações toleradas pelo regulamento.

As figuras 13, 14, 15 e 16 apresentam os gráficos construídos para cada parâmetro. Nos gráficos estão presentes os valores rotulados para cada alimento e os limites mínimos e máximos apresentados na tabela 11. Apenas foram construídos gráficos com os intervalos de valores definidos para o ano de 2017.

A figura 11 representa o gráfico construído para a proteína bruta. As linhas representadas nos gráficos a amarelo e a verde, correspondem aos valores do limite mínimo e máximo estipulados como sendo o intervalo de valores de maior exatidão pela técnica NIR. Os pontos representados a verde e a vermelho fazem referência ao valor mínimo tolerável e ao valor máximo tolerável estipulado pela legislação, quando o valor estipulado no rótulo (assinalado com o ponto laranja) sofre alguma variação.

Pela análise do gráfico, os alimentos demonstrados apresentam percentagens diferentes de proteína bruta e limites toleráveis diferentes. Pela figura 11 é visível que, todos os valores se encontram dentro do intervalo de valores definidos como exatos, em todos os alimentos Pet Food analisados.

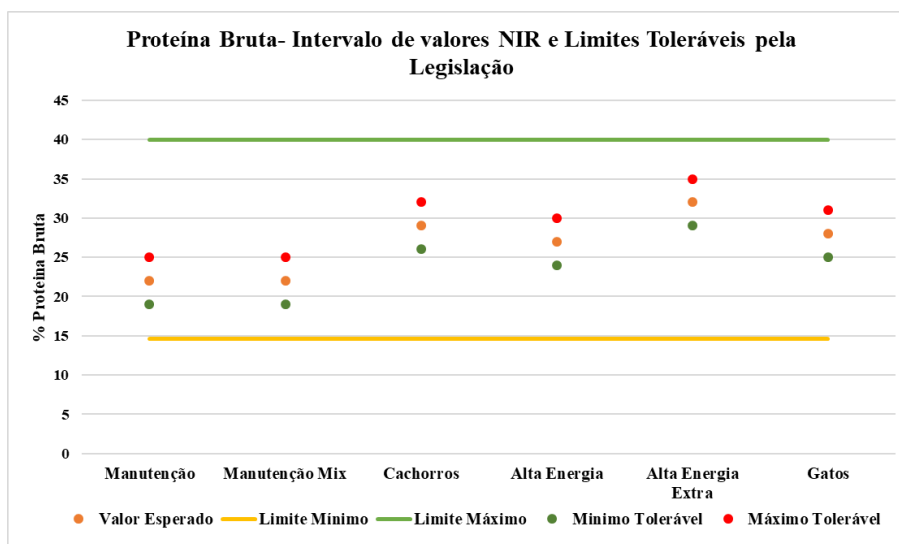


Figura 11 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a proteína bruta.

Na figura 12 podemos visualizar o intervalo de valores do NIR definidos para a gordura bruta. Tal como para a proteína bruta, também o intervalo de valores definidos como exatos abrangem todos os valores toleráveis de gordura bruta em todos os alimentos.

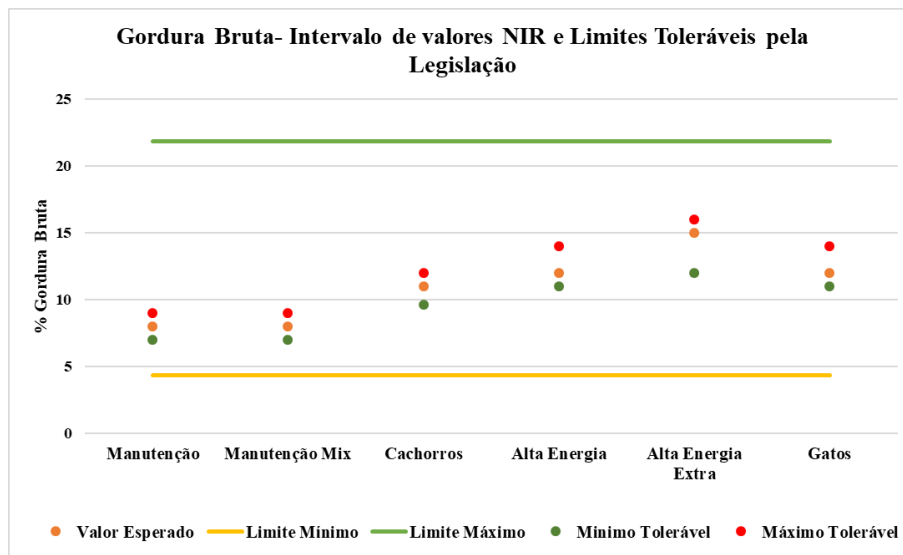


Figura 12 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a gordura bruta.

Quanto aos limites exatos estipulados para a fibra bruta, pela figura 13 é possível visualizar que os limites máximos toleráveis pelo regulamento para os alimentos manutenção e manutenção mix, se encontram fora. Neste caso é necessário ter especial atenção durante a análise destes alimentos, uma vez que se houver algum alimento com um valor de fibra bruta estipulado pelo NIR, perto do limite máximo tolerável por lei poderá não ter uma determinação exata.

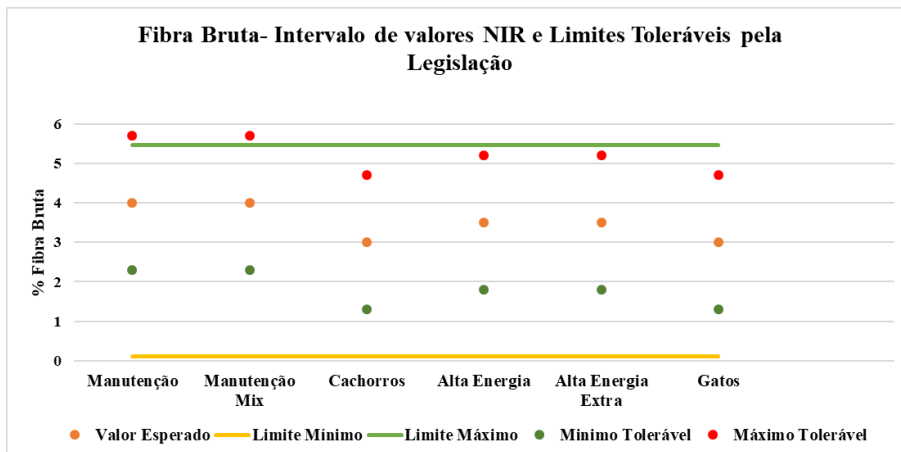


Figura 13 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a fibra bruta.

Relativamente aos limites referentes à cinza bruta, pela análise da figura 14 é possível visualizar que todos os valores, para todos os alimentos, se encontram dentro dos limites considerados exatos.

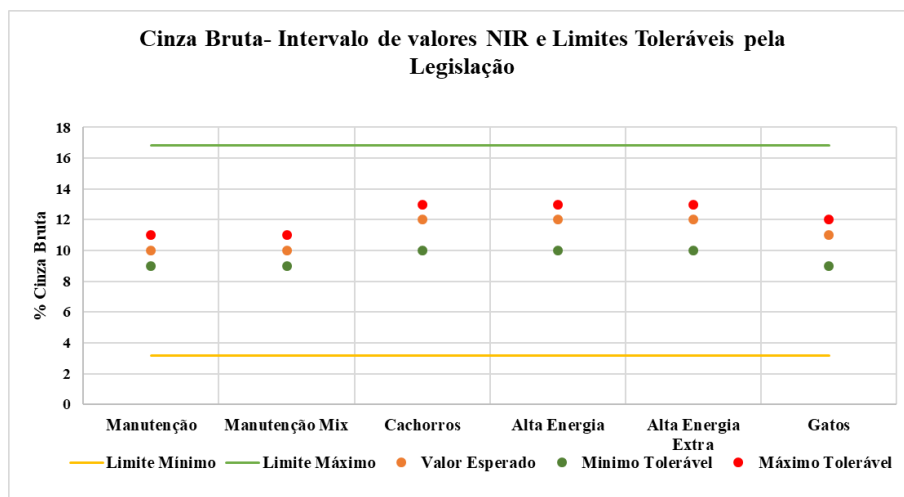


Figura 14 Gráfico comparativo do Intervalo de valor de exatidão do NIR e os limites toleráveis pela legislação para a cinza bruta.

Durante as análises realizadas diariamente na Ovargado S.A. pode acontecer que a determinação indicada pelo NIR se encontre fora destes intervalos de exatidão. Caso aconteça, o valor irá ser assinalado no final da análise. (Figura 15)

Os valores de Low Action fazem referência ao valor mínimo e os valores do High Action fazem referência ao valor máximo estipulado.

Parameter	Result	Low Action	High Action	Global H	Neigh H	T Statistic
Humedad	9,09	5,50	9,00	0,98	0,82	1,29
Proteína B...	20,72	20,50	35,00	0,98	0,82	-1,56
Cenizas	9,10	6,00	14,00	0,98	0,82	-0,40
Fibra Bruta	3,32	1,40	3,70	0,98	0,82	0,60
Almidón	36,11	21,00	46,00	0,98	0,82	0,50
Calcio	2,65	1,30	4,30	0,98	0,82	-0,10
Fósforo	1,56	0,80	2,20	0,98	0,82	0,13
Grasa Hidr...	8,71	9,00	21,00	0,98	0,82	-1,50
Acidez Sulf...	0,15	0,07	0,41	0,98	0,82	-0,60
Almidon sol...	84,58	0,00	0,00			

Figura 15 Resultado fora dos limites estipulados.

Nestas ocasiões a determinação desse parâmetro não é garantida, sendo necessário confirmar através das análises laboratoriais o parâmetro e caso se justifique adicionar esses valores à calibração.

A existência destes intervalos de valores torna-se uma informação importante, deste modo é possível saber se o valor determinado é realmente o mais exato possível.

3.3. Avaliação dos parâmetros nutricionais através de análises externas

Este tópico faz parte da segunda parte do trabalho, em que vão ser comparados os valores determinados pela técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) com as respetivas análises determinadas pelo laboratório externo. Foram construídos gráficos de dispersão e foram avaliadas as diferenças existentes entre os dois métodos de análise, para deste modo verificar se essas diferenças são consideradas significativas.

As percentagens de incerteza das metodologias utilizadas pelo laboratório externo encontram-se representadas na tabela 12. Os valores destacados indicam qual a percentagem de concentração em que se inserem os alimentos Pet Food estudados.

Tabela 12 Percentagens de incerteza dos métodos utilizados para a determinação dos parâmetros químicos pelo laboratório externo.

Parâmetro	Concentração %/100g	% Incerteza
Proteína Bruta	0,5 a 3,0	10
	3,1 a 10	9
	10,1 a 40,0	4
	>40,1	1
Gordura Bruta	10	10
Fibra Bruta	<6	10
	≥6	6
Cinza Bruta	≤15	3
	>15	2

3.3.1. Comparação dos valores obtidos por NIR com análises externas

Os gráficos de dispersão desenvolvidos para cada ano comparam a dispersão existente entre os dois tipos de análise de modo a verificar o grau de relação entre eles, para todos os parâmetros em estudo. Na construção dos gráficos foram eliminados alguns *outliers*, estes foram eliminados tendo em conta a existência de valores fora das zonas de maior densidade, uma vez que esses valores eram muito diferentes entre os métodos de análise. Os gráficos de dispersão da proteína bruta foram os únicos em que não foram retirados *outliers*.

Nos gráficos de dispersão são ainda visíveis dois limites assinalados com uma linha verde e uma linha amarela, com o objetivo de representar os intervalos de valores que o NIR consegue prever com exatidão, sendo que a linha de cor verde se refere ao valor máximo e a linha amarela ao valor mínimo.

Pela análise dos gráficos das figuras 16, 17 e 18 é possível verificar que a dispersão existente nos anos indicados para a determinação da proteína bruta, é baixa. No entanto,

apesar da dispersão ser baixa em 2015 ($R^2= 0,84$), ao longo dos anos foi possível observar a sua diminuição, tendo sido observados valores mais baixos no ano 2017 ($R^2= 0,97$). Indicando que as diferenças existentes das determinações do NIR e os resultados obtidos em laboratório externo foram diminuindo. O ano 2017 foi o ano que apresentou dispersões mais baixas para a determinação da proteína bruta.

Nos gráficos é possível visualizar ainda dois *clusters* com uma maior densidade de resultados. Em 2015 os *clusters* visíveis encontram-se principalmente entre os 19 e 21%, para as análises externas e entre os 20-23% para as análises realizadas pelo NIR. Estes valores representam os valores de proteína bruta para os alimentos manutenção e manutenção mix. E entre os 27 e 32%, para as análises externas e entre 26-33% para as análises realizadas pelo NIR, este *cluster* representa os restantes alimentos, que apresentam percentagens de proteína bruta superiores (cachorros, alta energia, alta energia extra e gatos).

