

Determinación de la composición química de heno mediante la espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS)

Determination of chemical composition of hay by near infrared spectroscopy (NIRS)

Cozzolino¹, D., Fernández, E.G., Restaino, E.A. y La Manna, A.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
Estación Experimental INIA La Estanzuela, Uruguay

Resumen

El objetivo de este trabajo fue investigar el uso de la espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predecir la composición química de heno de pasturas. Noventa muestras de un amplio rango de características físico - químicas y origen, fueron leídas en un equipo monocromador NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring, USA) en el rango de longitudes de onda de 400 a 2500 nm, en reflectancia. Los coeficientes de determinación en calibración (R^2) y el error estándar de la validación cruzada (SEVC) fueron 0,96 (SEVC: 0,82%), 0,95 (SEVC: 4,97%), 0,93 (SEVC: 1,54%), 0,85 (SEVC: 17,2%) y 0,75 (SEVC: 5,0%) para cenizas, fibra detergente neutro (FDN), proteína cruda (PC), materia seca (MS), y fibra detergente ácido (FDA) en base materia seca, respectivamente. Los resultados demuestran el potencial de la técnica NIRS para el análisis de rutina de heno de pasturas para cenizas, FDN, y PC.

Palabras clave: heno, composición química, NIRS.

Summary

The aim of this study was to investigate the use of near infrared reflectance (NIR) spectroscopy to determine chemical composition in hay samples. Ninety hay samples were sourced from a wide range of physical, chemical characteristics and origin and analysed in a NIR monochromator instrument (NIRSystems, Silver Spring, USA) using wavelengths between 400 to 2500 nm in reflectance. The coefficients of determination in calibration (R^2) and the standard error in cross validation (SECV) were 0.96 (SECV: 0.82%), 0.95 (SECV 4.97%), 0.93 (SECV: 1.54%), 0.85 (SECV: 17.2%) y 0.75 (SECV: 5.0%) for ash, crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF), dry matter (DM) and acid detergent fibre (ADF), in dry matter basis, respectively. The results showed the potential of NIRS to analyse ash, NDF and CP in hay samples.

Key words: hay, chemical composition, NIRS.

Recibido: febrero de 2006

Aceptado: noviembre de 2006

1. Ingenieros Agrónomos, Técnicos de la Estación Experimental INIA La Estanzuela.

2. Corresponding author: The Australian Wine Research Institute, Waite Road, PO Box 197, Glen Osmond, SA 5064, South Australia. Daniel.Cozzolino@awri.com.au

Introducción

Los métodos utilizados para el análisis químico de forrajes han permanecido sin cambios desde el desarrollo del análisis proximal en la Estación Experimental de Weende en Alemania (Coleman y Murray, 1993). En la década de los 60, Van Soest y colaboradores desarrollaron un sistema alternativo para el análisis de las fracciones de pared celular y fibra de los forrajes (Coleman y Murray, 1993). La espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) fue introducida como una herramienta de análisis de productos agrícolas por Karl Norris hacia fines de los 60 en el USDA-ARS de Betsville (Norris et al., 1976; Murray, 1993; Cozzolino et al., 2000). El NIRS es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante, y de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración (Alomar y Fuchslocher, 1998; Givens y Deaville, 1999). El método utiliza la región de longitudes de onda entre los 700 y 2500 nanómetros (nm) del espectro electromagnético (Alomar y Fuchslocher 1998; Deaville y Flinn, 2000). La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces entre C-H, O-H y N-H, componentes principales de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en distintas formas (Givens y Deaville, 1999; Cozzolino, 2002; Cozzolino et al., 2003).

La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Lambert-Beer, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de las moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Alomar y Fuchslocher, 1998; Cozzolino, 2002). Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea, el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano es la combinación de bandas de absorciones parciales superpuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuen-

tran picos, valles y curvaturas en forma de hombro (Alomar y Fuchslocher, 1998; Deaville y Flinn, 2000). Al desarrollar una calibración NIRS, la información espectral (óptica) se relaciona mediante un algoritmo con la información de la composición físico-química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos como regresión múltiple, componentes principales y cuadrados mínimos parciales (Cozzolino et al., 2000; Deaville y Flinn, 2000; Cozzolino, 2002). El objetivo del trabajo fue el de evaluar el potencial de la técnica NIRS para la determinación del valor nutritivo en heno y henolaje de pasturas.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 90 muestras de heno y henolaje, de distinta composición botánica (mezclas y especies puras), provenientes de distintas regiones de Uruguay y muestreadas en predios comerciales durante el período 2001 - 2002. Las muestras frescas fueron secadas a 60°C en estufa de aire forzado por 48 horas (materia seca parcial, MSp) previo análisis químico y NIRS. Las muestras secas fueron posteriormente molidas en un molino tipo Wiley con mallas de 4 mm y 1 mm (Arthur H. Thomas, USA) y analizadas químicamente en el laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay. El contenido de materia seca analítica (Msa, estufa a 103°C durante 24 hs), cenizas (C) (incineración de las muestras a 500°C) y proteína cruda (PC = N x 6,25) fueron analizadas según procedimientos convencionales (AOAC, 1990). La fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) se analizaron acorde la modificación de la técnica según Robertson y Van Soest (1981) y Van Soest et al. (1991). Los resultados de los análisis químicos se expresaron en base materia seca. Las muestras de heno y henolaje (secas y molidas)

