



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Modelação através de espectroscopia de infravermelho próximo para estimar os teores de proteína, fibra e humidade em pastagens permanentes

Ângelo David Ferreira Nunes Carapau

Orientador(es) | João Manuel Serrano

Ana Elisa Rato

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Modelação através de espectroscopia de infravermelho próximo para estimar os teores de proteína, fibra e humidade em pastagens permanentes

Ângelo David Ferreira Nunes Carapau

Orientador(es) | João Manuel Serrano
Ana Elisa Rato

Évora 2022



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Elisa Rato (Universidade de Évora) (Orientador)
Elvira Sales-Baptista (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

Com a conclusão desta dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agronómica, irei terminar o meu percurso académico. E deste modo quero agradecer a todos que contribuíram para que tal fosse possível.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais pelo seu apoio no decurso do meu percurso académico, de licenciatura e mestrado.

Agradecimento especial à minha namorada Diana por todo o seu apoio, motivação e incentivo para a realização deste mestrado, bem como a sua ajuda na elaboração deste trabalho.

Para a realização desta dissertação, um enorme agradecimento ao Professor Doutor João Manuel Serrano, orientador desta dissertação, pela proposta de dissertação, por toda a sua ajuda, paciência e compreensão que teve durante o decurso da mesma.

Quero agradecer à Professora Doutora Ana Elisa Rato, coorientadora desta dissertação por ter aceitado o convite e por toda a sua ajuda e disponibilidade durante o decurso desta dissertação.

Agradecimento ao Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Universidade de Évora, com especial agradecimento à Engenheira Graça Machado e D^a Margarida Romão pela ajuda e colaboração no processamento das amostras de pastagem e sua análise química.

A todos os Docentes da Universidade de Évora que tive o prazer de conhecer e que me transmitiram o seu conhecimento e ajudaram durante o meu percurso académico.

Um agradecimento a todos os meus colegas de trabalho, em especial ao Engenheiro Rodolfo Pinto e à Engenheira Carla Rocha pela motivação, ajuda e compreensão de quando necessitei de tirar férias para a realização deste trabalho.

Por último quero agradecer a todos os meus amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para o culminar da minha formação académica.

A todos um grande e sincero obrigado!

Resumo

Este trabalho tem como objetivo a avaliação da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (NIR-FT) combinada com análise multivariada para estimar a qualidade (proteína bruta, PB a fibra, NDF e a humidade, HP) de pastagens biodiversas de sequeiro (amostras secas e verdes) ao longo do ciclo vegetativo de 2020. Foram desenvolvidos modelos de calibração e validação através do algoritmo de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR), executando transformações dos espectros e selecionando os melhores modelos tendo por base os valores mais elevados do coeficiente de determinação (R^2) e do RPD (“Residual Prediction Deviation”), e os valores mais baixos de RMSE (“Root Mean Square Error”) e do Bias (erro sistemático).

Nas medições realizadas com amostras de pastagem seca, para a previsão da PB obtiveram-se os seguintes parâmetros: $R^2 = 0,935$; RMSE = 1,174; RPD = 4,01; Bias = 0,031. Já para a fibra (NDF) obtiveram-se os seguintes parâmetros: $R^2 = 0,911$; RMSE = 2,752; RPD = 3,48; Bias = -0,438. Nas medições realizadas com amostras de pastagem verde, os melhores resultados para a PB e NDF foram os seguintes: $R^2 = 0,707$ e $0,724$; RMSE = 3,303 e 3,241; RPD = 1,88 e 2,38; Bias = -0,049 e -0,045, respetivamente. O melhor modelo de previsão da HP conduziu aos seguintes resultados: $R^2 = 0,839$; RMSE = 3,517; RPD = 2,72; Bias = 0,101.

Deste estudo conclui-se que, através da técnica NIR-FT se podem prever de forma expedita e com elevada precisão, os parâmetros de qualidade (PB e NDF) da pastagem biodiversa de sequeiro, com base em amostras de pastagem seca, justificando-se, no entanto, continuar a desenvolver trabalhos que permitam aferir a fiabilidade da técnica com amostras de pastagem verde (não processadas).

Palavras-chave: NIRS, proteína; fibra; pastagem biodiversa de sequeiro.

Modeling using near-infrared spectroscopy to estimate protein, fiber and moisture content in permanent pastures

Abstract

The purpose of this work was to evaluate the Fourier transform near infrared spectroscopy (NIR-FT) combined with multivariate analysis, to estimate the quality (crude protein, CP, fiber, NDF, and moisture, HP) of biodiverse dryland pastures (dry and green samples) throughout the 2020 growing season. Calibration and validation models were developed using the partial least squares regression algorithm (PLSR), performing spectral transformations treatment and selecting the best models based on the highest values of the coefficient of determination (R^2) and of residual prediction deviation (RPD) and the lowest values of the root mean square error (RMSE) and Bias.

In the measurements carried out with dry pasture samples the following parameters were obtained in terms of prediction of CP: $R^2 = 0.935$; RMSE = 1.174; RPD = 4.01; Bias = 0.031. For fiber (NDF), the following parameters were obtained: $R^2 = 0.911$; RMSE = 2.752; RPD = 3.48; Bias = -0.438. In measurements with green pasture samples, the best results for PB and NDF were respectively: $R^2 = 0.707$ and 0.724; RMSE = 3.303 and 3.241; RPD = 1.88 and 2.38; Bias = -0.049 and -0.045. The best prediction model for HP led to the following results: $R^2 = 0.839$; RMSE = 3.517; RPD = 2.72; Bias = 0.101.

The results of this study indicate that by resorting to the NIR-FT technique, the quality parameters (PB and NDF) of dryland biodiverse pasture can be predicted quickly and with high accuracy, based on dry pasture samples. Further studies are required to develop methodologies for assessing the reliability of this technique with green pasture samples (unprocessed).

Keywords: NIRS; protein; fiber; biodiverse dryland pasture.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras	vi
Índice de quadros	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução.....	1
2. Pastagens de sequeiro biodiversas no ecossistema Montado	3
2.1. Características gerais do ecossistema Montado.....	3
2.2. Tipos de pastagens.....	3
2.3. Variabilidade da produtividade e da qualidade das pastagens	6
2.4. Métodos de referência para determinação da proteína bruta e da fibra da pastagem.....	7
2.5. Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS)	8
2.6. Os princípios da técnica baseada na espectroscopia de infravermelho próximo.....	9
3. Materiais e métodos.....	12
3.1. Locais de amostragem.....	12
3.2. Recolha de amostras	14
3.3. Processamento laboratorial das amostras de pastagem.....	14
3.4. Proteína bruta e fibra em detergente neutro - Análises de referência.	15
3.5. Aquisição de espectros	15
3.6. Tratamento e análise estatística dos espectros	16
4. Resultados e discussão	17
4.1. Variabilidade espacial e temporal dos parâmetros medidos	17

4.2. Análise dos resultados obtidos com a técnica NIRS	22
4.3. Comparação entre os valores de referência e os valores estimados pelos modelos NIRS estabelecidos para os parâmetros em estudo	31
5. Conclusão.....	36
6. Referências bibliográficas.....	37

Índice de figuras

Figura 1 - Curvas de crescimento anual da pastagem, em kg MS/ha/mês, nas condições de sequeiro Mediterrânico em quatro anos típicos (adaptado de Efe Serrano, 2006)	5
Figura 2 - Gráfico Termopluiométrico da estação meteorológica da Mitra – Universidade de Évora, de Setembro de 2015 a Julho de 2018 (adaptado de Serrano et al., 2018).....	6
Figura 3 - Delimitação e corte das amostras de pastagem no campo.....	14
Figura 4 - Temperatura média mensal nos distritos de Beja, Évora, Portalegre e Guarda, no período de Julho de 2019 a Junho de 2020 (adaptado de Serrano et al., 2021).	17
Figura 5 - Precipitação total mensal e precipitação total acumulada nos distritos de Beja, Évora, Portalegre e Guarda, no período de Julho de 2019 a Junho de 2020 (adaptado de Serrano et al., 2021).....	18
Figura 6 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens desidratadas sem qualquer tratamento de optimização para o modelo de previsão da proteína bruta (PB).....	27
Figura 7 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens desidratadas após optimização com o pré-tratamento “derivada de 1ª ordem” para o modelo de previsão da fibra (NDF).	28
Figura 8 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens verdes após filtragem.....	29
Figura 9 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens verdes, após optimização com os pré-tratamentos “SNV + derivada de 2ª ordem”, para o modelo de previsão da humidade da pastagem (HP).	30
Figura 10 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens verdes após optimização com o pré-tratamento “derivada de 1ª ordem” para os modelos de previsão da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF).....	30
Figura 11 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a proteína bruta (PB) em pastagens desidratadas.	31
Figura 12 - Valores de referência versus valores de estimados pelo modelo para a fibra (NDF) em pastagens desidratadas.....	32

Figura 13 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a humidade da pastagem (HP) em pastagens verdes.	33
Figura 14 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a proteína bruta (PB) em pastagens verdes.....	33
Figura 15 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a fibra (NDF) em pastagens verdes.	34

Índice de quadros

Quadro 1 - Locais de recolha de amostras e caracterização das parcelas experimentais.....	12
Quadro 2 - Média, desvio padrão (DP) e amplitude (intervalo de variação) dos valores de referência da humidade da pastagem (HP), da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) para o conjunto dos nove campos experimentais em diferentes datas de amostragem (S-pastagem seca; F-pastagem fresca ou verde).	20
Quadro 3 - Estatística descritiva para os modelos de calibração e validação da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) em pastagens secas usando os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) e regressão dos erros quadrados parciais (PLSR).	24
Quadro 4 - Estatística descritiva para os modelos de calibração e validação da humidade da pastagem (HP), da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) em pastagens verdes usando os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) e regressão dos erros quadrados parciais (PLSR). * pré-processamento selecionado	25

Lista de abreviaturas

ADF – Fibra insolúvel em detergente ácido

DP – Desvio padrão

HP – Humidade da pastagem

MS – Matéria seca

MV – Matéria verde

NDF – Fibra insolúvel em detergente neutro

NIR-FT – Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier

NIRS – Espectroscopia de infravermelho próximo

PB – Proteína bruta

PLSR – Regressão dos mínimos quadrados parciais

R² – Coeficiente de determinação

RMSE – Raiz quadrada média do erro

RPD – Desvio residual de predição

SNV – Variação de padrão normal

1. Introdução

O crescimento da população mundial e, conseqüentemente, da procura por alimentos estão a provocar uma forte pressão na agricultura, tanto ao nível da produção vegetal como da produção animal. A produção vegetal constitui a base da alimentação da produção animal, e a alimentação humana está dependente destes dois tipos de produção de alimentos (Santos, 2018). O impacto das alterações climáticas e o aumento do custo dos fatores de produção levam a que o sector primário tenha necessidade de otimizar este processo, de modo a rentabilizar fatores de produção e a melhorar a produção vegetal e animal.

Entende-se por pastagem, segundo Moreira (2002), «Cultura ou comunidade de plantas, geralmente herbáceas, aproveitadas pelos animais em pastoreio, predominantemente no próprio local em que crescem, e, portanto, sujeitas diretamente à sua ação de preensão, ingestão (desfoliação), pisoteio e dejeção». As pastagens são a base da produção animal em regime extensivo, nomeadamente de bovinos, ovinos e caprinos, constituindo as forragens, sob a forma de feno ou silagem, suplemento alimentar dos animais nos períodos de carência (Santos, 2018).

No Alentejo, a produção animal em regime extensivo encontra-se associada ao Montado. Este é um ecossistema característico da região Mediterrânica e que cobre, na Península Ibérica, uma área compreendida entre 3,5 e 4 Milhões de hectares, representando cerca de 33 % da área de floresta em Portugal (Serrano et al., 2018). O Montado pode também ser encontrado noutras regiões do Mediterrâneo tais como Itália, Grécia, Argélia ou Marrocos. A sinergia entre animais em pastoreio, árvores e pastagens que se desenvolvem em solos normalmente pobres e pouco profundos, conferem diversidade e complexidade a este ecossistema (Serrano et al., 2018). A produção de pastagens nestas condições de sequeiro no Alentejo está dependente do regime de precipitação e do conseqüente armazenamento de água no solo. De acordo com a classificação de Köppen, o clima Mediterrâneo caracteriza-se pela ausência de precipitação durante os meses quentes da estação do Verão e por uma importante irregularidade interanual da precipitação nas restantes estações do ano, o que afeta e condiciona o ciclo vegetativo das pastagens e, conseqüentemente, a sua

disponibilidade e qualidade (Efe Serrano, 2006; Serrano et al., 2018; Serrano et al., 2020). Neste contexto de variabilidade, numa exploração agrícola com animais em pastoreio, a monitorização da evolução da pastagem ao longo do ano é fundamental. O conhecimento da quantidade e qualidade da pastagem é muito importante no apoio à tomada de decisão quanto às necessidades de suplementação alimentar. A qualidade, está relacionada com o teor em proteína bruta (PB) e fibra (NDF), parâmetros que variam ao longo do ciclo vegetativo: a PB apresenta valores mais elevados no início do ciclo, quando as plantas são jovens e diminui à medida que o ciclo avança, com a diminuição da proporção de folhas e o aumento da proporção das paredes celulares (Santos, 2018); os teores de fibra tendem a apresentar um padrão inverso (Serrano et al., 2020).