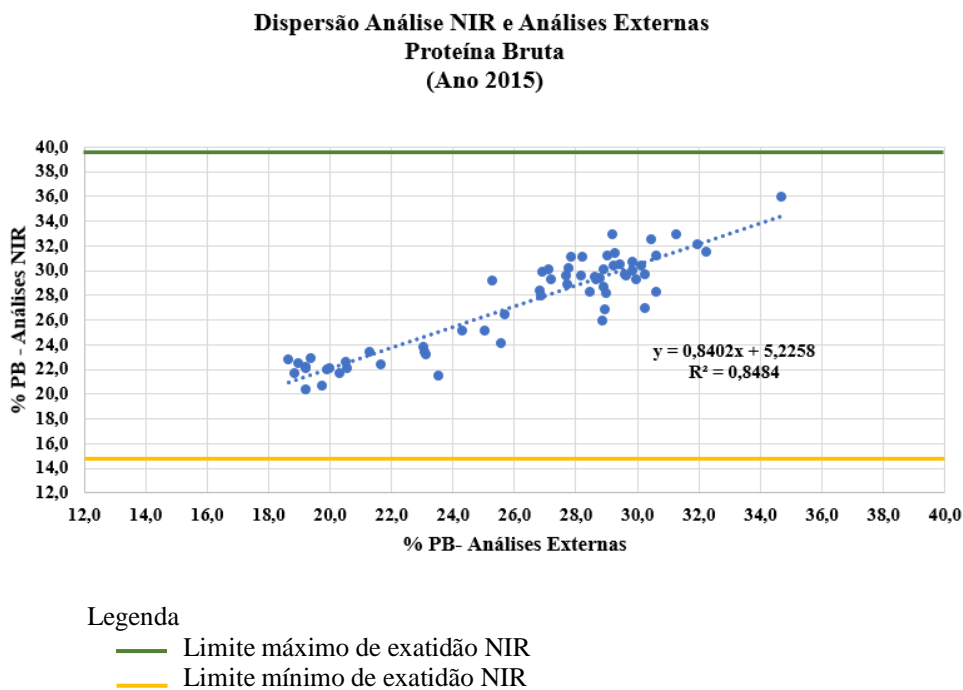


Figura 16 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a proteína bruta em 2015.

Em 2016 são também visíveis dois *clusters*, entre 21 a 25 % para as análises externas e perto dos 20% até os 25% para as análises NIR e ainda, entre 27 a 34% e 25-34% para as

análises externas e análises NIR respetivamente. Estes correspondem aos mesmos alimentos descritos no ano anterior. Neste caso a existência de pontos fora dos *clusters* é mais reduzida, comparativamente ao ano anterior, indicando que os alimentos tendem a ter os valores compreendidos nesses mesmos *clusters*, não havendo grandes variações entre cada lote analisado, por ambas as análises.

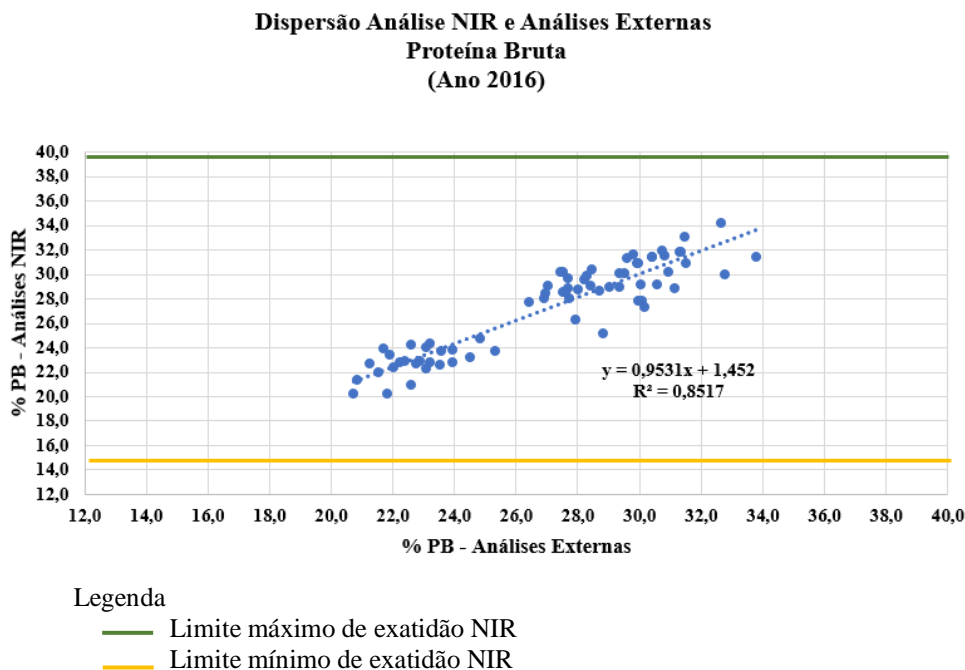


Figura 17 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a proteína bruta em 2016.

No gráfico da figura 18, referente ao ano 2017, os *clusters* distintos encontram-se entre 20 a 23% e entre 27 a 32%, para ambas as análises, demonstrando que ambos os tipos de análise apresentaram valores dentro destes intervalos.

Entre os *clusters* não são visíveis pontos, indicando que os valores de ambas as análises tendem a encontrar-se dentro destes mesmos *clusters*, demonstrando que a percentagem de proteína nos alimentos estudados não se dispersa muito para além dos valores presentes nos *clusters*.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Proteína Bruta
(Ano 2017)**

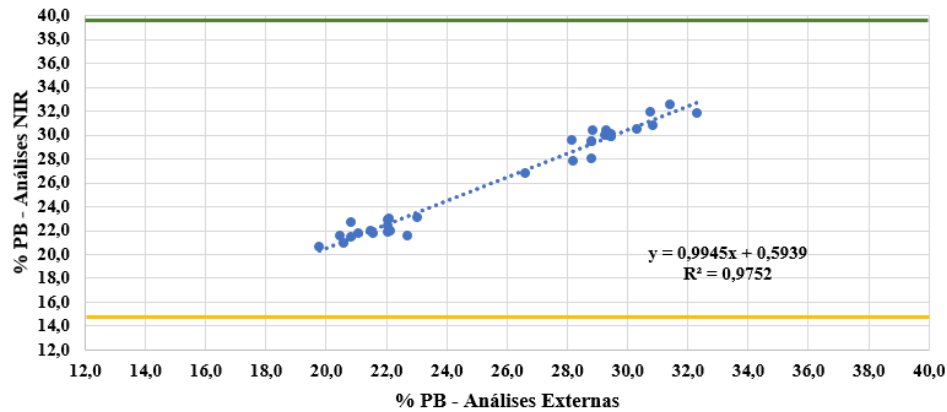


Figura 18 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a proteína bruta em 2017.

Os gráficos demonstram que em alguns casos o NIR apresenta valores superiores de proteína bruta comparativamente à análise externa e vice-versa. No entanto os valores determinados pelo NIR encontram-se todos dentro dos limites estipulados como exatos, assim como o valor de R^2 indica que não existe grande dispersão entre os resultados de ambos os métodos.

Da análise dos gráficos das figuras 19, 20 e 21 é possível visualizar uma maior dispersão entre os valores determinados para a gordura bruta pelo NIR e pelo as análises externas, quando comparando com a dispersão dos resultados fornecidos pela empresa fornecedora da calibração do NIR.

As figuras 19 e 20 demonstram a existência de uma maior dispersão para a determinação da gordura bruta, do que para a determinação da proteína bruta. No entanto, a dispersão existente sofreu grandes alterações para o ano 2017, onde é possível observar uma melhoria entre a dispersão de resultados das análises ($R^2 = 0,81$). (figura 21) O que nos indica uma maior proximidade entre os valores determinados pelo NIR com os determinados pelos métodos de laboratório.

No ano 2015 são visíveis dois *clusters* para percentagens de gordura inferiores a 10% (alimentos manutenção e manutenção mix) e percentagem de gordura superiores a 10% até 14% (alimentos para cachorros, alta energia, alta energia extra e gatos) para as análises externas, tendo o valor máximo de gordura nas análises NIR no *cluster* referente a percentagens superiores a 10% ter chegado a 17%. Dentro desses *clusters* são visíveis algumas dispersões como nos indica o valor do R^2 , sendo visíveis dispersões maiores para os teores de gordura superiores a 10%.

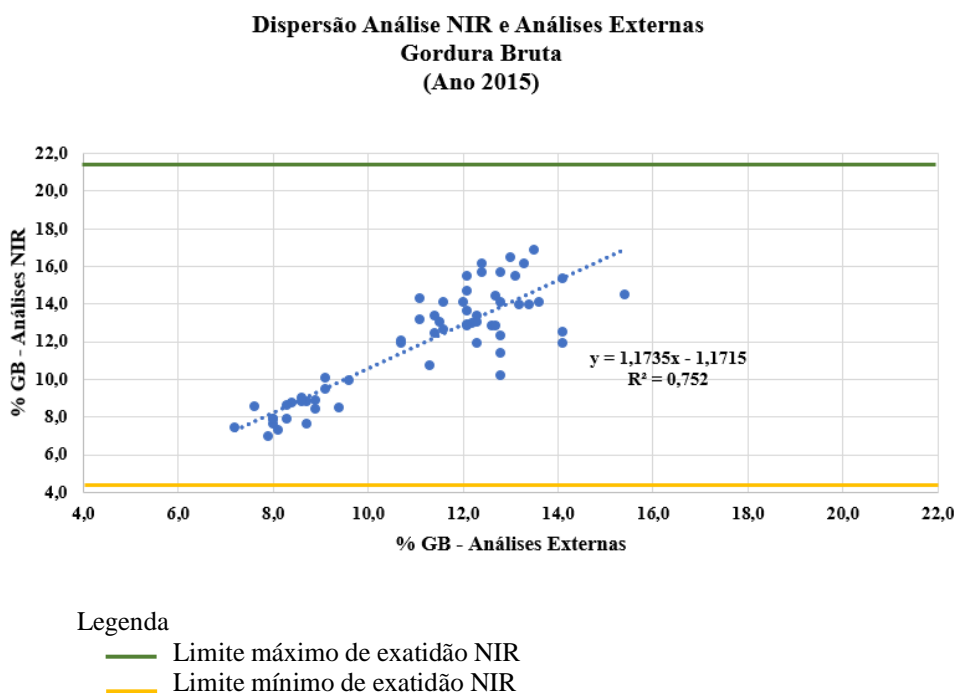
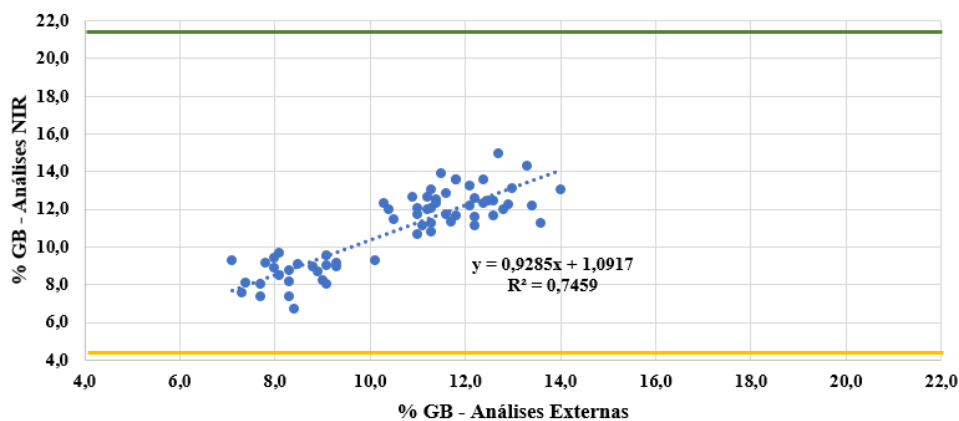


Figura 19 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a gordura bruta em 2015.

Os *clusters* visíveis na figura 20, para o ano 2016, são idênticos aos do gráfico anterior. É possível visualizar um *cluster* para valores inferiores a 10% de gordura bruta e um *cluster* para valores superiores a 10% tendo chegado a um valor máximo de gordura de 14% para as análises externas e 15% para as análises NIR. São visíveis algumas dispersões, assim como no gráfico anterior, no entanto, apesar do R^2 ser ligeiramente inferior, no *cluster* referente à gordura superior a 10% a dispersão pareceu diminuir.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Gordura Bruta
(Ano 2016)**



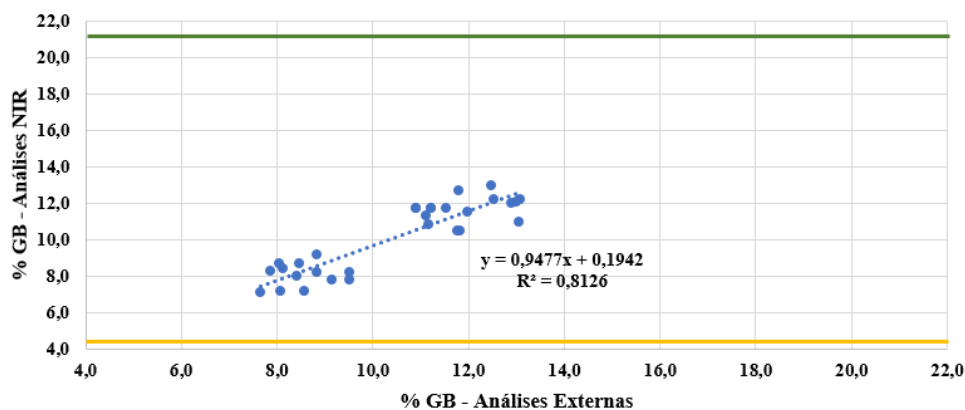
Legenda

- Limite máximo de exatidão NIR
- Limite mínimo de exatidão NIR

Figura 20 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a gordura bruta em 2016.