O conhecimento do valor nutritivo da pastagem e da sua variabilidade são a base para que os produtores possam decidir sobre as necessidades de suplementação alimentar, procurando maximizar os recursos disponíveis e diminuir os custos de produção, os quais podem representar até 70% dos custos variáveis da produção animal (Bell et al., 2018). Os métodos de referência para obtenção da PB e da fibra, baseados em processamento laboratorial, são trabalhosos, relativamente caros e demorados em termos de obtenção de resultados, tornando-se assim impraticáveis no dia-a-dia da gestão de uma exploração agropecuária (Serrano et al., 2020). Algumas propostas têm sido estudadas para contornar as limitações que esta metodologia standard apresenta. A espectroscopia de infravermelho próximo (near-infrared spectroscopy, NIRS), baseada na medição da absorção do espectro eletromagnético, é uma abordagem tecnológica reconhecidamente aceite para estimativa rápida da qualidade dos alimentos, da composição e das propriedades de materiais ou produtos, como por exemplo, medicamentos, produtos agrícolas e bebidas, entre outras (Lugassi et al., 2015).

Este estudo tem por objetivo avaliar o potencial da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (NIR-FT) combinada com análise multivariada, para estimar, de forma expedita, a evolução de parâmetros de qualidade (proteína bruta, fibra e humidade) de pastagens biodiversas de sequeiro ao longo do ciclo vegetativo.

2. Pastagens de sequeiro biodiversas no ecossistema Montado

2.1. Características gerais do ecossistema Montado

O Montado é um ecossistema agro-silvo-pastoril, característico da região Mediterrânica, que conjuga a silvicultura, com a produção de pastagens e a produção animal (Barreto, 2015; Serrano et al., 2018). Geralmente está associado a solos pobres, com pH ácido, baixo teor de matéria orgânica, pouco profundos e que frequentemente apresentam afloramentos rochosos e declives acentuados (Serrano et al., 2018). Estas condições tornam inviáveis economicamente culturas relativamente exigentes ao nível da fertilidade do solo ou da mecanização, nomeadamente os cereais, o olival ou a vinha. Assim a presença das pastagens é uma alternativa para garantir a produtividade e a biodiversidade deste ecossistema, sustentando a produção animal em regime extensivo em solos que, de outra forma, seriam considerados improdutivo. No Montado as pastagens, na grande maioria, permanentes e de sequeiro, naturais ou semeadas, desenvolvem-se sob sobreiros (*Quercus Suber* L.) ou azinheiras (*Quercus ilex ssp. Rotundifolia* Lam.). Estas espécies arbóreas estão muito bem adaptadas às condições de sequeiro e às elevadas temperaturas que se verificam durante os meses de Verão (Martins, 2015; Serrano et al., 2018, 2020; Martins, 2020), características do clima temperado Mediterrânico «Csa» («hot-summer Mediterranean climate»), de acordo com a classificação climática de Köppen–Geiger.

2.2. Tipos de pastagens

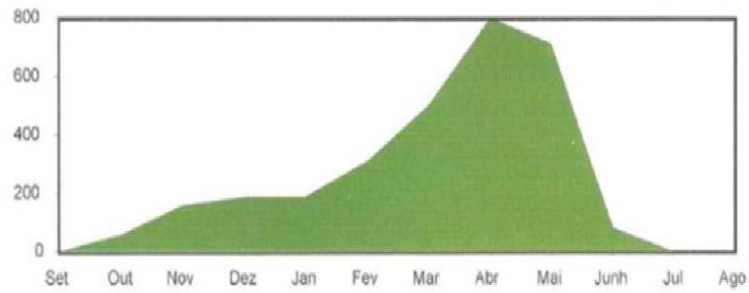
As pastagens, por definição, são aproveitadas pelos animais no próprio local onde se desenvolvem (Barreto, 2015; Barros e Freixial, 2012; Moreira, 2002). A composição florística deverá ser adaptada ao tipo de pastoreio e ao pisoteio por parte dos animais. As espécies que as constituem deverão apresentar estrutura baixa, de porte prostrado ou subprostrado, de modo a conseguir suportar a pressão do pastoreio e o esmagamento provocado pela deslocação dos animais pelo campo (Barros e Freixial, 2012; Moreira, 2002).

As pastagens podem ser classificadas tendo em conta três critérios: (i) quanto à sua origem, podendo ser naturais ou espontâneas (sem intervenção do Homem), ou semeadas (quando há introdução de espécies selecionadas); (ii) quanto ao

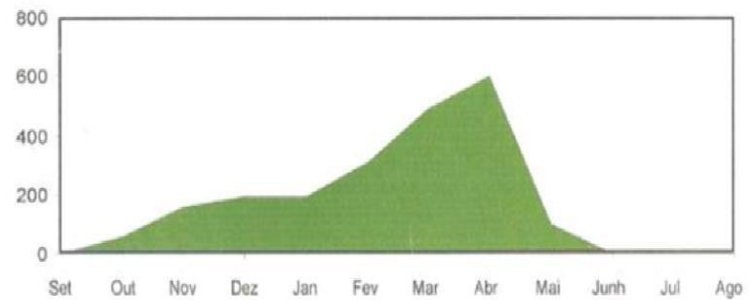
período de tempo que permanecem no solo, podendo ser denominadas permanentes (quando permanecem um período de tempo indeterminado), ou temporárias (o seu ciclo vegetativo corresponde a um curto período de tempo, sendo geralmente inseridas em regime de rotação de culturas); e (iii) conforme o seu regime hídrico, assumindo a designação de sequeiro (quando apenas beneficiam da água proveniente da precipitação), ou de regadio (providas de rega nos períodos de seca, mantendo o seu potencial produtivo ao longo do ano, principalmente durante o período do Verão Mediterrâneo) (Barreto, 2015; Barros e Freixial, 2012; Efe Serrano, 2006; Moreira, 2002; Santana, 2017).

As pastagens naturais, com o passar dos anos, com inadequada condução do pastoreio, sem adubação e perante a irregularidade climática característica, tendem a perder potencial produtivo e biodiversidade. É, por isso, comum a melhoria das pastagens quer através da regular reposição dos níveis de nutrientes no solo e da correcção do pH, quer pela ressemeadura de espécies botânicas, normalmente consociação de gramíneas e leguminosas bem adaptadas às condições edafoclimáticas (Barros e Freixial, 2012; Moreira, 2002).

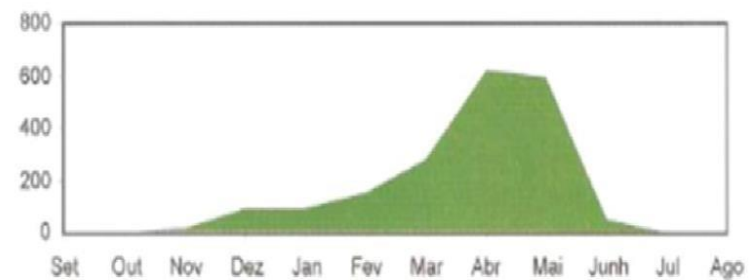
Estas pastagens biodiversas apresentam vantagens em relação às pastagens naturais ou às culturas forrageiras baseadas numa só espécie botânica ou num número reduzido de espécies. A diversidade que apresentam, dispendo de sistemas radiculares variados, na sua forma, profundidade explorada e densidade de feixes radiculares, contribuem para a melhoria das características físicas, químicas e biológicas dos solos (Barros e Freixial, 2012). A adaptação das várias espécies e cultivares, com ciclos vegetativos diferentes, às diferentes condições do solo (profundidade, pH, disponibilidade de água ou fertilidade) acaba por estabilizar a produção de matéria vegetal da pastagem, minimizando as flutuações que tendem a verificar-se nas pastagens de sequeiro (figura 1) devido à irregularidade climática interanual (figura 2) (Barros e Freixial, 2012; Efe Serrano, 2006; Moreira, 2002). As leguminosas, por exemplo, para além de conferirem um maior valor nutritivo à pastagem, contribuem para a fertilidade do solo, uma vez que através da simbiose com a bactéria *Rhizobium*, fixam o azoto atmosférico e incorporam-no no solo (Barros e Freixial, 2012; Efe Serrano, 2006; Moreira, 2002).



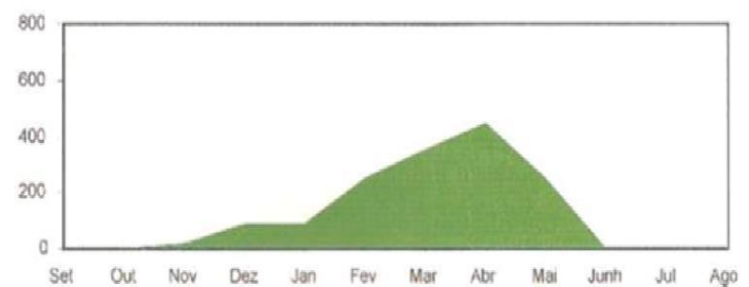
a) Ano Outono e Primavera húmidos (3000 kg MS/ha/ano)



b) Ano Outono húmido e Primavera seca (2100 kg MS/ha/ano)



c) Ano Outono seco e Primavera húmida (1900 kg MS/ha/ano)



d) Ano Outono e Primavera secos (1500 kg MS/ha/ano)

Figura 1 - Curvas de crescimento anual da pastagem, em kg MS/ha/mês, nas condições de sequeiro Mediterrânico em quatro anos típicos (adaptado de Efe Serrano, 2006)

2.3. Variabilidade da produtividade e da qualidade das pastagens

Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, o clima Mediterrânico “Csa” apresenta Verão quente e seco, com a temperatura máxima a poder ultrapassar os 40°C, e Invernos frios, com temperaturas mínimas médias próximas de 0°C, e uma irregularidade da precipitação ao longo dos meses de Outono, Inverno e Primavera, com uma precipitação anual acumulada que pode variar entre 400 e 600 mm. Na figura 2 podem observar-se os registos da estação meteorológica da Mitra (Universidade de Évora), entre Setembro de 2015 e Julho de 2018. No ano de 2015/2016 verificou-se uma precipitação anual acumulada de 465 mm, já para o ano de 2016/2017 verificou-se uma precipitação anual acumulada de apenas 413 mm. Devido a esta irregularidade da precipitação e da temperatura as pastagens associadas ao Montado apresentam uma importante flutuação sazonal na produtividade (figura 1) (Barreto, 2015; Efe Serrano, 2006; Serrano et al., 2018, 2020).

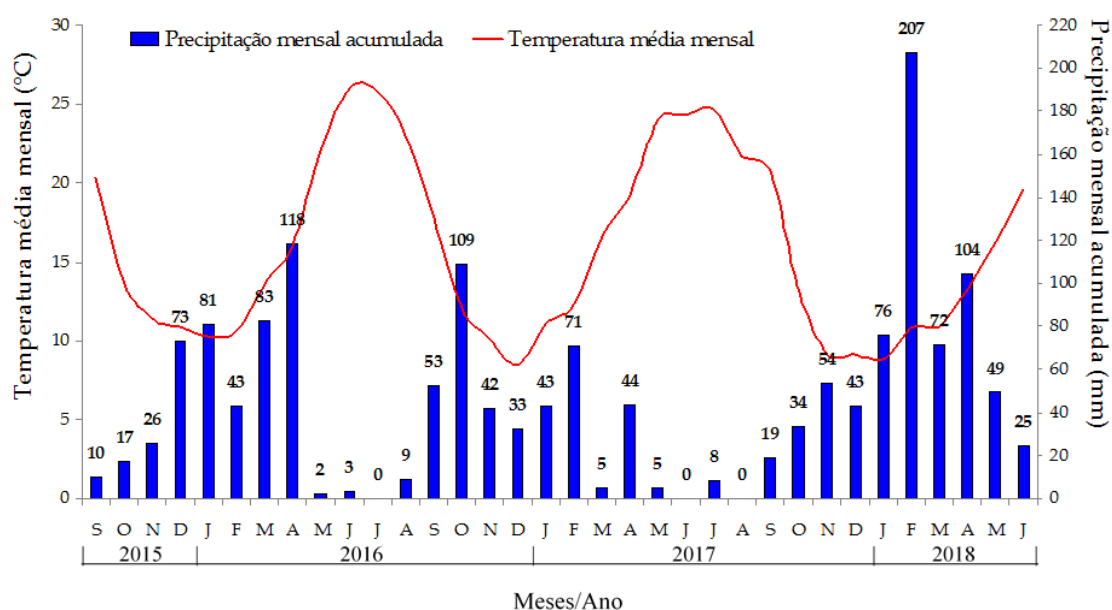


Figura 2 - Gráfico Termopluiométrico da estação meteorológica da Mitra – Universidade de Évora, de Setembro de 2015 a Julho de 2018 (adaptado de Serrano et al., 2018)

A produção de pastagem neste contexto climático apresenta duas fases críticas: (i) no período de Outono-Inverno, se as primeiras chuvas de Outono surgirem tarde, retardando a emergência das plantas, e também porque as temperaturas de Inverno são relativamente baixas, conjugadas com a ocorrência de geadas, provocando a dormência das plantas; e (ii) no período de Verão, em que as

elevadas temperaturas e a ausência de precipitação desencadeiam o final do ciclo vegetativo das plantas, antecedido da quebra do seu valor nutritivo (Barreto, 2015; Efe Serrano, 2006; Moreira, 2002). Em oposição, durante a Primavera, a conjugação da subida da temperatura com a presença de humidade no solo leva ao pico de produção. Neste período a disponibilidade de pastagem é superior à capacidade de ingestão pelos animais em pastoreio, sendo possível o corte e conservação de parte da erva não consumida, podendo ser utilizada como suplemento alimentar durante os meses de escassez (Efe Serrano, 2006; Moreira, 2002; Santos, 2018).