No gráfico 21, são também visíveis dois *clusters*, com as mesmas características dos anteriores (valores inferiores a 10% e valores superiores a 10%), em ambas as análises o valor máximo determinado por ambas as análises foi de 13%. O que diferencia este gráfico dos anteriores, para além de apresentar uma menor dispersão entre os resultados ($R^2 = 0,81$) é a não existência de valores entre estes *clusters*, demonstrando, portanto, que os valores determinados por ambos os métodos se encontram compreendidos dentro dos valores desses *clusters*, não havendo assim grande dispersão destes valores de maior densidade.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Gordura Bruta
(Ano 2017)**



- Legenda
- Limite máximo de exatidão NIR
 - Limite mínimo de exatidão NIR

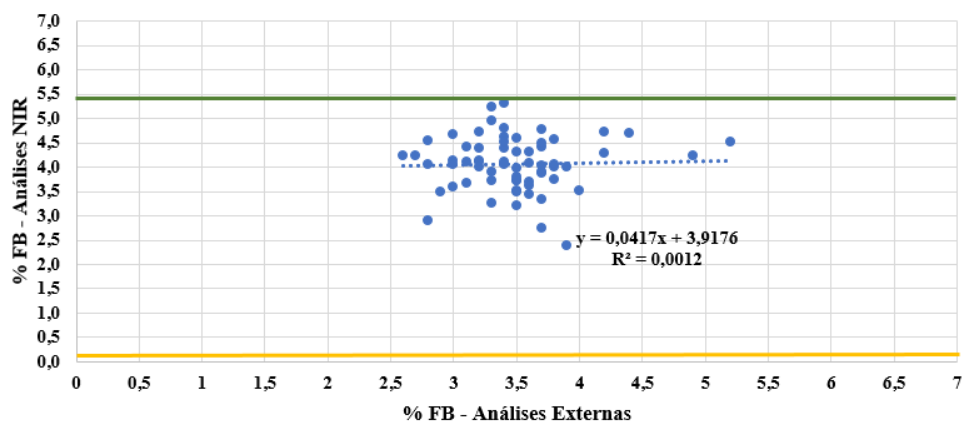
Figura 21 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a gordura bruta em 2017.

É visível alguns casos em que os valores obtidos pelo NIR na determinação da gordura bruta foram superiores ou inferiores aos valores obtidos pelas análises externas. Todos os valores determinados pelo NIR encontram-se dentro do intervalo de valores estipulados como exatos, portanto, os valores apresentados pelo NIR podem ser tomados como exatos.

As figuras 22, 23 e 24 representam a dispersão existente na determinação da fibra bruta pelo NIR comparativamente às análises externas. Pela sua análise é visível uma dispersão considerável entre os métodos de análise. Estas figuras demonstram uma elevada dispersão e ausência total de correlação entre os resultados obtidos por NIR e análises externas, principalmente para os anos 2015 ($R^2 = 0,0012$) e 2016 ($R^2 = 0,03$). Tendo sofrido melhorias no ano 2017 ($R^2 = 0,16$), no entanto, continua a apresentar dispersões elevadas. Indicando diferenças entre os valores determinados pelo NIR e os determinados pelas análises externas.

Nos gráficos que representam os anos 2015 e 2016 (imagens 22 e 23) só é possível visualizar um *cluster* entre os 2,5 e 4% para as análises externas e 2,5 – 5,5% para as análises NIR no ano 2015 e perto dos 3 a 4,5% nas análises externas e 2 a 5% para as análises NIR no ano 2016.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Fibra Bruta
(Ano 2015)**

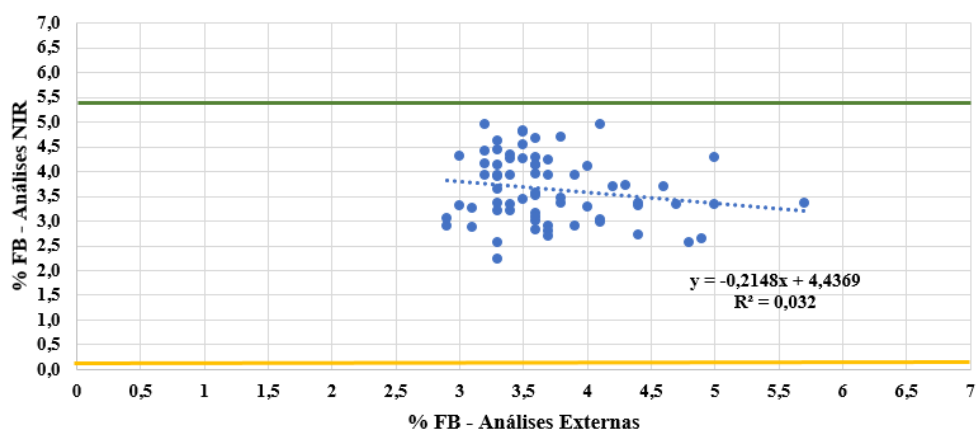


Legenda

- Limite máximo de exatidão NIR
- Limite mínimo de exatidão NIR

Figura 22 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a fibra bruta em 2015.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Fibra Bruta
(Ano 2016)**



Legenda

- Limite máximo de exatidão NIR
- Limite mínimo de exatidão NIR

Figura 23 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a fibra bruta em 2016.

O ano 2017 apresenta, assim como os anos anteriores, apenas um *cluster*. É visível uma densidade de valores entre os 2,9 a 4,8% para as análises externas e entre 2,7 até os 3,4% para as análises NIR.

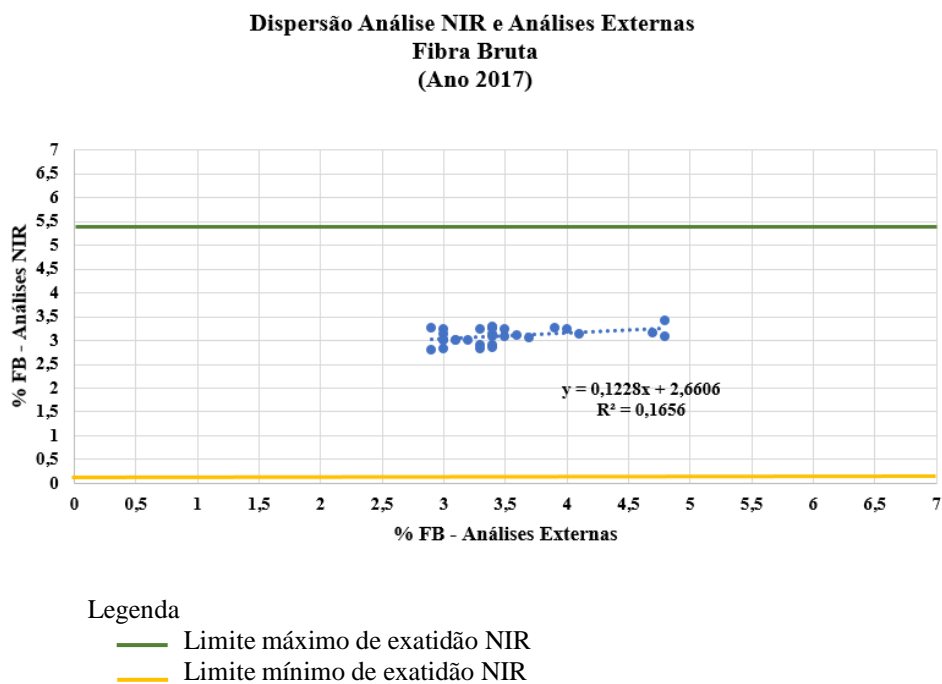


Figura 24 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a fibra bruta em 2017.

Os gráficos de dispersão construídos para a fibra bruta demonstram que existe uma grande dispersão de resultados entre os dois métodos de análise, existindo algumas determinações do NIR com valores inferiores quando comparados com as análises externas. Os valores obtidos para a determinação deste parâmetro pelo NIR apresentam valores de fibra bruta muito próximos nos diferentes alimentos, também devido à composição em fibra destes alimentos apresentar valores quase idênticos de fibra (3, 3,5 ou 4%). A existência de um intervalo de valores tão próximos poderá estar a influenciar o valor de R^2 , uma vez que o gráfico apresenta uma reta quase sem declive.

No entanto é necessário ter em consideração que o R^2 obtido na validação cruzada, no ano de 2017, apresenta um valor de 0,75 indicando que a técnica NIR consegue prever este parâmetro e que todos os valores determinados se encontram dentro dos limites estipulados como exatos.

As figuras 25, 26 e 27 representam a dispersão dos resultados obtidos entre as análises externas e o NIR para o parâmetro cinza bruta nos anos de 2015, 2016 e 2017. Tal como observado anteriormente para a fibra bruta nas cinzas também são visíveis dispersões elevadas. No entanto, a dispersão dos resultados é menor que as observadas para a fibra bruta.

Também para a determinação deste parâmetro houve uma melhoria da dispersão dos valores ao longo dos anos, tendo o ano 2017 o ano a apresentar os valores do NIR mais próximos dos valores das análises do laboratório externo, com um valor de R^2 de 0,80.

No gráfico correspondente ao ano 2015, está presente apenas um *cluster*, estando este compreendido entre 7-13% para as análises externas e 9-13% para as análises NIR.

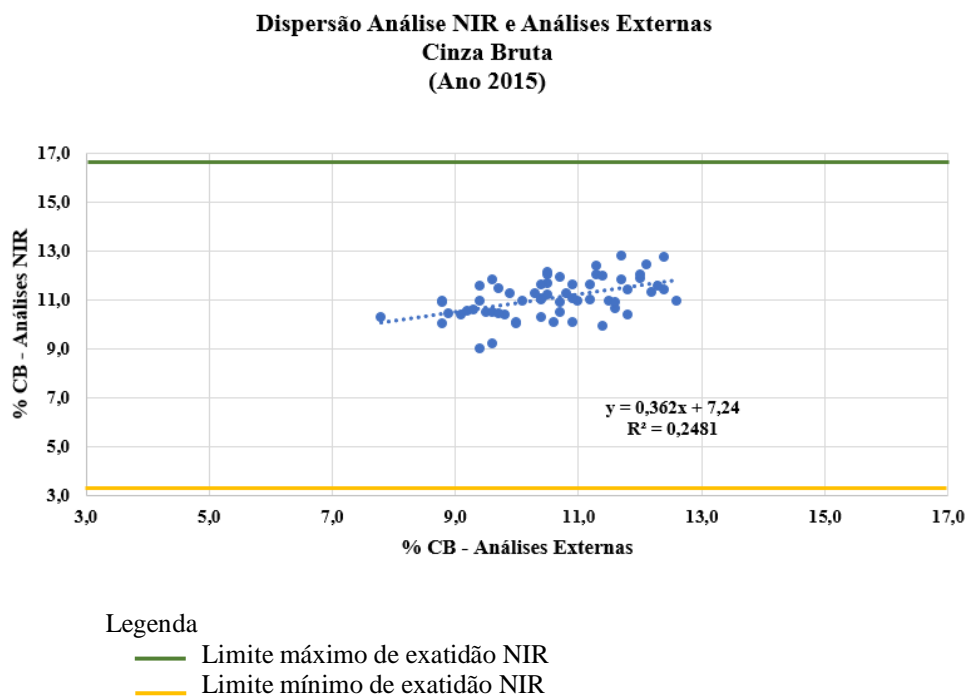
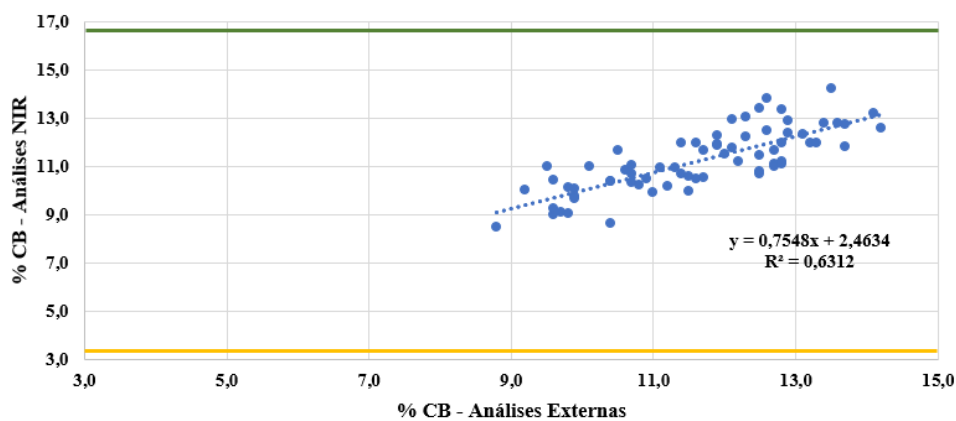


Figura 25 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a cinza bruta em 2015.

No gráfico do ano 2016 não são visíveis dois *clusters* como no ano anterior. No entanto este *cluster* único demonstra, assim como o valor do R^2 que não existe tanta dispersão entre os resultados como no ano anterior.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Cinza Bruta
(Ano 2016)**



Legenda

- Limite máximo de exatidão NIR
- Limite mínimo de exatidão NIR

Figura 26 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a cinza bruta em 2016.

No entanto no gráfico do ano 2017 já são visíveis dois *clusters* com percentagens inferiores a 10 % e percentagens superiores a 10% em ambos os métodos de análise. Ainda são visíveis algumas dispersões nos resultados, parecendo haver mais dispersão no *cluster* que representa a percentagem de cinza superior a 10 %.

**Dispersão Análise NIR e Análises Externas
Cinza Bruta
(Ano 2017)**

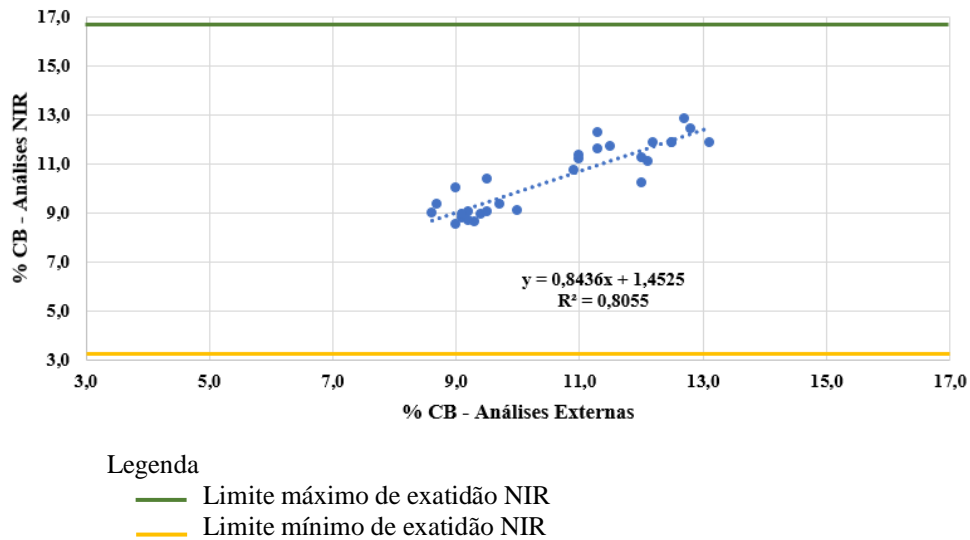


Figura 27 Gráfico de dispersão entre as análises externas e as análises NIR para a cinza bruta em 2017.

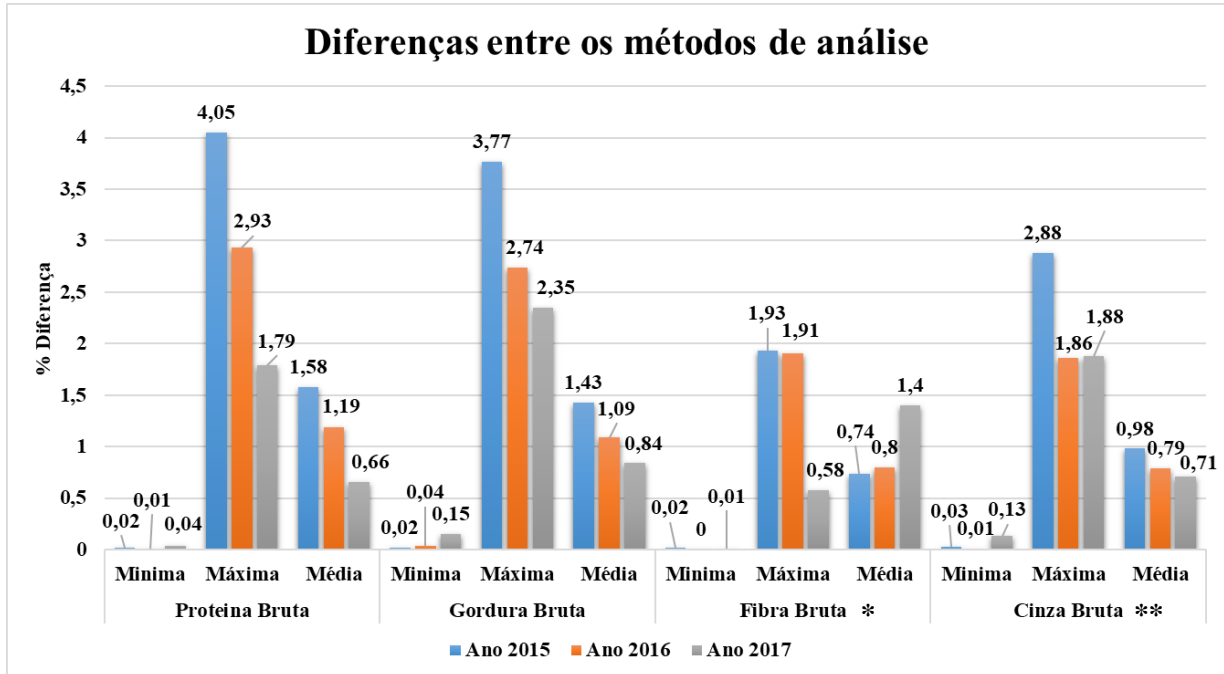
Tal como foi visível nos gráficos dos parâmetros anteriores, também existem determinações pelo NIR com valores superiores ou inferiores aos obtidos nas análises externas. Mais uma vez todos os valores se encontram dentro dos limites estipulados como exatos.

Em todos os parâmetros analisados por NIR (PB, GB, FB e CB) é possível concluir que houve uma evolução na dispersão de resultados ao longo dos anos. Através da realização de um Teste T Student, foram calculados os valores de P, para todos os parâmetros, para deste modo ser possível verificar se as diferenças existentes entre os dois métodos de análise foram significativamente diferentes. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como significativamente diferentes. Foram também calculadas as diferenças mínimas, máximas e médias obtidas.

A figura 28 apresenta resumidamente os valores calculados. Durante a construção desta tabela foram retirados alguns valores considerados *outliers*.

Pela análise da tabela, pode-se observar que no geral houve uma diminuição das diferenças dos valores mínimos, máximo e médios entre os dois métodos de análise, ao longo dos anos. Estas diferenças apenas foram significativamente diferentes para a FB e

GB no ano de 2015 e no ano 2017 para a FB. O que veio apoiar o que se observou nos gráficos de dispersão.



Legenda:

*Diferenças significativas ano 2015 e 2017

**Diferenças significativas ano 2015

Figura 28 Diferenças entre os dois métodos de análise, dos parâmetros em estudo ao longo dos três anos.

3.3.2. Implicações a nível de rotulagem

Tendo em conta as diferenças médias observadas para cada parâmetro no ano 2017, é possível discutir a sua implicação a nível da rotulagem.

Relativamente à proteína bruta, esta está presente nos alimentos Pet Food entre os 22 a 32%. A legislação permite que este parâmetro apresente uma variação de $\pm 3\%$ daquele que se encontra declarado no rótulo. A figura 30 indica que as diferenças existentes entre os dois métodos de análise não são significativamente diferentes, tendo sido obtido uma diferença média de 0,66%. Esta diferença é considerada baixa quando comparada à percentagem alta de proteína existente nestes alimentos e à variação imposta pela legislação. Um alimento que apresente declarado no rótulo uma percentagem de 22% de proteína bruta e o NIR apresentar um resultado, por exemplo de 23,40%, a diferença de 0,66% não vai apresentar implicações, uma vez que o valor ainda se encontra dentro dos limites.

O mesmo foi visível para a gordura bruta, as diferenças existentes entre os dois métodos de análise foram consideradas como não significativas, tendo apresentado uma diferença média de 0,84%. Tendo em conta que este parâmetro se encontra também em percentagens altas nestes alimentos, 8 a 15% e legislação permite uma variação que pode ir de ± 1 a 1,87% a diferença observada não vai apresentar implicações, permitindo que este parâmetro também pode ser controlado pelo NIR de modo a se manter dentro dos limites impostos. O mesmo se pode dizer para a cinza bruta, presente nos alimentos em percentagens compreendidas entre os 10 e 12%, tendo apresentado uma diferença média de 0,71% (variação legislativa $\pm 1,25$ a 1,5%).

Relativamente à fibra bruta, este parâmetro apresentou uma diferença média superior aos restantes parâmetros, 1,40%. Tendo em consideração que a percentagem deste parâmetro nos alimentos se encontra entre 3 a 4% e que as diferenças existentes entre os dois métodos de análise foram consideradas como significativamente diferentes, pode-se considerar que esta diferença pode ter implicações a nível da rotulagem.

3.3.3. Estimativa dos parâmetros nutricionais pelo NIR

Tal como se constatou na primeira parte do trabalho, a previsão da composição química dos alimentos Pet Food pela técnica NIR, apresentou valores que indicam que esta técnica consegue determinar de forma exata os teores de proteína bruta, gordura bruta e cinza bruta. No entanto, a fibra bruta apresentou resultados opostos ao da validação cruzada, que indicou que seria possível prever este parâmetro com exatidão. São visíveis dispersões entre as determinações dos dois métodos e diferenças significativas.

Para realizar uma discussão sobre ambos os resultados, é necessário ter em conta que os métodos e a equipa responsável por desenvolver a calibração das retas do NIR, são diferentes dos métodos e da equipa responsável por realizar as análises no laboratório externo.

A construção da reta responsável por determinar o teor de proteína bruta pela técnica NIR foi desenvolvida utilizando como método de referência o Dumas, enquanto que o laboratório de análises externas utiliza um método interno para a determinação deste parâmetro, denominado de PAFQ 360,1.

O método de Dumas é um método de combustão para a determinação do teor total de azoto. A amostra é queimada ao ser submetida a altas temperaturas numa atmosfera de oxigénio e a quantidade de azoto é quantificada. Outros produtos voláteis resultantes desta combustão são separados. Os resultados são dados em % ou mg de azoto, que posteriormente serão convertidos em proteína. (FOSS 2017) Não são conhecidos os procedimentos utilizados pelo método do laboratório de análises externas. No entanto, ao comparar este método com um outro método para a determinação de proteína, o método de Kjeldahl, o método de Dumas determina o azoto total, incluindo frações inorgânicas como nitritos e nitratos, enquanto que o método de Kjeldahl apenas determina o azoto orgânico e amoníaco, podendo assim existir diferenças entre estes dois métodos de análise. (FOSS 2017)

O método de Dumas pode usar como padrão vários métodos de referência, temos o método proposto pela ISO 16634-1:2008, o método AACC 46.30 e o método AOAC 990.03. (FOSS 2017)

Apesar do método de análise do laboratório de análises externas ser diferente do método utilizado para construir a reta NIR, não foram observadas grandes diferenças quanto aos resultados obtidos em ambos os métodos.

A reta responsável para determinar o teor de gordura bruta foi desenvolvida utilizando como método de referência a hidrólise ácida em ácido clorídrico, e o laboratório de análises externas utiliza o método de referência indicado pela NP ISO 6492:14. O método utilizado pelo laboratório externo também utiliza a hidrólise ácida em ácido clorídrico para extrair a gordura presente nos alimentos Pet Food.

A gordura é extraída normalmente com éter de petróleo, podendo ainda ser usado éter etílico ou *n*-hexano com ou sem hidrólise prévia. A extração da gordura sem hidrólise é aplicada a amostras de origem vegetal, com algumas exceções, já a extração com hidrólise aplica-se a produtos sujeitos a tratamento térmico (Pet Food) ou a produtos de origem animal. Na extração com hidrólise a amostra é hidrolisada com ácido clorídrico a quente, arrefecida, filtrada e o resíduo resultante é lavado e seco. A gordura é extraída do resíduo hidrolisado com éter de petróleo, o solvente destilado e o extrato seco é pesado. (Poli *et al.*, 1993; Committee 2017) Uma vez que uma porção significativa de lípidos nos alimentos para os animais se encontra ligada a proteínas e hidratos de carbono, a extração direta com solventes não é eficaz. As forças atrativas existentes entre as gorduras e as proteínas ou hidratos de carbono, são as responsáveis pela dificuldade da extração das gorduras, uma vez que essas forças criam barreiras iônicas e polares. A hidrólise ácida consegue quebrar ambas as ligações iônicas e covalentes dos lípidos de forma a serem extraídos facilmente. (Nielsen 2014; Jeon e Ikins 1995)

Ao comparar o método de extração por hidrólise ácida em ácido clorídrico com outro método de determinação de gordura, Soxhlet, é possível verificar o dobro da extração de gordura em alimentos Pet Food por este método do que pelo método de Soxhlet. (Poli *et al.*, 1993)

Apesar de ser ter obtido um coeficiente de determinação inferior ($R^2 = 0,81$), quando comparados os resultados obtidos por ambos os métodos, ao coeficiente de determinação obtidos pela validação cruzada ($R^2 = 0,92$) não foram observadas diferenças significativas.

Para a determinação da fibra bruta, a reta de calibração para o NIR foi construída tendo em conta um método gravimétrico, Ankom, e o laboratório de análises externas determina este parâmetro tendo em conta a EN ISO 6865:00.