A irregularidade interanual da precipitação também afeta a variabilidade da qualidade das pastagens. Em anos de Primavera pouco chuvosa, a produção vegetal para além de ser menor, com o ciclo das plantas a terminar mais cedo, é acompanhada de uma diminuição muito acentuada da qualidade, podendo os teores de PB situar-se abaixo das necessidades de manutenção dos animais, levando à necessidade de antecipar a suplementação alimentar (Serrano et al., 2020).

É neste contexto de imprevisibilidade que os gestores agrícolas ligados à produção animal extensiva têm que tomar decisões, relacionadas com o encabeçamento animal, com a rotação dos animais entre parques ou com a suplementação alimentar (Serrano et al., 2019, 2021).

O conhecimento da variabilidade da produtividade e, especialmente, da qualidade da pastagem é fundamental para sustentar estas decisões, procurando reduzir os custos relacionados com a alimentação animal e melhorar a gestão deste sistema produtivo (Bell et al., 2018; Serrano et al., 2018, 2020, 2021).

2.4. Métodos de referência para determinação da proteína bruta e da fibra da pastagem

A determinação laboratorial da PB e da fibra (NDF) permite a sua expressão em percentagem da matéria seca, sendo realizada de acordo com os métodos standard. A PB é estimada a partir do conteúdo em azoto, determinado pelo método de Kjeldahl e a fibra (NDF) é analisada de acordo com o método Goering e Van Soest (Goering e Soest, 1970) (Serrano et al., 2020, 2021).

Estes métodos de referência, para além do trabalho de campo de recolha de amostras, envolvem procedimentos analíticos, laboratoriais, especializados e o consumo de reagentes cujo custo é elevado. Acresce o tempo de resposta laboratorial, o qual pode ultrapassar 3 ou 4 semanas. Trata-se, por isso, de um processo lento e dispendioso, pouco prático na perspetiva da oportunidade da tomada de decisão do gestor agrícola. Daqui resulta a necessidade de procurar novos métodos, mais rápidos, mais baratos e menos trabalhosos. A técnica NIRS encontra-se em franca expansão com várias aplicações na análise da qualidade alimentar, entre elas a da avaliação expedita da qualidade das pastagens e forragens (Lugassi et al., 2015; Bell et al., 2018; Serrano et al., 2018, 2020, 2021).

2.5. Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS)

A região do infravermelho próximo no espectro eletromagnético localiza-se nos comprimentos de onda acima da região do visível, entre os 700 e os 2500 nm (Dias, 2015; Santos, 2017; Serrano et al., 2020). A descoberta deste tipo de radiação deveu-se a Frederick Herschel no ano de 1880 ao estudar a decomposição da luz através de um prisma (Magalhães, 2014; Dias, 2015). Assim, utilizando um prisma tal como Isaac Newton em 1666, reparou que acima da extremidade da cor vermelha, esta região do espectro apresentava uma temperatura mais alta que as restantes e não era detetável (visível) pela visão humana. Esta região do espectro eletromagnético acabou por ser designada de região do infravermelho (Magalhães, 2014; Dias, 2015).

O interesse conjunto de uma empresa de plásticos e do sector agrícola permitiu o desenvolvimento do primeiro espectrofotómetro NIR em 1954 (Magalhães, 2014). Já em 1960, Karl Norris, em busca de novos métodos para determinar a humidade em produtos agrícolas, aplicando a técnica de espectroscopia NIR conseguiu quantificar a humidade em grãos e sementes (Dias, 2015; Magalhães, 2014). Após esta descoberta, nos anos 70, Norris começou a desenvolver e aprofundar a tecnologia NIR no Departamento Americano de Agricultura, suscitando o interesse nas indústrias petrolíferas, químicas, bioquímicas e farmacêuticas, devido à sua versatilidade de análise (Dias, 2015; Magalhães, 2014).

Atualmente, a espectroscopia NIR é uma ferramenta indispensável, devido à capacidade de medições e análises, qualitativas e quantitativas, de um modo rápido e não destrutivo. É amplamente utilizada na área da farmacologia, na indústria química e, também, em ciência animal para prever o valor nutritivo das pastagens e forragens (Bell et al., 2018; Dias, 2015; Lugassi et al., 2015; Magalhães, 2014; Serrano et al., 2018, 2020).

2.6. Os princípios da técnica baseada na espectroscopia de infravermelho próximo

A região do espectro eletromagnético situada entre os comprimentos de onda 750-2500 nm é denominada de região do infravermelho próximo. A medição da absorção da radiação infravermelha pela amostra em estudo é feita com base na radiação refletida quando a amostra é iluminada por uma fonte de luz. O detetor do espectrómetro registra o valor da refletância da amostra sendo este posteriormente convertido em absorvância (Bell et al., 2018; Dias, 2015).

A radiação infravermelha provoca na matéria uma vibração das moléculas que constituem a amostra, sendo a frequência de vibração específica de determinadas ligações químicas. A absorção energética ocorre quando a energia radiante aplicada à amostra corresponde à diferença entre dois níveis energéticos dos movimentos vibratórios das moléculas, originando então um espectro de absorção. Cada molécula tem um espectro único, o que permite quantificar e avaliar diferentes características químicas, físicas e sensoriais de cada amostra (Bagchi et al., 2016; Dias, 2015; Magalhães, 2014; Santos, 2017; Serrano et al., 2020).

As bandas de absorção no espectro NIR estão relacionadas com a alteração do momento dipolar de cada molécula pelo que as moléculas homonucleares não são estimuladas pela radiação, já as heteronucleares são facilmente detetadas devido às suas ligações compostas (C-H, N-H, O-H e S-H), que têm diferentes propriedades de absorção da radiação, permitindo assim quantificar algumas propriedades da amostra testada, nomeadamente, a proteína e a celulose (Dias, 2015; Lugassi et al., 2015).

Os diferentes componentes químicos que integram as amostras têm várias bandas de absorção. Por exemplo, os comprimentos de onda da região de 1650-

1670 nm e 2260-2280 nm estão correlacionados com as ligações C-H presentes na lenhina e celulose, e a região de 2100-2200 nm está correlacionada com os grupos de proteínas funcionais (ligações N-H). Todas estas ligações estão presentes na constituição da pastagem, assim esta técnica de espectroscopia de infravermelho próximo é bastante utilizada para analisar e quantificar parâmetros da qualidade nutricional como a proteína, a fibra insolúvel em detergente neutro (NDF) e a fibra insolúvel em detergente ácido (acid detergent fiber, ADF) (Dias, 2015; Lugassi et al., 2015; Magalhães, 2014; Santos, 2017; Serrano et al., 2020).

Os espectros NIR são caracterizados por apresentarem sobreposições e bandas de combinações resultantes da alteração do momento dipolar das moléculas presentes no material em estudo, tornando complexo perceber o seu significado. A sobreposição das bandas de absorção dificulta a interpretação direta destes espectros, não sendo possível verificar facilmente diferenças espectrais. Desta forma surge a necessidade de aplicar tratamentos estatísticos e quimiométricos de modo a obter a informação desejada a partir de um espectro NIR. A aplicação da estatística multivariada à análise de espectros NIR permite a obtenção de modelos de calibração correlacionando o espectro da amostra com a composição nutricional de referência que contém (Dias, 2015; Magalhães, 2014; Serrano et al., 2020; Véstia, 2019).

A introdução da transformada de Fourier, função matemática que relaciona, num espectro, as intensidades com as respectivas frequências, permitiu o desenvolvimento e a generalização da espectroscopia NIR, tornando mais simples a análise da informação (Magalhães, 2014; Santos, 2017; Simões, 2008). Atualmente a maioria dos espectrómetros que se utilizam são do tipo FT-NIR, optando-se frequentemente por designar este tipo de espectroscopia de forma mais abreviada como espectroscopia NIR.

As pastagens apresentam grande heterogeneidade, tanto momentânea como ao longo do seu desenvolvimento vegetativo. A utilização da espectroscopia NIR para a análise da composição faz com que seja necessário um elevado número de amostras que apresentem variabilidade de forma a obter modelos de calibração robustos. No processo de calibração é importante garantir, para cada critério, a maior variabilidade e distribuição uniforme entre os valores (Dias, 2015;

Serrano et al., 2019, 2020, 2021). De modo a garantir o sucesso desta técnica é necessário respeitar quatro etapas (Magalhães, 2014):

1- Obtenção de elevado número de amostras que permitam, não só, garantir a representatividade, mas também assegurar o processo de calibração e de validação;

2- Conhecimento de valores de referência, obtidos através do método laboratorial de referência para a variável pretendida, permitindo a correlação de dados.

3- Após a obtenção dos espectros e dos valores de referência, com recurso à quimiometria, devem ser analisados os efeitos de várias transformações aos espectros (pré-processamento) e os modelos resultantes da análise multivariada, levando à seleção do modelo mais robusto.

4- O último passo consiste na validação, sendo comum nesta fase a utilização de uma proporção entre 1/3 e 1/2 das amostras selecionadas para calibração, podendo utilizar vários parâmetros estatísticos, principalmente o coeficiente de determinação (R^2).

3. Materiais e métodos

3.1. Locais de amostragem

Entre os meses de Janeiro e Junho de 2020 foram recolhidas 353 amostras de pastagem, em dez locais diferentes, nove destes em Portugal, distribuídos pelos distritos de Beja, Évora, Portalegre e Guarda, e um em Espanha, na província da Estremadura). O quadro 1, resume as características e localizações dos campos experimentais, tipo de pastagens, árvores predominantes nas parcelas e espécie animal em pastoreio.

Quadro 1 - Locais de recolha de amostras e caracterização das parcelas experimentais.

Local (Distrito)	Coordenadas geográficas	Tipo pastagem	Árvores predominantes	Espécie animal e tipo de pastoreio
Azinhal (Beja)	38°6,2'N; 8°26,9'W	Permanente, biodiversa (predominância de compostas)	Azinheiras e sobreiros	Ovelhas em pastoreio rotativo
Cubillos (Estremadura/Espanha)	39°10,0'N; 6°44,6'W	Anual, biodiversa (mistura de gramíneas e leguminosas)	Azinheiras e sobreiros	Vacas em pastoreio rotativo
Mitra- EcoSPAA (Évora)	38°53,1'N; 8°1,1'W	Permanente biodiversa (mistura de leguminosas)	Azinheiras	Ovelhas em pastoreio permanente
Grous (Beja)	37°52,3'N; 7°56,7'W	Permanente, biodiversa (predominância de compostas)	Azinheiras	Vacas em pastoreio rotativo

Quadro 1 - Locais de recolha de amostras e caracterização das parcelas experimentais
(continuação).

Local (Distrito)	Coordenadas geográficas	Tipo pastagem	Árvores predominantes	Espécie animal e tipo de pastoreio
Mitra A_B (Évora)	(A) 38°32,2'N; 8°1,1'W (B) 38°31,8'N; 8°0,9'W	Permanente, biodiversa (mistura de gramíneas e leguminosas)	Azinheiras	(A) ovelhas em pastoreio permanente (B) vacas em pastoreio rotativo
Murteiras (Évora)	38°23,4'N; 7°52,5'W	Anual, biodiversa (mistura de gramíneas e leguminosas)	Azinheiras e sobreiros	Ovelhas em pastoreio permanente
Padres (Évora)	38°36,4'N; 8°8,7'W	Permanente, biodiversa (predominância de compostas)	Azinheiras	Vacas em pastoreio permanente
Quinta França (Guarda)	40°16,4'N; 7°25,9'W	Permanente, biodiversa (mistura de gramínea e leguminosas)	Eucaliptos	Vacas e ovelhas em pastoreio rotativo
Tapada dos Números (Portalegre)	39°9,5'N; 7°31,9'W	Permanente, biodiversa (mistura de gramíneas e leguminosas)	Azinheiras e sobreiros	Vacas, ovelhas e porcos em pastoreio rotativo

3.2. Recolha de amostras

O processo de amostragem (figura 3) consistiu na recolha de 8 amostras compósitas em cada parcela, em várias fases do desenvolvimento das pastagens, entre 14 de Janeiro e 9 de Junho de 2020. Cada amostra compósita resultou de 5 subamostras de 0,25 m² (0,5 m x 0,5 m) recolhidas numa área de 100 m² (10 m x 10 m), fora da projeção da copa das árvores existentes nas respetivas parcelas. As amostras de pastagem, depois de cortadas com uma tesoura elétrica cerca de 1-2 cm acima da superfície do solo, foram colocadas em sacos de plástico numerados e transportados para o Laboratório de Metabolismo e Nutrição Animal da Universidade de Évora, onde se realizaram os procedimentos laboratoriais. Durante a recolha da pastagem é muito importante manusear o mínimo possível a amostra para evitar perda de humidade e alteração do seu valor nutricional. Após o corte, as plantas continuam a respirar, perdendo água pelos estomas e pela zona onde sofreu o corte. A respiração e perda de água será maior quanto maior for o teor de água das plantas e mais alta for a temperatura exterior. Durante esse processo, ocorre uma diminuição do teor de açúcares solúveis, como a glucose, frutose e sacarose, e decréscimo de amido, frutanas e ácidos orgânicos (Santos, 2018).



Figura 3 - Delimitação e corte das amostras de pastagem no campo

Importa referir que em duas das parcelas não foi possível fazer a totalidade das recolhas de amostras devido às restrições de circulação que resultaram da situação pandémica do “Covid-19”.

3.3. Processamento laboratorial das amostras de pastagem

No laboratório, as amostras foram pesadas, para se obter peso fresco (matéria verde, MV, em kg ha⁻¹), e colocadas a secar em estufa a 65 °C durante 72 horas,

até obtenção de peso seco constante. Após a secagem, as amostras foram pesadas novamente para calcular a matéria seca (MS, em kg ha⁻¹), e a humidade da pastagem (HP, em %). Depois, as amostras foram trituradas, com a utilização de um moinho Perten equipado com malha redonda de 1 mm. Após este pré-processamento, as amostras foram submetidas a análise num espectrómetro de bancada. Seguiu-se a determinação laboratorial, pelos métodos de referência, da PB e da fibra (NDF) da pastagem, expressa em percentagem da MS.

Com o objetivo de avaliar o desempenho do espectrómetro com amostras de pastagem em verde, parte das amostras (104, recolhidas entre Março e Junho de 2020) foram analisadas logo após a recolha no campo, sem pré-tratamento ou secagem e, posteriormente, após secagem. Nas amostras em verde, para além da estimativa da PB e da fibra (NDF), os modelos de calibração/validação foram também aplicados na estimativa da humidade da pastagem (HP).

3.4. Proteína bruta e fibra em detergente neutro - Análises de referência

As análises de referência para a proteína bruta e fibra em detergente neutro, foram obtidas de acordo com os métodos standard (AOAC, 2005): (i) a PB, a partir do conteúdo em azoto através do método Kjeldahl, com factor de conversão em proteína bruta de 6,25 (método G-188-97 Rev 2, Bran + Luebbe, Analyser Division, Norderstedt, Alemanha); (ii) a fibra em detergente neutro (NDF) de acordo com o método proposto por Goering e Van Soest (1970), num digestor de fibras (Foss Tecator AB, Suécia) (Serrano et al., 2020, 2021).

3.5. Aquisição de espetros

Para cada amostra de pastagem, verde ou seca, foram recolhidos cinco espetros. A aquisição dos espetros foi efetuada com recurso a um espectrómetro FT-NIR (MPA OPUS BRUKER, Alemanha), em modo de refletância difusa, utilizando uma esfera integradora com uma célula rotativa de 9 cm de diâmetro a uma temperatura de 20 °C. Os espetros foram obtidos a partir da região espectral entre os 12500 e os 3600 cm⁻¹, ou seja, em termos de comprimento de onda de 800 a 2778 nm, com uma resolução ótica de 16 cm⁻¹. Os valores de refletância difusa foram transformados em absorvância com a utilização da equação: "A= log (1/R)".

3.6. Tratamento e análise estatística dos espectros

O programa utilizado para aquisição dos espectros foi o Opus v. 7.5 software (Bruker Optik GmbH, Alemanha). Para os tratamentos quimiométricos, os espectros foram exportados para o software Unscrambler (versão 10.5.1, Camo, ASA, Oslo, Noruega). Os modelos de calibração e validação foram desenvolvidos através do algoritmo de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR), tendo sido utilizada metade da amostra em cada uma destas fases (Serrano et al., 2020; Wold, 2001).

Os tratamentos quimiométricos efetuados para a obtenção de modelos de previsão mais precisos para quantificar a PB tiveram como base os espectros em bruto, ao contrário dos modelos de previsão para quantificar a fibra (e a HP no caso da pastagem verde), onde os melhores modelos resultaram de pré-processamento. O pré-processamento consiste na utilização de algoritmos que removem o chamado «ruído». Neste estudo foram implementadas transformações dos espectros recorrendo à aplicação de derivadas de 1ª e 2ª ordem e SNV (Serrano et al., 2021).

A qualidade dos modelos de calibração e validação foi avaliada usando o coeficiente de determinação (R^2), a raiz quadrada média do erro (RMSE), o desvio residual de predição (RPD) correspondente à razão entre o desvio padrão dos resultados do método de referência e o erro padrão de validação cruzada (DP/RMSE), e a diferença média entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo (Bias). A seleção dos modelos deve ter em conta os valores mais elevados do R^2 e do RPD e os valores mais baixos do RMSE e do Bias (Donis-González et al., 2020). O RPD é normalmente usado como indicador da qualidade de um modelo de calibração: valores maiores do que 2, 3, ou 5 são recomendados, respetivamente para fins de rastreio, previsão e controlo de qualidade (Versari et al., 2014; Serrano et al., 2020, 2021).

4. Resultados e discussão

4.1. Variabilidade espacial e temporal dos parâmetros medidos

As figuras 4 e 5 mostram a evolução, respetivamente, da temperatura média mensal e da precipitação mensal acumulada, entre Julho de 2019 e Junho de 2020, para os distritos de Beja, Évora, Portalegre e Guarda. O ciclo das pastagens teve início entre os meses de Setembro e Outubro de 2019, após as primeiras chuvas, as quais garantiram no solo os teores de humidade necessários para a germinação das sementes.

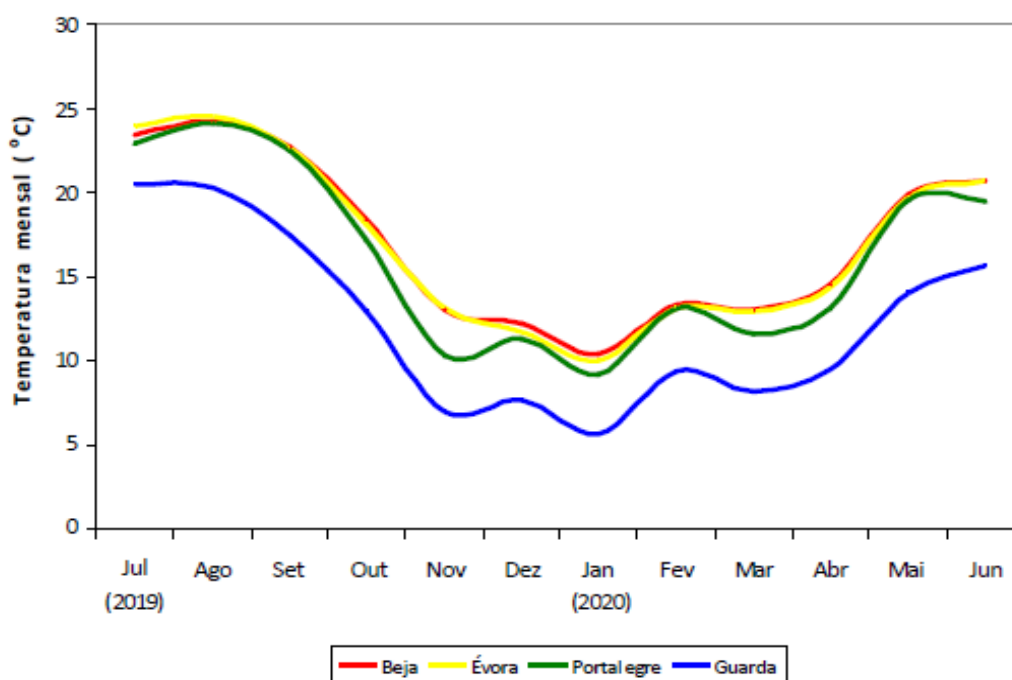


Figura 4 - Temperatura média mensal nos distritos de Beja, Évora, Portalegre e Guarda, no período de Julho de 2019 a Junho de 2020 (adaptado de Serrano et al., 2021).

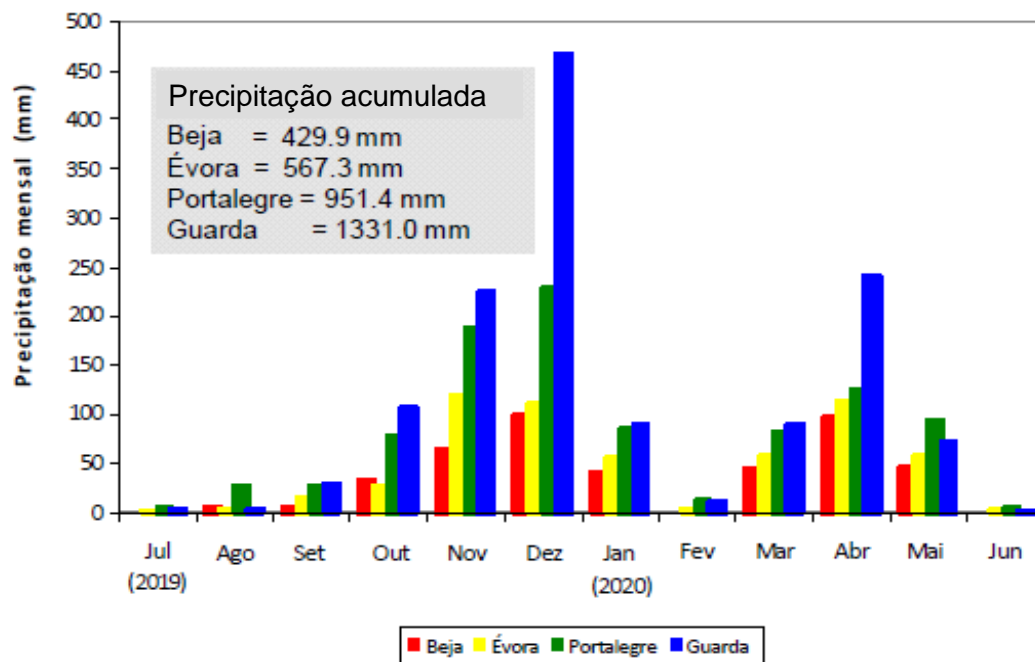


Figura 5 - Precipitação total mensal e precipitação total acumulada nos distritos de Beja, Évora, Portalegre e Guarda, no período de Julho de 2019 a Junho de 2020 (adaptado de Serrano et al., 2021).

Na figura 4 é possível verificar que, entre Novembro de 2019 e Junho de 2020, no distrito da Guarda, onde se encontra a parcela experimental situada mais a norte (Herdade da Quinta da França), entre Novembro e Janeiro as temperaturas médias desceram até cerca de 5°C. Já nos restantes distritos, no mesmo período, as temperaturas médias desceram aproximadamente até aos 10°C. Estas temperaturas médias indiciam que as temperaturas mínimas durante o referido período poderão ter atingido valores próximos dos 0°C, as quais provocam a dormência das plantas (Efe Serrano, 2006; Serrano et al., 2019, 2021). Nesta fase do ciclo as plantas são relativamente jovens, apresentando altos teores proteicos e baixos teores de fibra (Serrano et al., 2018).

No período entre o final do mês de Fevereiro e o início do mês de Março as temperaturas médias tendencialmente aumentaram (figura 4), o que proporciona condições para o desenvolvimento e aumento da disponibilidade de pastagem. Este período estende-se até ao mês de Maio ou mesmo ao início de Junho, dependendo dos teores de humidade no solo. Nesta fase, o avançar do ciclo vegetativo, o aumento da temperatura e a diminuição dos teores de humidade no solo, em resultado do claro decréscimo da precipitação (figura 5), desencadeiam uma rápida evolução do ciclo vegetativo, com a consequente

diminuição da qualidade da pastagem, a que corresponde uma diminuição dos teores de PB e um aumento da fibra (Efe Serrano, 2006; Serrano et al., 2019).

No quadro 2 é apresentada a média, o desvio padrão (DP) e o intervalo de variação dos parâmetros HP, PB e NDF para cada data e para cada parcela experimental. É possível verificar que nas parcelas do distrito de Beja (Azinhal e Grous), sujeitas a temperaturas mais elevadas e com menor precipitação (figuras 4 e 5), a pastagem tende a perder qualidade mais cedo em comparação com as restantes parcelas. Nas medições realizadas em 21 de Abril foram obtidos valores médios de PB de 12,4 % na parcela da Herdade do Azinhal e 7,8 % na parcela da Herdade dos Grous. Neste mesmo período as parcelas dos distritos de Évora e da Guarda apresentavam teores de PB superiores a 15 %. No entanto, e contra o que seria de prever porque a Herdade da Tapada dos Números se situa no distrito de Portalegre, com temperaturas médias normalmente mais baixas que no distrito de Évora e com maior quantidade de precipitação acumulada, no mesmo período a pastagem nesta parcela apresentava valores relativamente baixos de PB (da ordem dos 9%). A quebra da qualidade da pastagem (diminuição da PB e aumento da fibra) pode justificar a necessidade de suplementação alimentar dos animais para garantir as suas necessidades de manutenção alimentar, sem perda de peso. Por exemplo, para ovelhas adultas recomenda-se suplementação quando a pastagem apresenta valores de PB inferiores a 9,4 % (NRC, 1985; Serrano et al., 2018). Tendo por base estes valores, para as parcelas do distrito de Beja e Portalegre essa suplementação seria necessária no ano em causa (2020) a partir dos meses de Abril (Grous) e Maio (Azinhal e Tapada dos Números). Nos restantes distritos, Évora (Eco-SPAA, Mitra, Murteiras e Padres) e Guarda (Quinta da França), os teores médios de PB da pastagem permaneceram superiores ao limite referido (9,4%) até ao final do mês de Maio, o que se pode justificar pela melhor conjugação da distribuição da precipitação, com a temperatura média do ar.