O método de Ankom (procedimento aprovado por AOCS Official Method Ba 6-84 e utilização de solução químicas e tempos consistentes com o método AOAC 962.09) determina a fibra bruta como sendo o resíduo orgânico remanescente após a digestão com 0,1275M de H₂SO₄ e depois com 0,313M de NaOH. Durante a digestão ácida com H₂SO₄, o ácido é mantido em refluxo, durante 30 minutos a 100°C. Decorridos os 30 minutos a amostra com ácido é filtrada. Ao resíduo da filtração é adicionado o NaOH que irá ser mantido em refluxo por mais 30 minutos a 100°C. Os compostos que vão ser removidos por digestão ácida e básica são predominantemente proteína, açúcares, amido, lípidos e alguns hidratos de carbono estruturais (hemiceluloses) e lenhina. O resíduo final é seco, pesado e incinerado, sendo determinada a cinza. A fibra bruta é determinada pela diferença entre a massa da cinza e a massa do resíduo final. (Helrich 1990; ANKOM 2017) Na EN ISO 6865:00 a amostra é tratada também com H₂SO₄ diluído em ebulição, tendo a digestão também uma duração de 30 min, o resíduo é separado por filtração, lavado e depois tratado com solução de KOH também este em ebulição, a digestão dura também 30 minutos. Em ambos os métodos o resíduo é filtrado, lavado, seco pesado e depois incinerado. A perda de massa resultante da cinza corresponde à massa de fibra bruta. (ISO 6865 2000)

Não foram fornecidas as concentrações das soluções utilizados pelo laboratório de análises externo. Contudo em ambos os métodos a digestão ácida é realizada durante 30 minutos com o mesmo ácido, H₂SO₄, utilizando para a digestão alcalina, reagentes diferentes, tendo como duração 30 minutos em ambos os métodos.

Neste caso o coeficiente de determinação obtido quando comparado os dois métodos foi muito inferior ao obtido pela validação cruzada ($R^2 = 0,16$ e $R^2 = 0,75$ respetivamente), tendo sido observadas diferenças significativas entre os métodos.

Muitos dos métodos para a determinação da fibra são métodos indiretos, sendo obtida por diferença dos outros constituintes que se estão a determinar, esta determinação soma os erros de determinação de todos os outros constituintes. Todas as etapas que irão levar à determinação da fibra têm associados erros aleatórios e sistemáticos que contribuem para a variação total de fibra. (Mertens 2003) Erros aleatórios e sistemáticos na pesagem, contribuem como uma fonte significativa de erros. Estes podem ser amplificados quando os testes são realizados em amostras que apresentem quantidades pequenas de fibra, como é o caso dos alimentos Pet Food. (Mertens 2003) Tendo em conta que, a equipa responsável pelas análises realizadas no laboratório externo e a equipa responsável pelo

laboratório que realiza as análises usadas para desenvolver a reta de calibração do NIR, não é a mesma, as diferenças existentes poderão existir devido aos erros associados a cada equipa.

A cinza bruta foi determinada para o desenvolvimento da reta de calibração NIR através do método de gravimetria em mufla, e o laboratório de análises externas tem em conta a NP ISO 5984:14, a amostra é incinerada a 550°C e o resíduo é pesado, o mesmo acontece com a determinação de cinza pelo método usado para construir a reta NIR. (Standardization 2002)

O coeficiente de determinação obtido na comparação dos dois métodos de análise ($R^2=0,80$) apresentou um valor não muito mais baixo que o da validação cruzada ($R^2=0,89$), juntamente com a não existência de diferenças significativas entre os dois métodos de análise, demonstra que não existe muita dispersão entre os resultados NIR e os resultados das análises externas.

Cerca de 50 milhões de análises são realizada anualmente utilizando a técnica NIR como método de análise. Até alguns anos, não existia nenhum padrão internacional aplicável para permitir que os usuários da técnica NIR obtivessem credenciamento. Para tal foi lançado um projeto ISO 12099 que indica guias para a aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo. Este padrão internacional fornece diretrizes para a determinação de humidade, gordura, proteína, amido e fibra bruta, entre outros. Esta ISO concentra-se na validação de modelos de calibração. (Ü. Möller 2014)

Caso o processo de validação revelar estatísticas não aceitáveis, o modelo não deve ser usado, devendo ser ajustado e corrigido. (Ü. Möller 2014)

Os resultados fornecidos pela Trouw Nutricion indicam valores que nos sugerem que o NIR consegue prever com exatidão os parâmetros pretendidos. Permitindo deste modo, à Ovargado acompanhar todo o processo de produção.

A comparação entre os dois métodos de análise não demonstrou grandes diferenças para a proteína bruta, gordura bruta e cinza bruta. No entanto, a fibra bruta obteve diferenças significativas ao comparar os resultados do NIR com os do laboratório externo. Contudo estas diferenças podem estar associadas a diferenças nas determinações pelo laboratório externo, quando comparadas com as análises realizadas para contruir a calibração. Portanto, este parâmetro, como medida de segurança, deve ter um maior controlo, para deste modo garantir que sejam respeitados os limites legislativos. A

metodologia de referência para a determinação da fibra deverá ser um método determinação direto, para que a calibração do NIR possa usar valores de referência mais ajustados aos valores reais das amostras. Só assim poderão ser alcançados valores robustos de calibração para a fibra.

3.4. Considerações sobre a determinação da Fibra Bruta

Tendo em conta que a fibra foi o parâmetro que apresentou maiores diferenças, existem algumas considerações a ter em conta quanto à determinação deste parâmetro.

Hoje em dia o método da fibra bruta continua a ser usado em algumas regiões do mundo, assim como pelas indústrias de alimentação animal. Contudo, a sua utilidade é limitada, devido à perda de alguns compostos fibrosos. (Rodica e Adrian 2011)

Como já mencionado anteriormente, as fibras mais insolúveis são constituídas principalmente por três tipos de polímeros: celulose, hemiceluloses e lenhina.

Os grãos de cereais são uma estrutura complexa, que contém paredes celulares com diferentes composições. A parede celular da parte externa da semente desempenha principalmente um papel de proteção, esta é constituída principalmente por celulose, xilanas e quantidades significativas de lenhina, já a camada do endosperma é composta principalmente por amido, arabinoxilanas e β -glucanas. As proporções dos polissacarídeos variam significativamente de acordo com a espécie e nos diferentes tecidos dos grãos. Temos como exemplos: o centeio, o triticale, o trigo e o milho que são ricos em arabinoxilanas, enquanto que a cevada e a aveia apresentam um alto teor de β -glucanas. (Knudsen 2014)

Dos componentes da parede celular as hemiceluloses são uma fração grande e variável e, portanto, a determinação da fibra bruta não é uma boa estimativa do conteúdo fibroso dos alimentos. (Van Soest 1967)

Tendo em conta que os alimentos Pet Food produzidos pela Ovargado S.A. utilizam o Milho e a Sêmea de Trigo como sendo as principais fontes de fibra, a tabela 13 apresenta a composição relativa, em percentagem, da composição das fibras insolúveis presentes no trigo e no milho.

Tabela 13 Composição relativa (%) das fibras insolúveis presentes no Trigo e no Milho. (Adaptado de Nyman et al., 1984)

	Composição Relativa (%)	
	Trigo	Milho
Arabinose	24	24
Xilose	36	30
Manose	1	2
Galactose	3	5
Glucose	33	32

Pela composição em açúcares verifica-se que existe uma grande quantidade, principalmente dos resíduos de arabinose, xilose e glucose em ambas as matérias-primas. Portanto, estas matérias primas para além de apresentarem celulose, são caracterizadas por apresentarem uma fração grande de arabinoxilanas, sendo que ambos os cereais apresentam uma quantidade muito similar destes polissacarídeos. As cadeias laterais de arabinoxilanas são suscetíveis a serem degradadas pela hidrólise ácida durante a determinação da fibra bruta. (Kent *et al.*, 2017)

O método da fibra em detergente neutro, apesar de ter sido desenvolvido por Van Soest para determinar a fibra de forragens, pode também ser utilizado em alimentos concentrados. Este método consegue determinar todo o material insolúvel da parede celular, provando ser um melhor método para prever o valor nutricional da fibra, do que o método da fibra bruta. (Rodica e Adrian 2011)

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos em ambos os métodos, fibra bruta e fibra em detergente neutro. Onde pela sua análise é possível perceber que a percentagem de fibra é muito maior no método da fibra em detergente neutro do que no método da fibra bruta.

Tabela 14 Comparação percentagem de fibra bruta com a fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido em Milho Nacional e Sêmea de Trigo. (Adaptado de FEDNA.)

		Parâmetro Químico	Composição (%)
Milho Nacional		Fibra Bruta	2,1
		Fibra em Detergente Neutro	9,0
Sêmea de Trigo		Fibra Bruta	9,8
		Fibra em Detergente Neutro	38,5

Segundo Norman (2009), durante a determinação da fibra bruta existe a perda de compostos fibrosos. O resíduo obtido após a digestão ácida ainda contém presente algumas hemiceluloses e proteína, no entanto após a digestão alcalina, praticamente toda a hemicelulose e proteína remanescente são removidas. A digestão alcalina é ainda responsável pela remoção de alguma lenhina e remoção de uma pequena quantidade de celulose. Portanto, o método utilizado para a quantificação da fibra bruta, na realidade está a quantificar na maior parte a composição em celulose, podendo ter alguma percentagem de hemicelulose e lenhina que resistiram à digestão ácida e alcalina, e ainda alguma quantidade de proteína.

Como visto anteriormente, existe o inconveniente de não se poder diferenciar a celulose dos hidratos de carbono não estruturais, como o amido e açúcares (Vásquez *et al.*, 2004). Tendo isto em consideração, a existência de um R^2 mais baixo, obtido na validação cruzada, comparativamente aos restantes parâmetros e a existência de diferenças significativas entre os dois métodos de análise, poderão estar relacionados com este inconveniente, dado que os alimentos Pet Food são ricos em amido, fornecido principalmente pelas matérias-primas usadas para a formulação destes alimentos, nomeadamente o Milho e a Sêmea de Trigo,

4. Considerações Finais

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) aliada às técnicas de quimiometria revelou ser uma técnica eficaz na determinação da composição química dos alimentos Pet Food, prestando um grande apoio às indústrias de alimentação animal uma vez que é possível determinar a composição química dos alimentos com exatidão e num curto espaço de tempo.

Os valores apresentados referentes à validação cruzada (ano 2017) demonstram que a determinação da composição química dos alimentos Pet Food pode ser determinada com exatidão. Foram obtidos valores de R^2 de 0,98; 0,92; 0,75 e 0,89 para a proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta respetivamente

A comparação realizada entre as análises do NIR com as análises externas (ano 2017) demonstraram valores de R^2 de 0,97; 0,81; 0,16 e 0,80 para a proteína bruta, gordura bruta, fibra bruta e cinza bruta respetivamente. A fibra bruta foi o único parâmetro que em 2017 continuou a apresentar diferenças significativas.

O erro médio apresentado para a fibra bruta (1,40%) quando comparado com as percentagens presentes nos alimentos (3 a 4%) é considerado alto, podendo ter implicações a nível das tolerâncias impostas pelo Regulamento (CE) nº939/2010, referente à rotulagem. Este erro poderá estar relacionado com a diferença de métodos e equipas entre os dois laboratórios de análises, podendo estar associados erros aleatórios e sistemáticos diferentes, como também à baixa quantidade de fibra bruta na amostra.

A técnica de espectroscopia de infravermelho próximo pode ser utilizada para a determinação precisa da composição química dos alimentos Pet Food produzidos pela Ovargado, garantindo assim um controlo eficaz dos alimentos ao longo da produção. Contudo a existência de dispersão entre as análises NIR e as análises externas e diferença associada a determinação da fibra bruta, leva à necessidade de um maior controlo deste parâmetro, devido à necessidade de respeitar os limites impostos pela legislação quanto à rotulagem.

5. Trabalho Futuro

Perante o trabalho realizado, seria interessante no futuro:

Calibrar o aparelho de espectroscopia de infravermelho próximo para a determinação da fibra total, uma vez que o método utilizado para determinar este parâmetro não representa a estimativa real da fibra presente nestes alimentos.

Estudar a capacidade da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo em determinar os parâmetros químicos nos alimentos para bovinos, ovinos, coelhos e aves, uma vez que a composição destes difere entre si e dos alimentos Pet Food.

Verificar a robustez da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo em determinar a humidade, uma vez que este parâmetro não foi estudado neste trabalho.