Quadro 2 - Média, desvio padrão (DP) e amplitude (intervalo de variação) dos valores de referência da humidade da pastagem (HP), da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) para o conjunto dos nove campos experimentais em diferentes datas de amostragem (S-pastagem seca; F-pastagem fresca ou verde).

Parcela experimental	Data (2020)	Tipo de amostra S/F	HP, % MS			PB, % MS			NDF, % MS		
			Média	DP	Intervalo de variação	Média	DP	Intervalo de variação	Média	DP	Intervalo de variação
AZINHAL	21/Jan	S	72,1	4,7	62,5 - 77,3	11,5	1,8	9,2 - 13,8	58,7	5,3	47,3 - 62,9
	02/Mar	S/F	78,2	3,7	72,7 - 83,1	15,8	1,1	14,4 - 17,7	53,2	3,7	48,8 - 59,9
	21/Abr	S	83,1	1,9	79,8 - 86,1	12,4	1,8	8,9 - 14,4	56,5	3,5	51,8 - 63,6
	28/Mai	S/F	55,7	6,9	46,9 - 65,8	7,3	1,9	5,2 - 11,6	62,5	2,3	60,0 - 67,2
CUBILLOS	29/Jan	S	87,1	1,5	84,7 - 88,4	20,4	2,7	16,2 - 25,3	43,2	4,3	35,0 - 49,6
	10/Mar	S/F	80,9	2	78,0 - 83,1	16,8	1,6	15,4 - 20,3	41,4	1,9	37,9 - 44,1
ECO-SPAA	14/Jan	S	83,6	3,7	73,9 - 91,4	19,4	4,1	10,4 - 29,9	38,5	7,5	22,7 - 50,2
	03/Mar	S	85,4	2,8	77,0 - 90,5	15,4	3,9	10,5 - 25,9	45,5	6,8	33,0 - 58,8
	03/Abr	S	81,2	2,7	76,5 - 84,7	15,9	3,3	10,1 - 20,1	42,1	3,1	38,6 - 46,6
	05/Mai	S	77,9	5,4	67,0 - 86,1	12,6	4,7	6,8 - 22,7	59,0	6,1	44,4 - 68,7
	26/Mai	S/F	71,1	3,8	64,6 - 77,2	11,5	2,8	7,8 - 15,5	63,5	2,5	59,7 - 66,9
GROUS	21/Jan	S	75,9	4,6	68,3 - 80,0	17,6	2,3	15,4 - 21,7	48,9	4,2	41,5 - 55,6
	02/Mar	S/F	78,2	3,7	73,8 - 84,1	15,0	0,6	13,8 - 15,7	45,0	3,3	40,3 - 50,4
	21/Abr	S	72,2	2,9	68,1 - 76,3	7,8	0,9	6,3 - 9,0	66,2	3,6	59,8 - 70,6
	28/Mai	S/F	53,7	6,9	41,9 - 64,2	7,0	1,2	5,8 - 9,6	65,9	3,1	59,8 - 69,4
MITRA	20/Jan	S	79,5	5,8	68,5 - 84,7	17,1	3,1	10,8 - 21,4	43,9	9,1	32,9 - 57,5
	03/Mar	S/F	87,6	1,8	85,0 - 90,1	17,6	2,4	14,8 - 20,3	45,4	3,3	41,2 - 50,4
	14/Abr	S	87,1	2,2	83,6 - 89,2	15,2	3,5	10,8 - 19,2	44,7	6,3	36,2 - 52,9
	29/Mai	S/F	67,4	7,4	58,8 - 75,5	9,5	2,1	6,7 - 11,8	59,9	5,7	53,2 - 67,4
MURTEIRAS	22/Jan	S	76,8	3,4	73,1 - 83,6	11,0	3,1	7,7 - 17,8	63,9	3,2	59,0 - 67,2
	09/Mar	S/F	79,9	2,8	75,8 - 83,6	15,7	5,8	8,7 - 25,8	51,3	3,8	45,0 - 56,7
	20/Abr	S	83,2	1,4	81,6 - 85,8	15,2	3,1	11,2 - 21,0	54,2	3,7	49,1 - 59,9
	29/Mai	S/F	75,1	4,3	68,3 - 79,4	8,6	1,2	7,0 - 10,3	61,8	3,3	57,3 - 66,0

Quadro 2 - Média, desvio padrão (DP) e amplitude (intervalo de variação) dos valores de referência da humidade da pastagem (HP), da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) para o conjunto dos nove campos experimentais em diferentes datas de amostragem (S-pastagem seca; F-pastagem fresca ou verde) (continuação).

Parcela experimental	Data (2020)	Tipo de amostra S/F	HP, % MS			PB, % MS			NDF, % MS		
			Média	DP	Intervalo de variação	Média	DP	Intervalo de variação	Média	DP	Intervalo de variação
PADRES	20/Jan	S	77,7	3,7	70,8 - 82,3	16,1	2,0	13,3 - 20,1	50,6	3,7	45,5 - 56,5
	09/Mar	S/F	78,1	2,0	74,9 - 80,8	16,6	2,2	13,0 - 19,9	45,2	2,5	40,4 - 47,7
	20/Abr	S	86,8	1,5	84,6 - 89,1	19,0	2,6	13,9 - 21,9	47,4	1,9	44,5 - 49,8
	29/Mai	S/F	67,6	3,1	63,8 - 72,8	9,7	1,1	7,2 - 10,9	60,6	2,0	56,4 - 62,7
QUINTA DA FRANÇA	30/Jan	S	84,9	2,2	82,0 - 87,7	20,3	3,1	15,4 - 26,1	50,1	6,1	40,0 - 60,4
	23/Abr	S	80,6	2,2	77,0 - 83,4	16,7	1,6	15,0 - 18,9	45,1	1,9	42,7 - 47,8
	09/Jun	S	63,8	3,8	57,9 - 68,4	9,2	1,6	6,8 - 11,7	56,4	3,6	52,3 - 61,8
TAPADA DOS NÚMEROS	22/Jan	S	74,5	7,5	62,4 - 83,1	10,8	4,3	6,2 - 17,8	56,2	9,4	41,4 - 66,1
	10/Mar	S/F	76,1	4,6	68,5 - 81,4	15,0	3,3	11,8 - 22,1	45,8	4,0	41,7 - 53,1
	24/Abr	S	79,4	2,2	75,7 - 82,5	9,0	1,1	7,5 - 11,2	56,7	5,5	49,2 - 63,7
	01/Jun	S/F	70,0	6,5	55,7 - 76,3	8,0	1,4	5,7 - 10,0	58,7	7,0	48,4 - 71,1

A análise do quadro 2 permite ainda verificar que existe uma grande variabilidade da HP, da PB e da fibra (NDF), quer entre os vários campos experimentais, quer ao longo do tempo dentro do mesmo campo experimental (variação espacial e temporal). Estes parâmetros são afetados por diferentes condições de temperatura, de precipitação, e pelas características do próprio ecossistema (solo, árvores, pastoreio e composição florística da pastagem). Esta variabilidade é inevitável por se tratar de pastagens biodiversas, com mistura de plantas, entre gramíneas, leguminosas, compostas e outras espécies, com padrões de crescimento e desenvolvimento diferentes em função da evolução da temperatura, da precipitação e da fertilidade do solo (Serrano et al., 2021). Essa variabilidade é especialmente importante neste estudo porque tem influência nos valores de PB e de fibra, logo reflete-se no desenvolvimento dos modelos de calibração e validação que se pretendem desenvolver a partir da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (Serrano et al., 2019, 2020, 2021).

4.2. Análise dos resultados obtidos com a técnica NIRS

Os resultados do tratamento estatístico dos modelos de calibração e validação para a previsão do teor de PB e fibra (NDF) da pastagem seca recorrendo à técnica NIRS são apresentados no quadro 3. Para a pastagem em verde, para além da PB e da fibra, é estimada a HP (quadro 4).

Como referido anteriormente, a seleção dos modelos de previsão para cada parâmetro, ponderaram os valores mais elevados de R^2 e de RPD e os valores mais baixos de RMSE e Bias (Aleixandre-Tudo et al., 2018; Serrano et al., 2020). Para as amostras de pastagem seca (quadro 3) verificou-se, no caso da PB, que o melhor modelo foi obtido com o espectro bruto (calibração: $R^2=0,941$; validação externa: $R^2 = 0,935$; RMSE = 1,174; RPD = 4,01; Bias = 0,031), todos estes são fortes indicadores da qualidade do modelo, não justificando, por isso, qualquer pré-tratamento espectral. Para o NDF, o pré-tratamento com a “derivada de 1ª ordem” apresentou os melhores resultados (calibração: $R^2 = 0,948$; validação externa: $R^2 = 0,911$; RMSE = 2,752; RPD = 3,48; Bias = -0,438). Tendo por base os critérios apresentados por Fagan et al. (2011) e por Serrano et al. (2020) para o $R^2 (> 0,90)$ e para o RPD (> 3), tanto o modelo para a PB como o modelo para a fibra (NDF) podem considerar-se bons. Noutro estudo com amostras de pastagem secas Serrano et al. (2020), obteve para o modelo de validação da PB

valores de R^2 de 0,844 e RPD de 4, com recurso aos espectros sem qualquer tratamento (espectros brutos). Já para a fibra (NDF) o melhor modelo de validação foi obtido através da “derivada de 1ª ordem”, com R^2 de 0,826 e RPD de 2,4 com recurso a pré-tratamento de “normalização” seguido de “SNV”.

Em relação às amostras de pastagem verde são apresentados apenas os pré-tratamentos quimiométricos selecionados com base nos melhores indicadores estatísticos já referidos (quadro 4). Neste caso, devido ao número limitado de amostras recolhidas (114 amostras), os modelos de calibração tiveram melhores resultados recorrendo a validação interna, ou seja, não houve separação de amostras de calibração e validação, sendo que cada amostra foi validada com as restantes, num processo internacionalmente conhecido na área da estatística como «leave one out» (Parrini et al., 2019).

Para o modelo de estimativa da HP foi necessário recorrer ao algoritmo de pré-processamento da variação de padrão normal (“SNV”) seguida da aplicação de “derivada de 2ª ordem” (calibração: $R^2 = 0,948$; validação externa: $R^2 = 0,839$; RMSE = 3,517; RPD = 2,72; Bias = 0,101). Apesar dos parâmetros estatísticos deste modelo serem inferiores aos obtidos para as amostras de pastagens secas em termos de PB e NDF, são bastante aceitáveis (R^2 superior a 0.80 e RPD próximo de 3) para efeitos de previsão, o que seria expectável atendendo a que este é um método muito utilizado na determinação da humidade numa grande variedade de produtos alimentares (Serrano et al., 2021).

Quadro 3 - Estatística descritiva para os modelos de calibração e validação da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) em pastagens secas usando os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) e regressão dos erros quadrados parciais (PLSR).

Parâmetro	Pré- processamento espectral	Modelo	Variáveis latentes	R²	RMSE	Bias	RPD
PB	Espectro bruto*	Calibração	6	0,941	1,250		
		Validação	6	0,935	1,174	0,031	4,01
	Normalização	Calibração	6	0,922	1,422		
		Validação	6	0,912	1,364	0,092	3,46
	1ª Derivada	Calibração	5	0,947	1,166		
		Validação	5	0,923	1,276	-0,049	3,70
NDF	Espectro bruto	Calibração	6	0,905	3,019		
		Validação	6	0,808	3,988	0,517	2,40
	Normalização	Calibração	5	0,861	3,751		
		Validação	5	0,848	3,662	-0,338	2,59
	1ª Derivada*	Calibração	6	0,948	2,293		
		Validação	6	0,911	2,752	-0,438	3,48

Quadro 4 - Estatística descritiva para os modelos de calibração e validação da humidade da pastagem (HP), da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF) em pastagens verdes usando os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) e regressão dos erros quadrados parciais (PLSR). * pré-processamento selecionado

Parâmetro	Pré-processamento espectral	Tipo de calibração	Modelo	Variáveis latentes	R ²	RMSE	Bias	RPD
HP	SNV+2 ^a	Validação interna	Calibração	5	0,948	1,975		
		Validação externa	Validação	5	0,839	3,517	0,101	2,72
	Derivada	Validação interna	Calibração	6	0,676	4,950		
		Validação externa	Validação	6	0,608	5,703	0,520	1,74
NDF	1 ^a Derivada	Validação interna	Calibração	7	0,824	3,020		
		Validação externa	Validação	7	0,724	3,241	-0,045	2,38
		Validação interna	Calibração	5	0,379	6,847		
		Validação externa	Validação	5	0,322	7,349	0,830	1,23
PB	1 ^a Derivada	Validação interna	Calibração	6	0,833	1,720		
		Validação externa	Validação	6	0,707	2,303	-0,049	1,88
		Validação interna	Calibração	3	0,403	3,159		
		Validação externa	Validação	3	0,320	3,917	-0,489	1,22

Para os modelos de previsão da fibra (NDF) e da PB nas amostras de pastagem verde, o pré-tratamento selecionado foi a “derivada de 1^a ordem”, com os seguintes resultados:

(i) modelo de previsão da fibra (NDF):

Calibração: R² = 0,824; validação externa: R² = 0,724; RMSE = 3,241; RPD = 2,38; Bias = -0,045;

(ii) modelo de previsão da PB:

Calibração: R² = 0,833; validação externa: R² = 0,707; RMSE = 3,303; RPD = 1,88; Bias = -0,049,

No caso da PB e da fibra (NDF), os valores dos parâmetros estatísticos, de validação externa, especialmente o R² (próximo de 0,7) e o RPD (próximo de 2),

mostram maior fragilidade destes modelos, relativamente aos modelos obtidos com pastagem seca e moída, o que coloca algumas reservas à sua aplicação prática (Kleinebecker et al., 2011). De acordo com Alomar et al (2003) e Parrini et al., (2019) estes resultados mais modestos na precisão obtida com amostragem em verde são consequência, quer do efeito da humidade presente nas amostras, quer da ausência de processos de homogeneização prévia das amostras. A grande absorvância da água nas amostras é, segundo Bell et al. (2018) um dos fatores mais críticos para a elaboração de modelos mais precisos em medições de pastagem em verde. No caso deste estudo, como vantagens para as amostras secas, para além da não interferência da humidade nas leituras dos espectros e da possibilidade de maior período de conservação da qualidade das amostras para posteriores análises, acresce o efeito positivo sobre a precisão das leituras do espectrómetro resultante da homogeneidade das amostras (depois de trituradas).