6. Referências Bibliográficas

- AEP. Associação Empresarial de Portugal [Internet]. Expozoo. 2012 [cited 2017 Sep 25]. Available from: [http://aep.org.pt/docs/aep-estudos/expozoo-\(julho-2012\).pdf](http://aep.org.pt/docs/aep-estudos/expozoo-(julho-2012).pdf)
- Alomar D, Hodgkinson S, Abarzúa D, Fuchslocher R, Alvarado C, Rosales E. Nutritional evaluation of commercial dry dog foods by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2006;90:223-229.
- Andriguetto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A, Flemming JS, Souza GA, Filho AB. *Nutrição animal- As bases e os fundamentos da nutrição animal*. 4th ed. São Paulo: Nobel; 1981. 310 p.
- ANKOM. Crude Fiber Method Crude Fiber Analysis in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I) Crude Fiber Method. 2017.
- AOAC. Official Method. <http://www.eoma.aoac.org/> (December 10, 2017). [Internet]. [cited 2017 Dec 10]. Available from: <http://www.eoma.aoac.org/>
- Asuero AG, Sayago A, González AG. The Correlation Coefficient: An Overview. *Critical Reviews Analytical Chemistry*. 2006;36:41-59.
- Baeten V, Rogez H, Pierna JA, Vermeulen P, Dardenne P. Vibrational Spectroscopy for Rapid Control of Agro-Food Products. In: Nolle LML, Toldra F. *Handbook of Food Analysis*. New York: CRC Press; 2015:591-621 p.
- Beghi R, Giovenzana V, Guidetti R, Beghi R. Chemometrics in Food Technology. In: Varmuza K. *Chemometrics in Practical Applications*. Croatia: InTech; 2012;52-217.
- Blanco M, Villarroya I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*. 2002;21: 240-250.
- Boever JL De, Cottyn BG, Vanacker JM, Boucque C V. The use of NIRS to predict the chemical composition and the energy value of compound feeds for cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 1995;1:243-253.
- Broad N, Graham P, Hailey P, Hardy A, Holland S, Hughes S, Lee D, Prebble K, Salton N, Warren P. Guidelines for the Development and Validation of Near-infrared Spectroscopic Methods in the Pharmaceutical Industry. In: Chalmers JM, Griffiths PR. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 2006; 610-3590 p.
- Büning-Pfaue H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 2003;82:107-115.

Burns DA, Ciurczak EW. Handbook of Near-Infrared Analysis. 3rd ed. New York: CRC Press. 2008;834 p.

Cao N. Calibration optimization and efficiency in near infrared spectroscopy. Iowa State University. 2013.176 p.

Chen H. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: Chen H. Biotechnology of Lignocellulose. Beijing: Springer, editor. Biotechnology of Lignocellulose. New York. 2014;25-72 p.

Coates J. Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach. In: Meyers RA. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester:John Wiley & Sons Ltd; 2000. 10881-10882 p.

Committee AAFCO'S. Laboratory Methods and Services: Critical Factors in Determining Fiber in Feeds and Forages Fiber Definitions. [Internet]. Association of American Feed Control Officials. [cited 2017 Nov 25]. Available from: http://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Laboratory/Fiber_Best_Practices_Working_Group/Fiber-Critical-Conditions-R1.pdf

Cozzolino D, Liu L, Cynkar WU, Damberg RG, Janik L, Colby CB, Gishen M. Effect of temperature variation on the visible and near infrared spectra of wine and the consequences on the partial least square calibrations developed to measure chemical composition. *Analytica Chimica Acta*. 2007;588:224-230.

Dougall HW. Crude Fibre: Its Determination and Its Place in the Analysis of Animal Feeding-Stuffs. *The East African Agricultural Journal*. 1956;21:225-229.

Ensminger ME, Ensminger AH, Kolande JE, Robson JRK. *Foods & Nutrition Encyclopedia*. 2nd ed. London; Plant Breeding; 1993.67 p.

Esteve Agelet L, R. Hurburgh Jr. C. A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2010;40: 37-41.

FEDIAF. The European Pet Food Industry Federation Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. ed. Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux Familiers. 2016:1-100.

FEDNA. Normas FEDNA control de qualidade de matérias-primas [Internet]. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. [cited 2017 Nov 13]. Available from: <http://www.fundacionfedna.org/normas-fedna-control-calidad>

Fernández-Ahumada E, Fearn T, Gómez A, Vallesquino P, Guerrero. E J, Pérez-Arín D, Garrido-Varo A. Reducing NIR prediction errors with nonlinear methods and large populations of intact compound feedstuffs. *Measurement Science and Technology*. 2008;19:1-7.

Feudale R, Woody N, Tan H, Myles A, Brown S, Ferre J. Transfer of multivariate calibration models: a review. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2002;64:181- 192.

Fontaine J, Schirmer B, Jutta H. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Enables the Fast and Accurate Prediction of Essential Amino Acid Contents . 2 . Results for Wheat, Barley, Corn, Triticale, Wheat Bran / Middlings , Rice Bran, and Sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49:57-66.

FOSS. Dumas or Kjeldahl for reference analysis? *Analytics Beyond Measure*. 2017:1–5.

García-Sánchez F, Nicolás JJM, Nieves M, Galvez-Sola L, Domingo RM. Using Near-Infrared Spectroscopy in Agricultural. In: Konstantinos G, Kyprianidis, Skavaril J. *Developments in Near-Infrared Spectroscopy*. Croatia: InTech; 2017:97- 127 p.

Givens. DI, L. De Boever JL, Deaville ER. The principles , practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutrition Research Reviews*. 1997;10:83-114.

Goulart FR, Adoriam TJ, Mombach PI, Silva LP da. Importância da fibra alimentar na nutrição de animais não ruminantes. *Revista de Ciência e Inovação*. 2016;1:54-141.

Gray M. Evaluation of oxidized rendered protein meals in pet foods [tese mestrado]. [Kansas]: Kansas State University; 2015:126.

Hageman JA, Westerhuis JA, Smilde AK. Temperature robust multivariate calibration : an overview of methods for dealing with temperature influences on near infrared spectra. *Journal Near Infrared Spectroscopy*. 2005;62:53-62.

Helrich K. *Official methods of analysis*. 15th ed. Vol. 1. USA; 1990:83 p.

Herrera APN, Santiago GS, Medeiros SLS. Importância da fibra na nutrição de coelhos. *Ciência Rural*. 2001.31:557-561.

Hilton J. Carbohydrates in the nutrition of the dog. *The Canadian Veterinary Journal*. 1990;3:128-129.

Honigs DE. *Near Infrared Analysis*. Instrumentation Science & Technology. 1985;14:1-62.

IACA. Relatório de actividades. 2010; [cited 2016 Nov 13]. Available from: http://www.iaca.pt/content/metacontent/relatorio_act2010.pdf

INE. *Produção animal. Estatísticas Agrícolas 2012*. 2013. 33-44 p. [cited 2016 Nov 13]. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpu_b_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2

International Organization for Standardization. Animal feeding stuffs — Determination of crude ash. 2002.

ISO 6865. Animal feeding stuffs—Determination of crude fibre content—Method with intermediate filtration (Preview document). International Organization for Standardization. 2000.

Jeon IJ, Ikins WG. Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants. 10th ed. New York: CRC Press; 1995:40 p.

Júnior GLM, Zanine AM, Borges I, Pérez JRO. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. *Ciência Animal*. 2017;17:7-17.

Kawano S. Application to Agricultural Products and Foodstuffs. In: Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications. University of Michigan: Wiley-VCH 2002:269-287 p.

Kent JA, Barnicki SD, Bommaraju T V. Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. 12th ed. New York:Springer;2017: 2288 p.

Knudsen KEB. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*. 2014;93- 2380-2393.

Kumaravelu CA. Review on the applications of Near-Infrared Spectrometer and Chemometrics for the Agro-Food Processing Industries. International Conference on Technological Innovations in ICT for Agriculture and Rural Development. 2015;8-12.

Lequeue G, Draye X, Baeten V. Determination by near infrared microscopy of the nitrogen and carbon content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf powder. *Scientific Reports*. 2016;6:1-9.

Lira SA. Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações. [master's thesis]. [Curitiba]. Universidade Federal do Paraná; 2004.

Luykx DMAM, Ruth SM Van. Food Chemistry An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*. 2008;107:891-911.

Martín IG, Farcía NÁ, J.L.Hernández A. Instantaneous determination of crude proteins , fat and fibre in animal feeds using near infrared reflectance spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica Chimica Acta*. 2006;128:165-171.

Martin KA. Recent Advances in Near- Infrared Reflectance Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*. 1992;27:325-383.

Martin Jr. JH, C. Loehr R, E. Pilbeam T. Animal Manures as Feedstuffs : Nutrient Characteristics. *Agricultural Wastes*.1983;6:131-166.

McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. *Animal Nutrition*. 7th ed. England, London, New York, Boston, San Francisco, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore, Hong Kong, Seoul, Taipei, New Delhi, Cape Town, Madrid, Mexico City, Amsterdam, Munich, Paris, Milan: Pearson; 2010. 692 p.

Mertens DR. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *Journal of Animal Science*. 2003;81:3233-3249.

Mertens DR. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 2002; 85:1217-1240.

Möller J. Comparing methods for fibre determination in food and feed. *FOSS* 2014;1:1-6.

Möller Ü. A White Paper from FOSS NIRS Standard ISO 12099 – setting new performance standards for feed calibrations? *FOSS*. 2014;1:1-3.

Nahm KH. Efficient Feed Nutrient Utilization to Reduce Pollutants in Poultry and Swine Manure. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2002;32:1-16.

National Research Council. *Nutrient Requirements of Dog and Cats*. Rev ed. USA: National Academy of Sciences; 2006. 4001 p.

Nielsen SS. *Food Analysis*. 4th ed. USA: Springer; 2014. 602 p.

Norman AG. The Composition of Crude Fibre. *The Journal of Agricultural Science*. 2009;25:529-540.

Nyman M, Siljestrom M, Pedersen B, Bachknudsen KE, Asp N-G, Johansson C-G, Eggum BO. Dietary Fiber Content and Composition in Six Cereals at Different Extraction Rates. *Cereal chemistry*. 1984;61:14-19.

Ozaki Y, McClure WF, Christy AA. *Livestock Animal By-Products*. In: *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. 10th ed. New Jersey; Wiley-Interscience 2007. 311 p.

Park RS, Agnew RE, Gordon FJ. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on undried samples of grass silage to predict chemical composition and digestibility parameters. *Animal Feed Science and Technology*. 1998;72: 155-167.

Pasquini C. Review Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals , Practical Aspects and Analytical Applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2003;14:198-219.

Phillips LG, Whitehead DM, Kinsella J. *Structure-Function Proteins of food proteins*. 9th ed. USA: Academic Press INC; 1994. 273 p.

Poli ND, Corrêa LMM, Beltrame PM, Raschcowetzki NV, Holzbach M, Gouvêa AA, Santos MJ. Determinação de gordura em rações- Comparação de Metodologias. Brasil;Fundação de Ciência e Tecnologia. Boletim Técnico nº24. 1993:28.

Porep JU, Kammerer DR, Carle R. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. Trends in Food Science & Technology. 2015;10:211–230.

Prasad H, Aenugu R, Kumar DS, Parthiban N, Ghosh SS, Banji D. Near Infra Red Spectroscopy- An Overview. International Journal of ChemTech Research. 2011;3:825–836.

Qu J-H, Liu D, Liu D, Cheng JH, Sun D-N, Ma JI, Pu H, Zeng X-A. Applications of Near-infrared Spectroscopy in Food Safety Evaluation and Control: A Review of Recent Research Advances. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2015;55:1939–1954.

Rahman A, Bayram I, Khanum S, Ullah S. Use and calibration of near infrared reflectance spectroscopy in feed analysis: A mini review. Pakistan Journal of Life and Social Sciences. 2015;13:1-7.

Roberts JJ, Cozzolino D. An Overview on the Application of Chemometrics in Food Science and Technology — An Approach to Quantitative Data Analysis. Food Analytical Methods. 2016;9:3258–3267.

Rodica C, Adrian C. Chemical Methods for the Determination of Soluble and Insoluble Non-Starch Polysaccharides - Review. Animal Science and Biotechnologies. 2011;44: 73-80.

Roussel S, Preys S, Chauchard F, Lallemand J. Multivariate Data Analysis (Chemometrics). Process Analytical Technology for the Food Industry. In: O'Donnell C, Cullen PJ, Fagan C. Process Analytical Technology for the Food Industry. New York; Springer: 2014:7-17 p.

Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: New implications for an old amino acid. FEMS Microbiology Letters. 2003;226:195-202.

Segtnan VH, Sasic S, Isaksson T, Ozaki Y. Studies on the Structure of Water Using Spectroscopy and Principal Component Analysis. Analytical Chemistry. 2001;73:3153-3161.

Shah M, Bhatt C, Dave J. Temperature Dependent NIR Spectroscopic Analysis for Food Grain Samples. Indian Journal of Science and Technology. 2016;9:1-4.

Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications. 1st ed. Germany: WILEY-VCH; 2008: 269 p.

Sun DW. Modern Techniques for Food Authentication. 1th ed. Ireland: Elsevier Inc.; 2008:682 p.

Taylor P, Benito MTJ, Ojeda CB, Rojas FS. Process Analytical Chemistry : Applications of Near Infrared Spectrometry in Environmental and Food Analysis : An Overview Process Analytical Chemistry : Applications of Near Infrared Spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008;43:452–484 p.

Thompson A. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2011;40: 222-231.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*. 1991;74:3583–3597.

Van Soest P. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal of Animal Science*. 1967;26:119-128.

Williams PC, Starkey PM. Influence of Feed Ingredients Upon the Prediction of Protein in Animal Feed-mixes by Near-infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1980;31:1201–1213.