Os espectros utilizados nos modelos de previsão em pastagens secas são apresentados na figura 6, sem qualquer pré-tratamento (espectro bruto), e na figura 7, otimizado com a aplicação da derivada de 1ª ordem como pré-tratamento. O primeiro constituiu a base para a elaboração, através de quimiometria do modelo de estimativa da PB e o segundo para elaboração do modelo de estimativa da fibra (NDF). Estas figuras mostram que os picos de absorção são salientados após a transformação dos dados aplicando uma “derivada de 1ª ordem” (figura 7), em comparação com os espectros brutos (sem qualquer pré-processamento; figura 6).

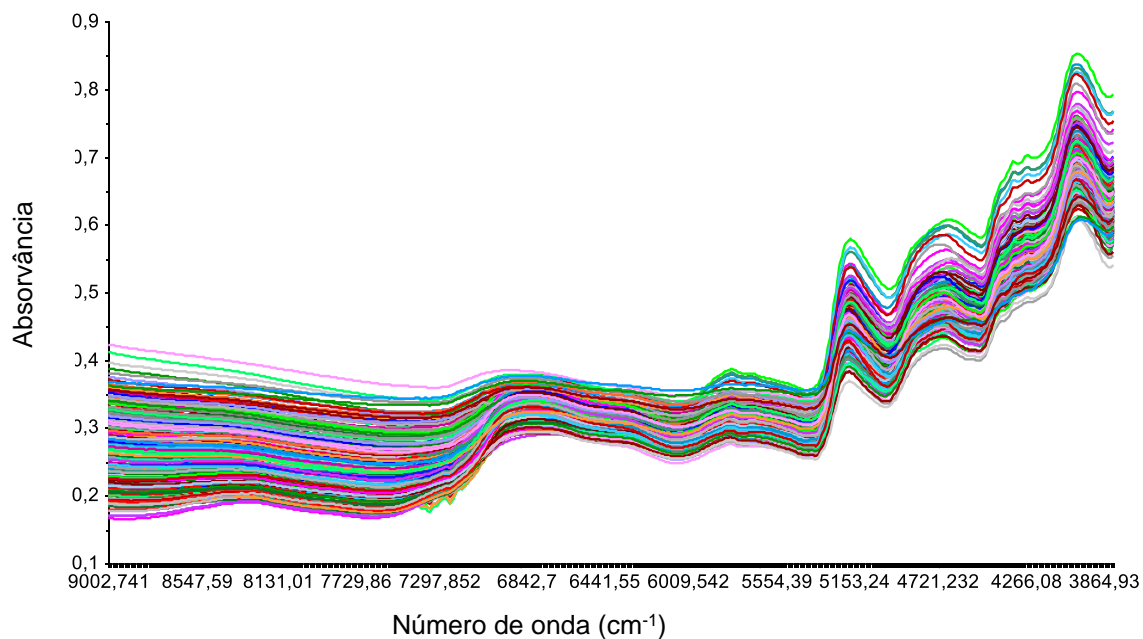


Figura 6 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens desidratadas sem qualquer tratamento de otimização para o modelo de previsão da proteína bruta (PB).

Os espectros da figura 6 foram obtidos no intervalo de números de onda entre 9003 e 3865 cm^{-1} (correspondentes aos comprimentos de onda entre 1110 e 2600 nm), sendo notório que as zonas de máxima absorção da PB aconteceram no intervalo de números de onda aproximadamente entre 5550 e 3865 cm^{-1} (entre 1800 e 2600 nm), aspeto confirmado por Serrano et al. (2020).

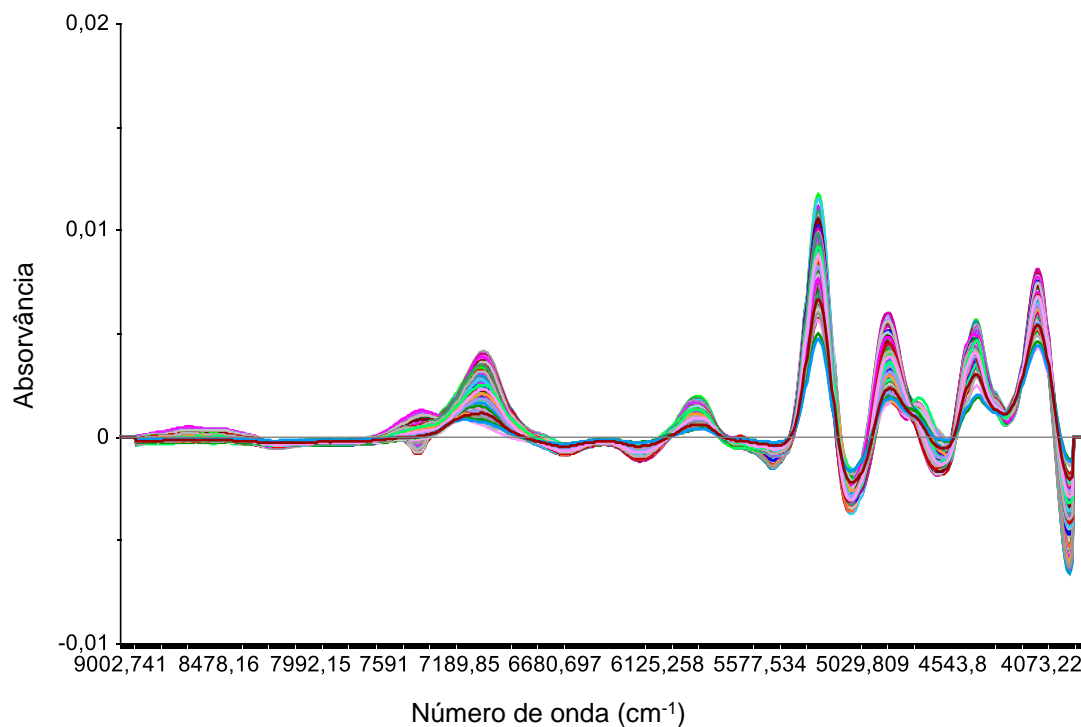


Figura 7 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens desidratadas após otimização com o pré-tratamento “derivada de 1ª ordem” para o modelo de previsão da fibra (NDF).

Os espectros referentes à fibra (NDF; figura 7) foram obtidos no mesmo intervalo de números de onda (entre 9003 e 3865 cm^{-1}) dos espectros referentes à PB sendo notórias duas zonas de máxima absorção: (i) entre 5550 e 3865 cm^{-1} (entre 1800 e 2600 nm); e (ii) entre 7300 e 7050 cm^{-1} (entre 1370 e 1418 nm), aspeto também confirmado por Serrano et al. (2020).

A figura 8 apresenta o conjunto de espectros resultante da aplicação da espectroscopia NIR em pastagens verdes após filtragem.

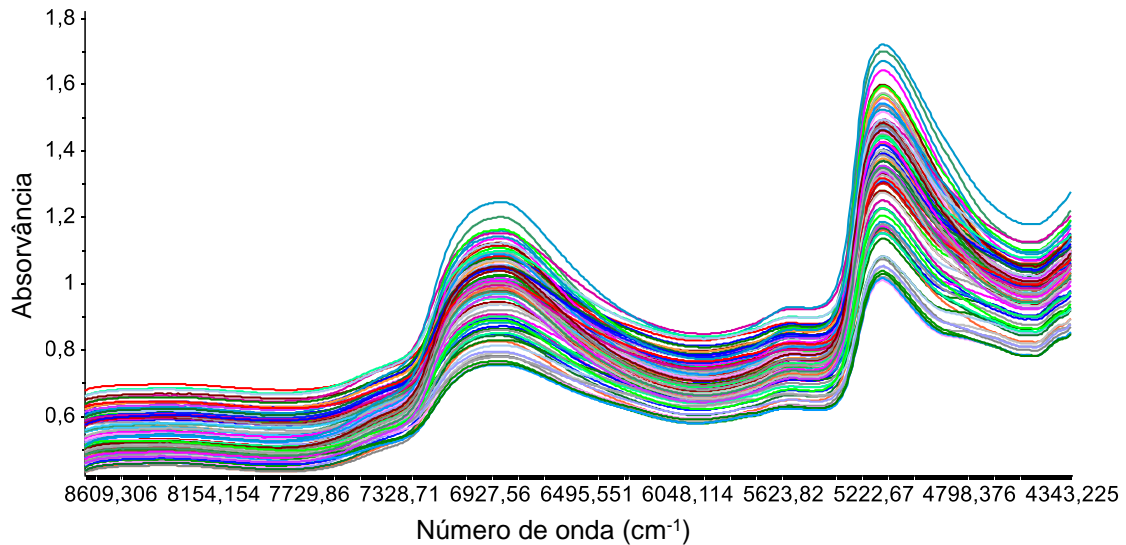


Figura 8 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens verdes após filtragem.

A figura 9 apresenta o resultado da aplicação sucessiva dos pré-processamentos “SNV” e cálculo da “derivada de 2ª ordem”, transformação que permitiu alcançar o melhor modelo de previsão da HP. Para estimativa da PB e da fibra (NDF) da pastagem verde (figura 10), o pré-processamento dos espectros consistiu apenas na transformação recorrendo ao cálculo da “derivada de 1ª ordem”. Os espectros iniciais foram obtidos num intervalo de números de onda entre os 9157 e os 3795 cm^{-1} (1092 a 2635 nm), verificando-se os picos de absorção entre os números de onda 5700 e 5100 cm^{-1} (1750 a 1960 nm). Nestas medições com pastagens verdes (não desidratadas) seria espectável que a melhor correlação se obtivesse para a HP já que a técnica de NIRS é utilizada há muito tempo para o cálculo da humidade e, em consequência, da matéria seca em produtos alimentares (Donnelly et al., 2018). Estas bandas de absorção correspondem na amostra à vibração das ligações de determinados grupos funcionais característicos dos parâmetros em estudo quer na pastagem verde quer na pastagem seca: entre os átomos de carbono e hidrogénio (C-N), entre azoto e hidrogénio (N-H) e entre oxigénio e hidrogénio (O-H) (Lugassi et al., 2015; Souza et al., 2017).

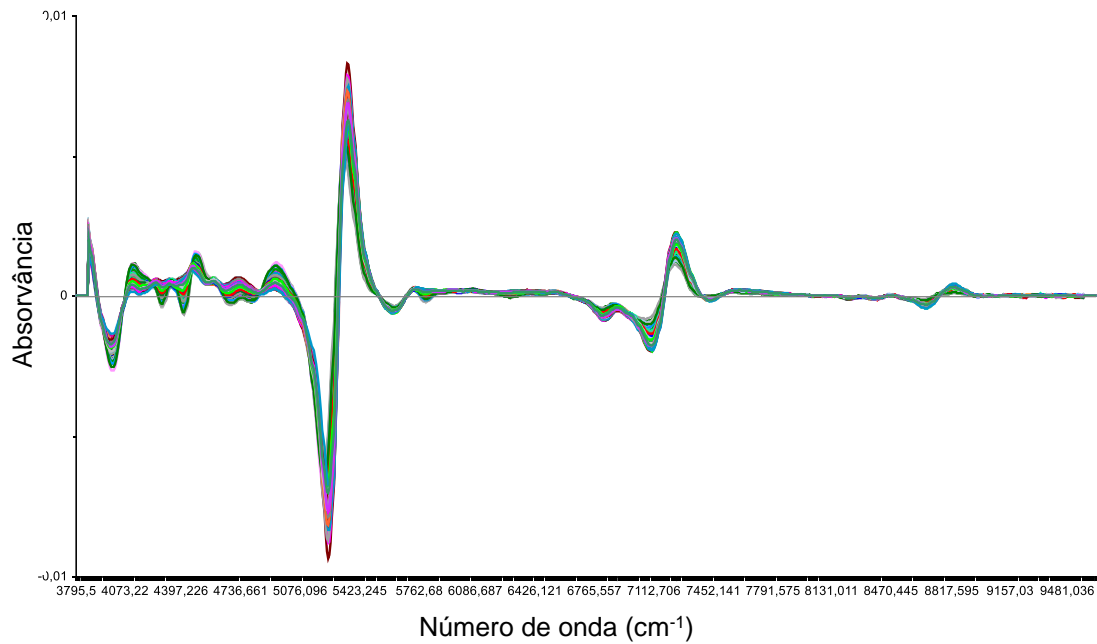


Figura 9 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens verdes, após otimização com os pré-tratamentos “SNV + derivada de 2ª ordem”, para o modelo de previsão da umidade da pastagem (HP).

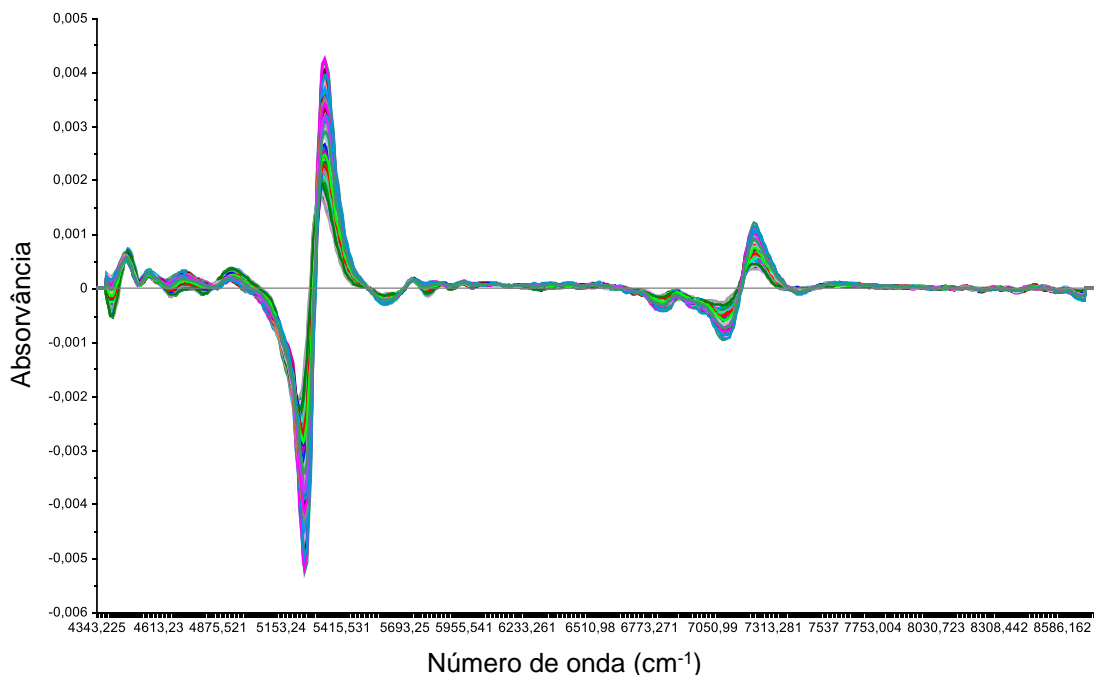


Figura 10 - Espectro do infravermelho próximo (NIR) em pastagens verdes após otimização com o pré-tratamento “derivada de 1ª ordem” para os modelos de previsão da proteína bruta (PB) e da fibra (NDF).

4.3. Comparação entre os valores de referência e os valores estimados pelos modelos NIRS estabelecidos para os parâmetros em estudo

As figuras 11 e 12 representam, respectivamente para a PB e para a fibra (NDF) em pastagens secas, a comparação entre os valores de referência, obtidos pelas técnicas laboratoriais standard, e os valores estimados pelos modelos estabelecidos com base na aplicação da técnica NIRS. Nas figuras referidas, os pontos a azul representam para os modelos respectivos a fase de calibração e os pontos a vermelho representam os resultados da fase de validação.

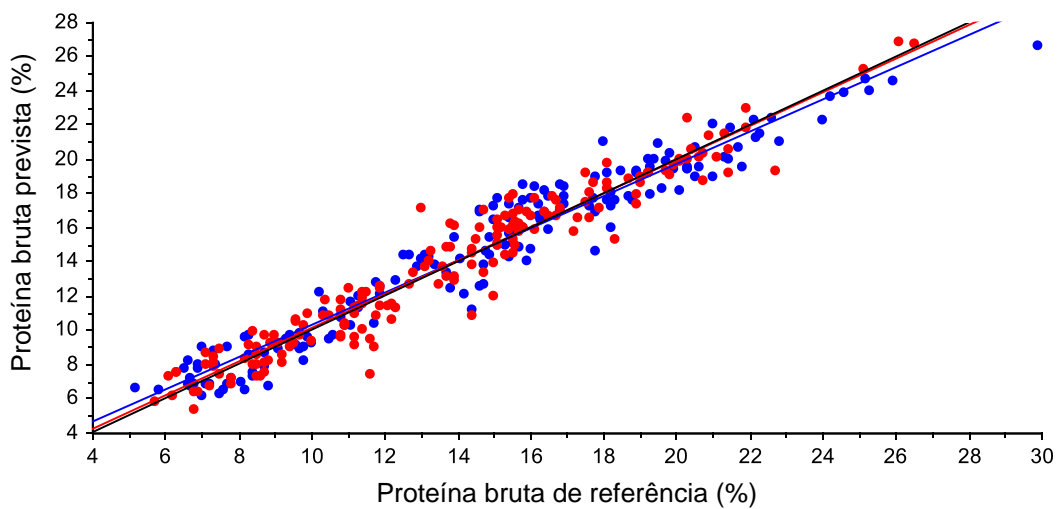


Figura 11 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a proteína bruta (PB) em pastagens desidratadas.

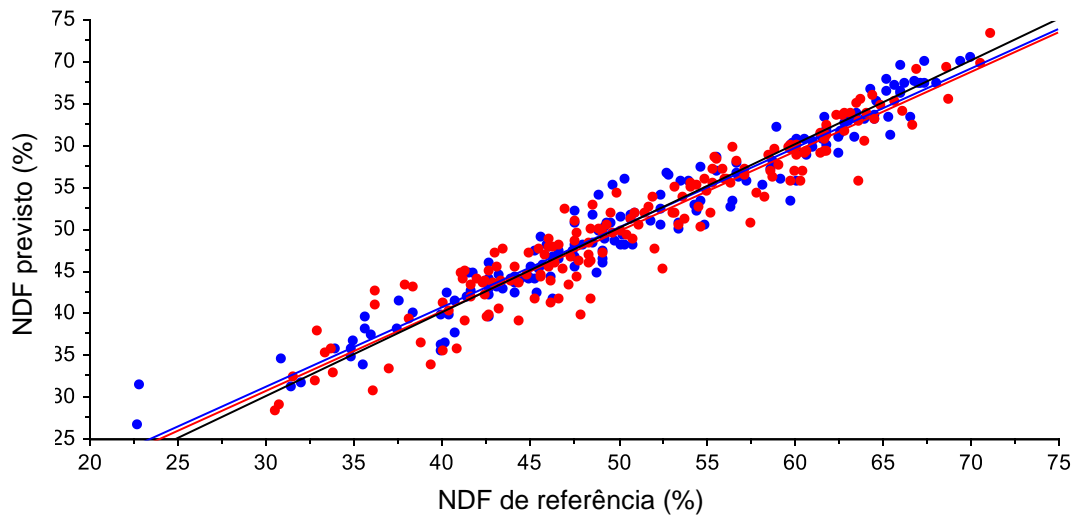


Figura 12 - Valores de referência versus valores de estimados pelo modelo para a fibra (NDF) em pastagens desidratadas.

As figuras 13 a 15 representam, respectivamente para a HP, para a PB e para a fibra (NDF) em pastagens verdes, a comparação entre os valores de referência, obtidos pelas técnicas laboratoriais standard, e os valores estimados pelos modelos estabelecidos com base na aplicação da técnica NIRS. Também nestas figuras, os pontos a azul representam para os modelos respectivos a fase de calibração e os pontos a vermelho representam os resultados da fase de validação.

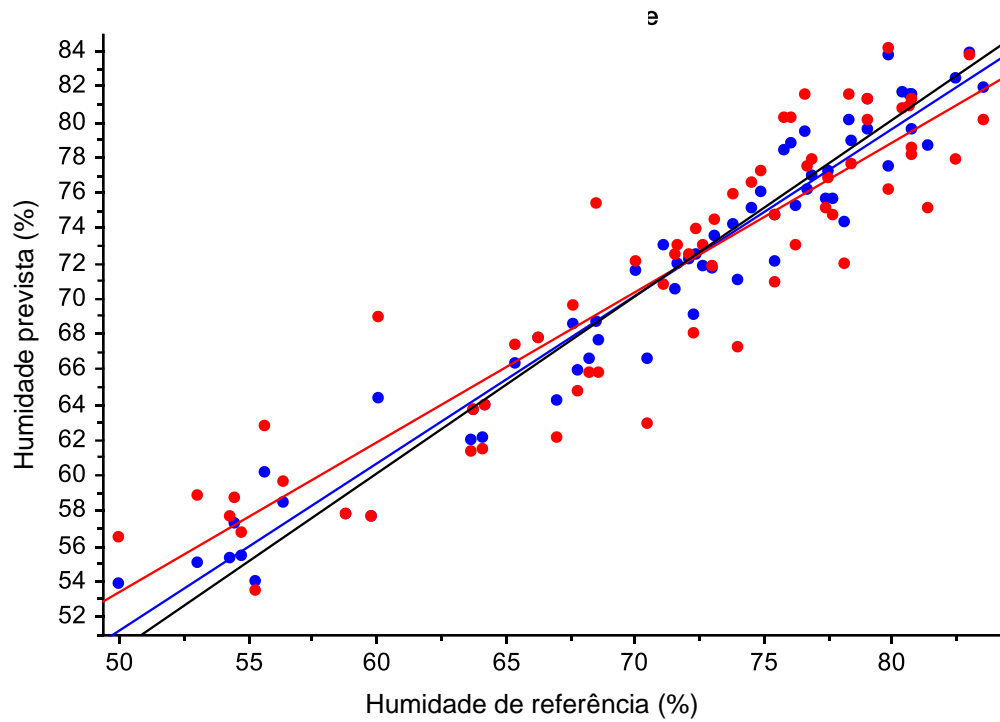


Figura 13 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a humidade da pastagem (HP) em pastagens verdes.

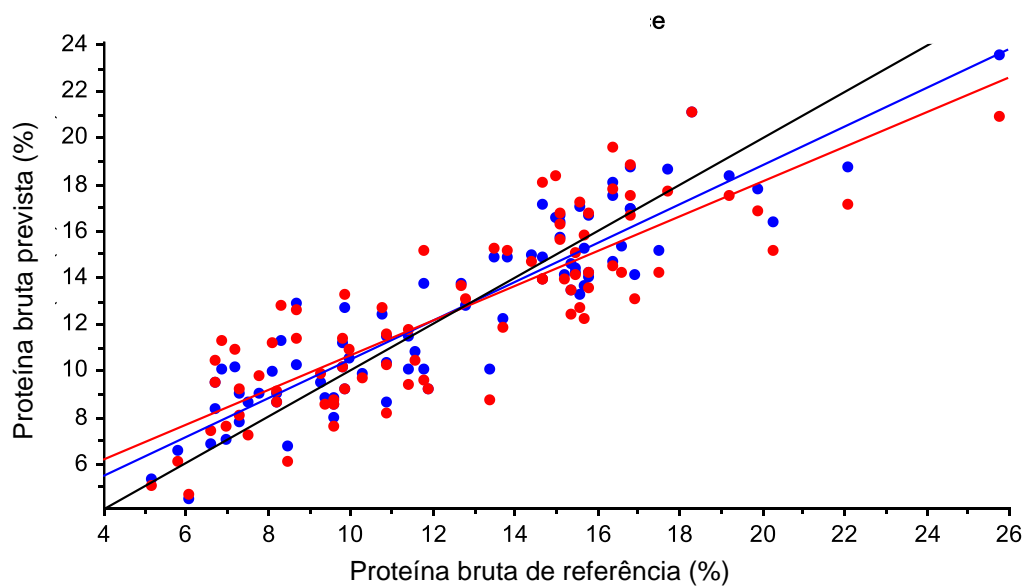


Figura 14 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a proteína bruta (PB) em pastagens verdes.