Workman JR JJ. Interpretive Spectroscopy for Near Infrared. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2006;31:251-320.

Workman Jr J, Weyer L. History of Near-Infrared Applications. In: *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*. 2th ed. New York: CRC Press; 2012:101 p.

Xiccato G, Trocino A, Boever JL De, Maertens L, Carabaño R, Pascual JJ, Perez JM, Gidenne T, Falcão-e-Cunha L. Prediction of chemical composition , nutritive value and ingredient composition of European compound feeds for rabbits by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Animal Feed Science and Technology*. 2003;104: 153-168.

7. Anexos

Valores ano 2015

Tabela 15 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Manutenção.

Ano 2015 (Manutenção)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
22,11	19,24	2,87	8,53	7,6	0,93	10,96	9,4	1,56	4,72	4,2	0,52	
22,44	19	3,44	7,64	8	0,36	11,88	9	2,88	4,69	4,4	0,29	
22,88	19,38	3,50	9,15	6,7	2,45	10,03	8,8	1,23	4,02	3,7	0,32	
22,08	19,99	2,09	7,91	8	0,09	11,65	10,5	1,15	4,81	3,4	1,41	
21,99	19,91	2,08	8,39	8,9	0,51	10,30	7,8	2,50	4,63	3,4	1,23	
20,66	19,76	0,90	7,62	8,7	1,08	11,26	10,3	0,96	4,40	3,4	1,00	
23,82	23,07	0,75	9,49	9,1	0,39	11,62	11,2	0,42	4,11	3,4	0,71	
21,41	23,56	2,15	8,51	9,4	0,89	12,11	10,5	1,61	4,14	3,2	0,94	
25,07	25,05	0,02	10,05	9,1	0,95	11,64	10,9	0,74	4,39	3,2	1,19	
23,36	21,32	2,04	9,01	8,6	0,41	10,92	8,8	2,12	4,68	3	1,68	
23,36	23,1	0,26	8,81	8,7	0,11	10,28	10,4	0,12	4,14	3	1,14	
22,06	20,57	1,49	8,72	8,4	0,32	11,56	9,4	2,16	5,23	3,3	1,93	
26,42	25,71	0,71	11,92	10,7	1,22	12,39	11,3	1,09	4,72	3,2	1,52	
24,12	25,56	1,44	8,25	11,7	3,45	10,05	10	0,05	4,42	3,7	0,72	
Média	22,98	21,80	1,69	8,86	8,83	0,94	11,19	9,88	1,33	4,51	3,46	1,04
Desvio Padrão	1,52	2,47		1,11	1,24		0,78	1,03		0,34	0,41	

Tabela 16 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Manutenção Mix.

Ano 2015 (Manutenção Mix)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
20,31	19,22	1,09	7,27	8,1	0,83	10,58	9,3	1,28	4,57	3,8	0,77	
22,19	19,24	2,95	7,87	8	0,13	10,40	9,1	1,30	4,59	3,5	1,09	
22,72	18,67	4,05	8,61	8,3	0,31	10,53	9,2	1,33	4,28	4,2	0,08	
21,66	18,85	2,81	7,42	7,2	0,22	10,07	10	0,07	4,01	3,8	0,21	
21,69	20,34	1,35	6,94	7,9	0,96	8,99	9,4	0,41	5,32	3,4	1,92	
22,58	20,53	2,05	8,81	8,6	0,21	11,80	9,6	2,20	4,95	3,3	1,65	
25,10	24,33	0,77	9,94	9,6	0,34	10,43	8,9	1,53	3,72	3,5	0,22	
22,38	21,66	0,72	7,86	8,3	0,44	11,49	9,7	1,79	4,77	3,7	1,07	
23,18	23,12	0,06	8,88	8,9	0,02	10,96	10,1	0,86	4,41	3,1	1,31	
Média	22,42	20,66	1,76	8,18	8,32	0,38	10,58	9,48	1,20	4,51	3,59	0,93
Desvio Padrão	1,30	2,00		0,95	0,67		0,81	0,41		0,48	0,33	

Tabela 17 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Cachorros.

Ano 2015 (Cachorros)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
31,22	29,04	2,18	12,97	12,2	0,77	9,18	11,3	2,12	2,37	3,9	1,53	
30,48	29,45	1,03	13,14	11,1	2,04	10,06	10,9	0,84	2,74	3,7	0,96	
32,14	31,96	0,18	14,10	13,6	0,50	10,47	9,5	0,97	3,49	2,9	0,59	
31,13	30,62	0,51	12,91	12,1	0,81	11,90	10,7	1,20	3,91	3,3	0,61	
30,39	30,15	0,24	13,33	11,4	1,93	11,90	12	0,10	4,51	3,4	1,11	
28,25	30,64	2,39	10,74	11,3	0,56	11,31	12,2	0,89	4,08	3,6	0,48	
29,62	30,27	0,65	12,86	12,1	0,76	11,00	11,2	0,20	4,06	3,8	0,26	
26,93	30,27	3,34	10,18	12,8	2,62	11,41	11,8	0,39	4,30	3,6	0,70	
29,21	29,98	0,77	12,61	11,6	1,01	10,97	12,6	1,63	3,21	3,5	0,29	
28,26	28,48	0,22	13,37	12,3	1,07	10,67	11,6	0,93	4,00	3,9	0,10	
Média	29,76	30,09	1,15	12,62	12,05	1,21	10,89	11,38	0,93	3,67	3,56	0,66
Desvio Padrão	1,61	0,96		1,22	0,76		0,84	0,88		0,70	0,31	

Tabela 18 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Alta Energia.

Ano 2015 (Alta Energia)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
29,22	27,22	2,00	13,93	13,4	0,53	11,04	10,4	0,64	3,48	3,5	0,02	
31,06	27,84	3,22	16,17	12,4	3,77	12,03	12	0,03	3,59	3	0,59	
29,90	26,94	2,96	14,46	15,4	0,94	12,81	11,7	1,11	4,12	3,2	0,92	
32,90	29,22	3,68	15,66	12,4	3,26	10,97	11	0,03	4,09	3,1	0,99	
28,29	26,86	1,43	14,27	11,1	3,17	12,74	12,4	0,34	4,00	3,2	0,80	
29,57	28,18	1,39	14,10	12	2,10	11,06	10,9	0,16	3,69	3,6	0,09	
28,66	28,92	0,26	15,50	12,1	3,40	12,04	11,3	0,74	4,24	2,6	1,64	
29,30	28,66	0,64	13,85	21,8	7,95	10,37	11,8	1,43	3,44	3,6	0,16	
30,15	27,78	2,37	15,50	13,1	2,40	10,90	10,7	0,20	3,63	3,6	0,03	
29,37	28,81	0,56	15,70	12,8	2,90	9,22	9,6	0,38	3,26	3,3	0,04	
29,42	28,63	0,79	14,10	12,8	1,30	10,51	9,6	0,91	3,89	3,7	0,19	
Média	29,80	28,10	1,76	14,84	13,57	2,88	11,24	11,04	0,54	3,77	3,31	0,50
Desvio Padrão	1,26	0,83		0,86	2,93		1,08	0,92		0,32	0,33	

Tabela 19 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Alta Energia Extra.

Ano 2015 (Alta Energia Extra)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
31,52	32,27	0,75	12,32	12,8	0,48	12,03	10,5	1,53	3,81	3,5	0,31	
29,53	27,71	1,82	14,06	11,6	2,46	10,97	8,8	2,17	3,33	3,7	0,37	
29,92	29,84	0,08	12,82	12,6	0,22	10,40	9,8	0,60	3,52	3,5	0,02	
35,94	34,7	1,24	16,49	13	3,49	9,92	11,4	1,48	2,90	2,8	0,10	
29,69	29,6	0,09	14,71	12,1	2,61	10,94	11,5	0,56	4,23	2,7	1,53	
32,91	31,26	1,65	16,84	13,5	3,34	10,49	10,7	0,21	3,67	3,1	0,57	
32,45	30,45	2,00	16,12	13,3	2,82	11,19	10,5	0,69	4,22	4,9	0,68	
30,68	29,84	0,84	15,31	14,1	1,21	10,10	10,6	0,50	3,52	4	0,48	
Média	31,58	30,71	1,06	14,84	12,88	2,08	10,76	10,48	0,97	3,65	3,53	0,51
Desvio Padrão	2,17	2,09		1,67	0,79		0,68	0,86		0,45	0,71	

Tabela 20 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2015 para o alimento Gatos.

Ano 2015 (Gatos Mix)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
27,89	26,87	1,02	11,89	12,3	0,41	11,27	9,9	1,37	3,72	3,5	0,22	
31,35	29,28	2,07	12,47	11,4	1,07	11,94	9,2	2,74	4,04	3,4	0,64	
31,04	28,22	2,82	12,08	10,7	1,38	11,27	10,8	0,47	3,76	3,8	0,04	
30,05	27,13	2,92	14,44	12,7	1,74	11,00	10,4	0,60	3,72	3,3	0,42	
28,83	27,73	1,10	13,01	11,5	1,51	12,00	11,4	0,60	4,54	2,8	1,74	
29,59	29,67	0,08	13,02	12,3	0,72	10,45	9,7	0,75	4,06	3	1,06	
30,41	29,26	1,15	12,87	12,7	0,17	11,63	10,4	1,23	3,87	3,7	0,17	
30,09	28,92	1,17	13,66	12,1	1,56	12,43	12,1	0,33	4,30	3,5	0,80	
28,18	29	0,82	12,50	14,1	1,60	10,88	11,6	0,72	4,05	2,8	1,25	
26,79	28,94	2,15	11,88	14,1	2,22	11,81	11,7	0,11	3,97	3,5	0,47	
29,20	25,29	3,91	13,96	13,2	0,76	11,40	12,4	1,00	4,48	3,7	0,78	
25,96	28,88	2,92	11,40	12,8	1,40	11,56	12,3	0,74	4,51	5,2	0,69	
Média	29,11	28,27	1,85	12,76	12,49	1,21	11,47	10,99	0,89	4,09	3,52	0,69
Desvio Padrão	1,66	1,29		0,92	1,02		0,54	1,08		0,31	0,63	

Valores ano 2016

Tabela 21 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Manutenção.

Ano 2016 (Manutenção)											
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta		
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação
22,78	23,22	0,44	8,16	8,3	0,14	10,21	10,8	0,59	4,30	3,6	0,70
23,19	24,5	1,31	7,38	7,7	0,32	10,99	10,1	0,89	4,43	3,3	1,13
20,20	21,84	1,64	7,34	8,3	0,96	10,98	9,5	1,48	4,81	3,5	1,31
23,73	25,34	1,61	9,12	9,3	0,18	10,71	11,4	0,69	4,28	5	0,72
22,89	22,88	0,01	8,05	7,7	0,35	9,02	9,6	0,58	4,33	3,4	0,93
24,18	22,6	1,58	8,00	9,1	1,10	10,20	11,2	1,00	4,31	3	1,31
20,19	20,73	0,54	8,94	8,8	0,14	9,12	9,7	0,58	2,22	3,3	1,08
21,90	21,54	0,36	8,46	8,1	0,36	10,85	10,6	0,25	2,89	3,9	1,01
23,90	21,71	2,19	9,24	10,1	0,86	9,79	9,9	0,11	3,32	5	1,68
22,36	22,02	0,34	9,43	8	1,43	8,63	10,4	1,77	3,00	3,6	0,60
23,98	23,1	0,88	9,55	9,1	0,45	10,14	9,8	0,34	3,15	3,6	0,45
23,69	23,58	0,11	8,56	11,3	2,74	10,96	11,1	0,14	3,45	3,8	0,35
24,77	24,85	0,08	9,06	8,5	0,56	10,71	10,7	0,01	2,71	4,4	1,69
22,85	22,39	0,46	8,93	9,3	0,37	9,66	9,9	0,24	3,21	3,4	0,19

Média	22,90	22,88	0,83	8,59	8,83	0,71	10,14	10,34	0,62	3,60	3,77	0,94
Desvio Padrão	1,38	1,33		0,72	0,99		0,80	0,64		0,79	0,61	

Tabela 21 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Manutenção Mix..

Ano 2016 (Manutenção Mix)											
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta		
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação
22,77	23,95	1,18	8,66	8,9	0,24	10,38	10,4	0,02	4,26	3,5	0,76
22,30	23,09	0,79	8,22	9	0,78	11,03	10,7	0,33	4,67	3,6	1,07
23,79	23,96	0,17	8,98	9,1	0,12	10,47	10,9	0,43	4,42	3,2	1,22
22,81	22,26	0,55	8,86	8	0,86	9,04	9,8	0,76	3,92	3,7	0,22
24,28	23,2	1,08	9,14	7,8	1,34	8,50	8,8	0,30	3,92	3,9	0,02
22,71	22,75	0,04	8,10	7,4	0,70	9,28	9,6	0,32	4,69	3,8	0,89
22,56	23,55	0,99	7,56	7,3	0,26	10,36	10,4	0,04	4,83	3,5	1,33
20,94	22,59	1,65	6,71	8,4	1,69	11,66	10,5	1,16	4,62	3,3	1,32
21,33	20,84	0,49	8,74	8,3	0,44	10,09	9,9	0,19	3,07	3,6	0,53
23,36	21,91	1,45	9,30	7,1	2,20	10,43	9,6	0,83	3,29	4	0,71
22,72	21,25	1,47	9,66	8,1	1,56	10,01	9,2	0,81	4,12	3,6	0,52

Média	22,69	22,67	0,90	8,54	8,13	0,93	10,11	9,98	0,47	4,17	3,61	0,78
Desvio Padrão	0,96	1,03		0,85	0,69		0,90	0,66		0,58	0,24	

Tabela 22 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Cachorros.