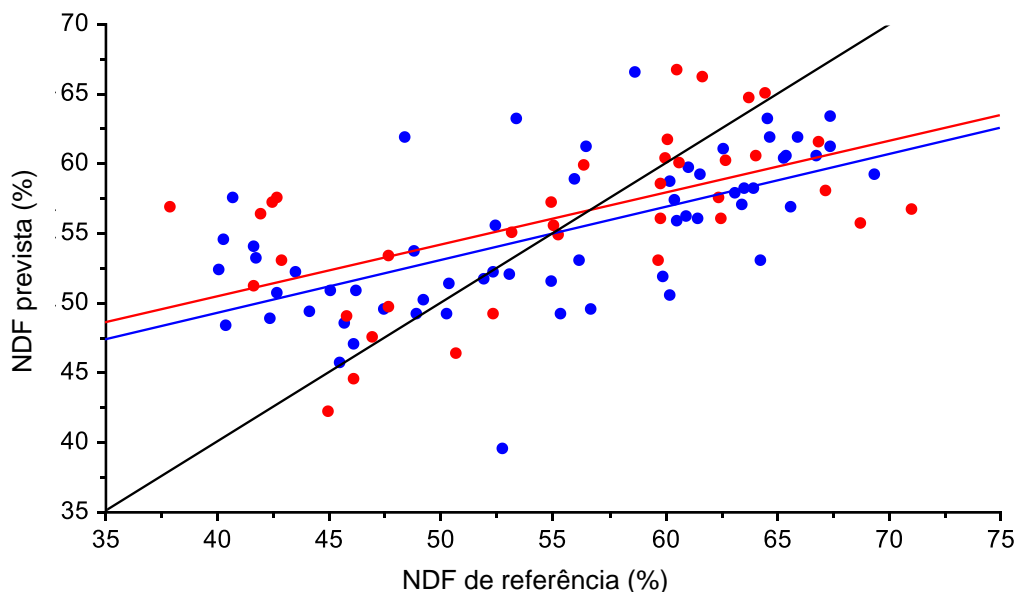


Figura 15 - Valores de referência versus valores estimados pelo modelo para a fibra (NDF) em pastagens verdes.

Estes resultados mostram, para todos os parâmetros e tanto para as pastagens secas como para as pastagens verdes, um vasto intervalo de variação e uma estreita similaridade dos conjuntos de calibração e validação, o que constitui um excelente indicador da boa representatividade de todo o grupo de amostras.

Os coeficientes de determinação obtidos com as pastagens secas (0,936 para a PB e 0,914 para NDF; $p < 0.01$) sugerem o potencial da técnica NIRS na estimativa destes dois parâmetros (PB e NDF), importantes indicadores da qualidade da pastagem. Este excelente potencial preditor é confirmado pelos valores do “RPD” (4,01 para a PB e 3,48 para NDF) (Versari et al., 2014) e podem ser usados em análises de rotina (Baten, 1998). Estes valores também indicam uma maior precisão de estimativa do modelo para a PB do que para a fibra, o que está de acordo com outros estudos (Garcia e Cozzolino, 2006; Serrano et al., 2020).

Os resultados inferiores obtidos para a qualidade dos modelos calculados a partir da pastagem verde eram, como referido atrás, espectáveis atendendo aos teores elevados de humidade destas amostras, o que interfere com a qualidade dos espectros obtidos (Bell et al., 2018). Também o número mais reduzido de amostras de pastagem verde pode ter contribuído para a menor qualidade dos modelos obtidos com estas amostras de pastagens (sem preparação e

homogeneização). Estes resultados realizados com as amostras de pastagens verdes colocam algumas reservas quanto às possibilidades de aplicação com espectrómetros portáteis, diretamente na pastagem, no campo, de forma não destrutiva e em tempo real, não só devido às já referidas perturbações causadas pela humidade interna da própria pastagem, mas também devido à variabilidade de fatores ambientais externos (temperatura, luminosidade, humidade, por exemplo) (Donis-González et al., 2020). Importa referir ainda em relação a este aspeto que, na preparação das amostras da pastagem verde, pretendeu-se o mínimo de manuseamento das amostras, de modo a não influenciar o peso húmido destas, bem como a sua informação nutricional (Alomar et al., 2003; Santos, 2018). Por isso, estas foram processadas no espectrómetro da mesma forma das amostras secas, isto é, recorrendo a um amostrador automático equipado com uma célula rotativa de 90 mm de diâmetro, demasiado pequena para o efeito. A falta de homogeneidade das amostras pelo facto de serem, constituídas por partes inteiras da matéria vegetal, composta por caules, folhas e flores da massa vegetal colhida no campo, dificultou a recolha dos espetros. Para tentar solucionar este problema sem que ocorra a destruição das amostras em verde, a utilização de um espectrómetro NIR portátil poderia ser uma alternativa (Bell et al., 2018).

Atendendo ao reduzido número de estudos publicados relativos à aplicação da abordagem NIR-FT a amostras de pastagem em verde, em especial a utilização de espectrómetros portáteis, e ao efeito da preparação prévia da amostra na estimativa da qualidade da pastagem através da técnica NIRS (Parrini et al., 2019), os resultados obtidos neste trabalho confirmam a importância de, no futuro próximo, desenvolver e aprofundar este tipo de estudos (Serrano et al., 2021).

5. Conclusão

Neste trabalho podemos concluir que o método da espectroscopia do infravermelho próximo com transformada de Fourier tem elevada precisão na previsão do conteúdo em proteína bruta (PB; $R^2= 0.935$) e fibra em detergente neutro (NDF; $R^2=0.911$) em amostras de pastagem seca. Nestas condições obtiveram-se modelos de previsão que permitem estimar com excelente precisão os parâmetros de qualidade da pastagem ao longo do seu ciclo vegetativo, de um modo mais rápido e menos trabalhoso em comparação com os métodos laboratoriais tradicionais (análises de referência). Estes modelos poderão ser elementos-chave na tomada de decisão em termos de produção animal extensiva, particularmente ao nível da estimativa das necessidades de suplementação alimentar e em face da imprevisibilidade climática característica da região Mediterrânica.

Apesar deste potencial e na procura de soluções com respostas mais rápidas, sem processamento prévio das amostras de pastagem, avaliou-se também esta técnica (NIRS) em laboratório, mas com as amostras de pastagem em verde (sem qualquer processamento prévio). Os modelos obtidos revelaram ser menos robustos. Para além do menor número de amostras envolvido, deverão ter contribuído de forma decisiva para estes resultados a interferência da variabilidade dos teores de humidade das amostras, associada à grande heterogeneidade das mesmas. Nesta perspetiva, será importante continuar a desenvolver estudos que permitam encontrar soluções para estas limitações. Algumas delas poderão passar pela utilização de sensores NIR portáteis (“micro NIR”), procurando estimar parâmetros de qualidade da pastagem diretamente no campo, em tempo real. Atendendo à expansão da utilização de drones ou de satélites na agricultura (por exemplo, o Sentinel-2 da Agência Espacial Europeia), com plataformas equipadas, por exemplo, com sensores óticos, abrem-se oportunidades para a monitorização expedita da variabilidade espacial e temporal da qualidade das pastagens.

6. Referências bibliográficas

Aleixandre-Tudo, J.L.; Nieuwoudt, H.; Olivieri, A., Aleixandre, J.L.; Toit, W. (2018). Phenolic profiling of grapes, fermenting samples and wines using UV-Visible spectroscopy with chemometrics. *Food Control*, 85, 11–22.

Alomar, D.; Fuchslocher, R.; de Pablo, M. (2003). Effect of preparation method on composition and NIR spectra of forrage samples. *Animal Feed Science and Technology*, 107, 191–200.

AOAC. *Official Method of Analysis of AOAC International*, 18th ed.; AOAC International: Arlington, AT, USA, 2005.

Bagchi, T.B.; Sharma, S.; Chattopadhyay, K. (2016). Development of NIRS models to predict protein and amylase content of Brown rice and proximate compositions of rice bran. *Food Chemistry*, 191, 21 – 27.

Barreto, Sérgio. (2015). *Avaliação da variabilidade espacial numa pastagem permanente: novas tecnologias de apoio à gestão do ecossistema solo-planta-animal*. Dissertação de Mestrado, Évora, Universidade de Évora, 70pp.

Barros, J. e Freixial, R. (2012). *Pastagens*. Universidade de Évora, Departamento de Fitotecnia, Évora, 38pp.

Batten, G.D. (1998). Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: The potencial and the limitations. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 697–706.

Bell, M.J.; Mereu, L.; Davis, J. (2018). The use of mobile near-infrared spectroscopy for real-time pasture management. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 1–10.

Dias, Cristina (2015). *Caraterização de forragens da ilha Terceira através da espectroscopia NIR*. Dissertação de Mestrado, Açores, Universidade dos Açores, 56pp.

Donis-González, L.R; Valero, C.; Momin, M.A.; Kaur, A.; Slaughter, D.C. (2020). Performance Evaluation of two commercially available portable spectrometers to non-invasively determine table grape and peach quality attributes. *Agronomy*, 10, 148.

Donnelly, D.M.; Dórea, J.R.R.; Yang, H.; Combs, D.K. (2018). Comparison of dry matter measurements from handheld near infrared units with oven drying at 60°C for 48 hours and other on-farm methods. *Journal of Dairy Science*, 101, 997–9977.

Efe Serrano, J. (2006). *Pastagens do Alentejo: bases técnicas sobre caracterização, pastoreio e melhoramento*. Universidade de Évora - ICAAM, Évora. 219 pp.

Fagan, C.C.; Everard, C.D.; McDonnell, K. (2011). Prediction of moisture, calorific value, ash and carbon content of two dedicated bioenergy crops using near-infrared spectroscopy. *Bioresour Technology*, 102, 5200–5206.

Garcia, J; Cozzolino, D. (2006). Use of near infrared reflectance (NIR) spectroscopy to predict chemical composition of forages in broad-based calibration models. *Agricultura Técnica*, 66, 41–47.

Goering, H.K.; Van Soest, P.J. (1970). Forage Fibre Analysis (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications); Agriculture Handbook no. 379; USDA-ARS: Albany, USA.

Kleinebecker, T.; Helmut Klaus, V.; Hölzel, N. (2011). Reducing sample quantity and maintaining high prediction quality of grassland biomass properties with near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19, 495–505.

Lugassi, R.; Chudnovsky, A.; Zaady, E.; Dvash, L.; Goldshleger, N. (2015). Spectral slope as an indicator of pasture quality. *Remote Sensing*, 7, 256–274.

Magalhães, Diogo (2014). *Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo na monitorização de processos farmacêuticos*. Dissertação de Mestrado, Lisboa, Faculdade Ciências, 127pp.

Martins, Afonso (2015). *Avaliação quantitativa e qualitativa da variabilidade espacial de uma pastagem melhorada de sequeiro no Alentejo*. Dissertação de Mestrado, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia (ISA), 100pp.

Martins, Miguel (2020). *Avaliação do efeito da correção da acidez do solo na produtividade e qualidade de uma pastagem sob montado*. Dissertação de Mestrado, Évora, Universidade de Évora, 59pp.

Moreira, N. (2002). *Agronomia das forragens e pastagens*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 190pp.

National Research Council. *Nutrient Requirements of Sheep*, 6th ed.; Volume 5; National Academy Press: Washington, DC, USA, 1985.

Parrini, S.; Acciaioli, A.; Franci, O.; Pugliesi, C.; Bozzi, R. (2019). Near Infrared Spectroscopy technology for prediction of chemical composition of natural fresh pastures. *Journal of Applied Animal Research*, 47, 514–520.

Santos, Maria (2017). *Desenvolvimento e validação de métodos de espectroscopia no infravermelho próximo e médio para a caracterização de lamas de ETAR para uso agrícola*. Dissertação de Mestrado, Lisboa, Instituto Superior Técnico (IST), 87pp.

Santos, Tiago (2018). *Avaliação qualitativa e quantitativa de pastagens e forragens numa exploração agropecuária em modo biológico na região da Flandres, Bélgica*. Dissertação de Mestrado, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia (ISA), 110pp.

Serrano, J.; Shahidian, S.; Marques da Silva, J. (2018). Monitoring seasonal pasture quality degradation in the Mediterranean Montado ecosystem: Proximal versus remote sensing. *Water*, 10, 1422.

Serrano, J.; Shahidian, S.; Carapau, A.; Elisa Rato, A. (2021). Near infrared Spectroscopy (NIRS) and Optical Sensors for Estimating Protein and Fibre in Dryland Mediterranean Pastures. *AgriEngineering*, 3, 73–91

Serrano, J.; Shahidian, S.; Marques da Silva, J.; Paixão, L.; Carreira, E.; Carmona-Cabezas, R.; Nogales-Bueno, J.; Rato, A. E. (2020). Evaluation of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) and Remote Sensing (RS) for Estimating Pasture Quality in Mediterranean Montado Ecosystem. *Applied Sciences*, 10, 4463.

Serrano, J.; Shahidian, S.; Silva, J. (2019). Evaluation of Normalized Difference Water Index as a tool for monitoring pasture seasonal and inter-annual variability in a Mediterranean agro-silvo-pastoral system. *Water*, 11, 62.

Simões, Rita. (2008). *Potencialidades da Espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier na caracterização de aguardentes vínicas*. Dissertação de Mestrado, Aveiro, Universidade de Aveiro, 131pp.

Souza, M.; Kuhnen, S.; Kazama, D.C.S.; Kurtz, C.; Trapp, T.; Júnior, V.M.; Comina, J.J. (2017). Prediction of contents of phenolic compounds and flavonoids in Aerial part of *Secale Ceale* L., *Avena Strigosa* L. and *Raphanus sativus* L. with Near infrared spectroscopy (NIR). *Quimica Nova* 40, 1074–1081.

Versari, A.; Laurie, V.F.; Ricci, A.; Laghi, L.; Parpinello, G.P. (2014). Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 60, 2–18.

Vestia, J.; Barroso, J.M.; Gaspar, L.; Rato, A.E. (2019). Predicting calcium in grape must and base wine by FT-NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 276, 71–76.

Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, 109–130.