Ano 2016 (Cachorros)											
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta		
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação
25,15	28,85	3,70	11,24	11,3	0,06	11,51	12	0,49	4,95	3,2	1,75
29,11	30,06	0,95	12,17	12,1	0,07	10,71	12,5	1,79	3,44	3,5	0,06
30,19	30,94	0,75	11,61	9,9	1,71	9,95	11,5	1,55	3,70	4,2	0,50
29,99	32,77	2,78	12,50	11,4	1,10	11,13	12,7	1,57	3,92	3,4	0,52
31,54	30,84	0,70	12,66	10,9	1,76	11,22	12,8	1,58	3,72	4,3	0,58
29,62	27,69	1,93	11,44	10,5	0,94	11,97	13,2	1,23	2,99	4,1	1,11
30,35	28,46	1,89	11,73	11,6	0,13	12,61	14,2	1,59	3,32	4,4	1,08
29,59	28,22	1,37	11,66	11,8	0,14	11,99	12,8	0,81	3,36	5,7	2,34
30,93	29,94	0,99	12,44	12,5	0,06	11,65	12,7	1,05	3,30	3	0,30
31,80	31,32	0,48	10,78	11,3	0,52	12,00	11,6	0,40	3,96	3,6	0,36
28,62	28,72	0,10	10,65	11	0,35	11,21	12,2	0,99	3,33	3,4	0,07

Média	29,72	29,80	1,42	11,72	11,30	0,62	11,45	12,56	1,19	3,63	3,89	0,79
Desvio Padrão	1,80	1,56		0,67	0,73		0,72	0,76		0,52	0,76	

Tabela 23 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Alta Energia.

Ano 2016 (Alta Energia)											
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta		
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação
28,71	28,04	0,67	13,56	11,8	1,76	9,95	11	1,05	3,36	4,4	1,04
28,05	27,73	0,32	13,01	14	0,99	10,52	11,7	1,18	4,10	4	0,10
26,25	27,94	1,69	12,33	9,1	3,23	10,50	11,6	1,10	4,13	3,6	0,53
29,03	28,42	0,61	12,32	10,3	2,02	11,65	11,7	0,05	4,24	3,7	0,54
28,03	26,93	1,10	12,63	11,2	1,43	13,35	12,8	0,55	2,83	3,6	0,77
29,02	27,04	1,98	12,07	11	1,07	12,77	13,7	0,93	2,57	4,8	2,23
27,71	26,44	1,27	12,69	6,3	6,39	10,61	11,5	0,89	3,51	3,6	0,09
30,21	27,54	2,67	11,09	12,2	1,11	11,45	12,5	1,05	2,88	3,1	0,22
28,88	29,38	0,50	12,34	11,4	0,94	11,77	12,1	0,33	3,64	3,3	0,34

Média	28,43	27,72	1,20	12,45	10,81	2,10	11,40	12,07	0,79	3,47	3,79	0,65
Desvio Padrão	1,10	0,88		0,68	2,15		1,13	0,82		0,61	0,53	

Tabela 24 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Alta Energia Extra.

Ano 2016 (Alta Energia Extra)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
33,04	31,49	1,55	14,96	12,7	2,26	13,43	12,5	0,93	1,70	3,1	1,40	
31,37	30,44	0,93	13,88	11,5	2,38	13,21	14,1	0,89	2,64	4,9	2,26	
31,64	29,82	1,82	13,07	13	0,07	11,97	13,3	1,33	3,37	3,8	0,43	
29,84	28,29	1,55	14,29	13,3	0,99	12,78	13,6	0,82	2,90	2,9	0,00	
30,92	31,51	0,59	12,70	18,9	6,20	12,27	11,9	0,37	3,25	3,1	0,15	
30,87	29,98	0,89	13,57	12,4	1,17	11,86	11,9	0,04	2,91	3,7	0,79	
31,44	30,42	1,02	11,97	10,4	1,57	13,04	12,3	0,74	3,33	4,7	1,37	
Média	31,30	30,28	1,19	13,49	13,17	2,09	12,65	12,80	0,73	2,87	3,74	0,91
Desvio Padrão	0,97	1,10		1,01	2,71		0,62	0,87		0,58	0,80	

Tabela 25 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2016 para o alimento Gatos.

Ano 2016 (Gatos Mix)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
27,25	30,18	2,93	11,57	12,2	0,63	11,97	11,4	0,57	4,54	3,5	1,04	
29,14	30,58	1,44	13,27	12,1	1,17	10,34	10,7	0,36	3,90	3,3	0,60	
28,94	29,02	0,08	11,98	11,2	0,78	11,01	12,7	1,69	3,92	3,3	0,62	
27,75	30,09	2,34	11,24	13,6	2,36	10,94	11,3	0,36	4,15	3,2	0,95	
27,84	29,99	2,15	11,31	11,7	0,39	11,91	11,9	0,01	4,94	4,1	0,84	
31,41	33,81	2,40	13,05	11,3	1,75	11,85	14,6	2,75	3,91	3,2	0,71	
28,78	31,17	2,39	13,55	11,8	1,75	11,11	12,8	1,69	4,49	6,4	1,91	
30,19	27,47	2,72	12,18	13,4	1,22	12,31	13,1	0,79	4,12	3,3	0,82	
30,07	29,35	0,72	11,71	11	0,71	11,84	13,7	1,86	4,26	3,4	0,86	
28,56	27,55	1,01	12,05	11,3	0,75	12,78	13,4	0,62	2,57	3,3	0,73	
31,32	29,61	1,71	12,82	11,6	1,22	14,23	13,5	0,73	2,78	3,7	0,92	
30,01	29,51	0,50	12,59	12,2	0,39	13,82	12,6	1,22	2,70	3,7	1,00	
28,80	27,68	1,12	12,01	12,8	0,79	12,22	12,3	0,08	3,02	4,1	1,08	
28,54	27,6	0,94	12,32	12,4	0,08	12,49	12,6	0,11	3,56	3,6	0,04	
28,42	26,97	1,45	11,14	11,1	0,04	12,41	12,9	0,49	3,35	3,3	0,05	
31,91	30,74	1,17	11,64	12,6	0,96	12,94	12,1	0,84	3,21	3,3	0,09	
31,83	31,37	0,46	12,42	12,6	0,18	10,79	12,5	1,71	3,04	2,9	0,14	
34,13	32,66	1,47	12,26	12,9	0,64	12,88	12,9	0,02	3,69	4,6	0,91	
Média	29,72	29,74	1,50	12,17	12,10	0,88	12,10	12,61	0,88	3,68	3,68	0,74
Desvio Padrão	1,80	1,86		0,69	0,79		1,03	0,93		0,69	0,79	

Valores 2017

Tabela 26 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Manutenção.

Ano 2017 (Manutenção)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
21,49	22,72	1,23	8,15	10,5	2,35	9,1	10	0,9	3,22	3	0,22	
21,75	21,06	0,69	8,86	10,2	1,34	8,93	9,4	0,47	3,14	4,1	0,96	
22,36	22,06	0,3	8,42	8	0,42	8,53	9	0,47	3,23	3,5	0,27	
21,84	22,06	0,22	7,65	7,1	0,55	9,62	7	2,62	3,15	4,7	1,55	
22,92	22,06	0,86	8,85	8,2	0,65	9,05	9,2	0,15	3	3,2	0,2	
20,59	19,79	0,8	8,07	7,2	0,87	8,98	8,6	0,38	3,27	3,4	0,13	
21,92	21,48	0,44	9,53	8,2	1,33	10,02	9	1,02	3,07	3,4	0,33	
Média	21,84	21,60	0,65	8,50	8,49	1,07	9,18	8,89	0,86	3,15	3,61	0,52
Desvio Padrão	0,72	0,95		0,63	1,35		0,49	0,94		0,10	0,59	

Tabela 27 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Manutenção Mix.

Ano 2017 (Manutenção Mix)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
21,75	21,56	0,19	7,88	8,3	0,42	8,65	9,3	0,65	3,11	3,6	0,49	
22,63	20,84	1,79	8,47	8,7	0,23	10,38	9,5	0,88	3,4	4,8	1,4	
20,97	20,6	0,37	8,12	8,4	0,28	8,81	9,1	0,29	3,27	3,9	0,63	
21,41	20,84	0,57	8,04	8,7	0,66	9,07	9,5	0,43	3,08	4,8	1,72	
21,97	22,15	0,18	9,16	7,8	1,36	8,97	9,1	0,13	2,9	3,4	0,5	
21,55	20,46	1,09	8,57	7,2	1,37	9,37	9,7	0,33	3,29	3,4	0,11	
23,13	23,04	0,09	8,83	9,2	0,37	9,34	8,7	0,64	3,07	3,5	0,43	
22,96	22,09	0,87	9,51	7,8	1,71	8,67	9,2	0,53	3,06	3,7	0,64	
Média	22,05	21,45	0,64	8,57	8,26	0,80	9,16	9,26	0,49	3,15	3,89	0,74
Desvio Padrão	0,78	0,92		0,57	0,64		0,56	0,31		0,16	0,59	

Tabela 28 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Cachorros.

Ano 2017 (Cachorros)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
30,39	29,31	1,08	11,13	11,3	0,17	11,86	13,1	1,24	3,01	3	0,01	
30,5	30,34	0,16	11,77	10,5	1,27	12,45	12,8	0,35	3,22	3,3	0,08	
31,92	30,77	1,15	11,99	11,5	0,49	10,12	12	1,88	2,82	3,3	0,48	
29,55	28,17	1,38	11,55	11,7	0,15	11,36	11	0,36	2,81	3	0,19	
Média	30,59	29,65	0,94	11,61	11,25	0,52	11,45	12,23	0,96	2,97	3,15	0,19
Desvio Padrão	0,98	1,16		0,37	0,53		0,99	0,94		0,19	0,17	

Tabela 29 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Alta Energia.

Ano 2017 (Alta Energia)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
29,93	29,26	0,67	12,49	13	0,51	11,13	12,1	0,97	3,12	3	0,12	
26,77	26,62	0,15	12,53	12,2	0,33	10,73	10,9	0,17	2,79	2,9	0,11	
32,56	31,41	1,15	13,05	11	2,05	11,62	11,3	0,32	2,99	3	0,01	
Média	29,75	29,10	0,66	12,69	12,07	0,96	11,16	11,43	0,49	2,97	2,97	0,08
Desvio Padrão	2,90	2,40		0,31	1,01		0,45	0,61		0,17	0,06	

Tabela 30 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Alta Energia Extra.

Ano 2017 (Alta Energia Extra)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
31,85	32,31	0,46	13,09	12,2	0,89	11,86	12,2	0,34	2,9	3,3	0,4	
30,82	30,86	0,04	13,01	12,1	0,91	12,83	12,7	0,13	3,23	4	0,77	
Média	31,34	31,59	0,25	13,05	12,15	0,90	12,35	12,45	0,24	3,07	3,65	0,59
Desvio Padrão	0,73	1,03		0,06	0,07		0,69	0,35		0,23	0,49	

Tabela 31 Resultados obtidos pelo NIR e pelas análises externas no ano 2017 para o alimento Gatos.

Ano 2017 (Gatos)												
Proteína Bruta			Gordura Bruta			Cinza Bruta			Fibra Bruta			
Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	Análise NIR	Análise Externa	Variação	
30,39	29,31	1,08	11,13	11,3	0,17	11,86	13,1	1,24	3,01	3	0,01	
30,5	30,34	0,16	11,77	10,5	1,27	12,45	12,8	0,35	3,22	3,3	0,08	
31,92	30,77	1,15	11,99	11,5	0,49	10,12	12	1,88	2,82	3,3	0,48	
29,55	28,17	1,38	11,55	11,7	0,15	11,36	11	0,36	2,81	3	0,19	
29,83	29,48	0,35	10,9	11,7	0,8	10,22	12	1,78	3,01	3,1	0,09	
29,41	28,81	0,6	11,23	11,7	0,47	11,87	12,5	0,63	3,31	5,9	2,59	
27,75	28,19	0,44	11,81	12,7	0,89	11,21	11	0,21	3,12	3,4	0,28	
29,41	28,81	0,6	11,23	11,7	0,47	11,87	12,5	0,63	3,31	5,9	2,59	
30,35	28,84	1,51	12,91	12	0,91	11,24	12	0,76	2,85	3,4	0,55	
28,02	28,8	0,78	11,83	10,5	1,33	12,29	11,3	0,99	3,26	3,4	0,14	
Média	29,71	29,15	0,81	11,64	11,53	0,69	11,45	12,02	0,88	3,07	3,77	0,70
Desvio Padrão	1,22	0,85		0,57	0,66		0,79	0,73		0,20	1,13	