fueron analizadas en el rango de longitud de onda de 400 - 2500 nm en un instrumento monocromador NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA) en una cubeta circular de 50 mm de diámetro y 2 mm de espesor (número de parte NIRS IH-0325). Los datos de reflectancia se guardaron como el logaritmo ($1/R$) (donde R = reflectancia) a 2 nm de intervalo (1050 datos por muestra). La luz difusa reflejada (R) por la muestra fue registrada en detectores de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada en $\log 1/R$ y enviada a una computadora para su almacenamiento y procesamiento (Cozzolino, 2002; Cozzolino et al., 2003). En forma paralela a la señal digital de luz reflejada, la computadora recibe una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia almacenada, le corresponde una longitud de onda. Se desarrollaron las ecuaciones de calibración entre el método de referencia y la información NIRS ($\log 1/R$) usando el método estadístico de los cuadrados mínimos parciales (PLS) (Shenk y Westerhaus, 1993; Naes et al., 2002). Se empleó la validación cruzada para evitar el sobreajuste de los modelos y para validar los modelos estadísticos y/o calibraciones desarrolladas (Naes et al., 2002). La validación cruzada es el método de validación usado cuando no se dispone de un número suficiente de muestras ($n < 100$). Se aplicó corrección de los espectros mediante el procedimiento de SNV (varianza normal estándar) (Barnes et al., 1989). El tratamiento matemático aplicado a los espectros fue (2,5,5); donde el primer número indica el orden de la derivación o substracción (dos es la segunda derivada del logaritmo $1/R$), el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer, y el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado. Los parámetros estadísticos de las calibraciones calculadas incluyen el coeficiente de determinación en la calibración (R^2), el error estándar de la validación cruzada (SEVC) y el coeficiente de

determinación en la validación cruzada (R^2_{VC}) (Shenk y Westerhaus, 1993). Las ecuaciones de calibración fueron seleccionadas sobre la base de minimizar el SEVC. El programa utilizado para el desarrollo de las ecuaciones fue el The Unscrambler (version 9.2, CAMO, ASA, Norway).

Resultados y Discusión

En el Cuadro 1 se presenta la composición química, con media, rango y desviación estándar de las muestras de heno y henolaje de pasturas utilizadas para construir las calibraciones NIRS. Antes de construir las ecuaciones de calibración, los espectros NIRS de las muestras, fueron analizados estadísticamente mediante el método de los componentes principales (ACP). Este método permite reducir la dimensionalidad de las variables y observar la presencia de muestras con características atípicas (Naes et al., 2002). La Figura 1 presenta el resultado del ACP realizado a los espectros NIRS de las muestras de heno y henolaje. Los dos primeros componentes explican el 90% de la varianza en las muestras, observándose una cierta separación (variabilidad) entre muestras de heno y henolaje. Después de este análisis, se decidió juntar los dos tipos de muestras, ya que la variación observada en los espectros no fue importante y al bajo número de muestras disponibles para desarrollar las calibraciones NIRS. En el Cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos para las calibraciones NIRS de los distintos parámetros químicos analizados. De mayor a menor los coeficientes de determinación en calibración (R^2) se ordenan en 0,96 (SEVC: 0,82%), 0,95 (SEVC: 4,97%), 0,93 (SEVC: 1,54%), 0,85 (SEVC: 17,2%) y 0,75 (SEVC: 5,0%) para cenizas, FDN, PC, MSp, y FDA respectivamente. Se observó que el contenido de humedad residual de la muestra una vez seca y molida varió considerablemente con el tiempo de conservación en el labora-

Cuadro 1: Composición química de las muestras de heno utilizadas (% base materia seca).
Table 1: Chemical composition of hay samples used (% dry matter).

	Media	DS	Min	Max
MSp	69,3	25,6	22,8	94,3
PC	10,3	3,1	4,7	20,3
FDA	42,3	7,7	26,4	65,7
FDN	72,8	9,8	39,5	92,5
Cenizas	7,5	2,4	4,1	18,0

MSp: materia seca parcial, PC: proteína cruda, FDA: fibra detergente ácido, FDN: fibra detergente neutro, DS: desvío estándar, Min: mínimo, Max: máximo.

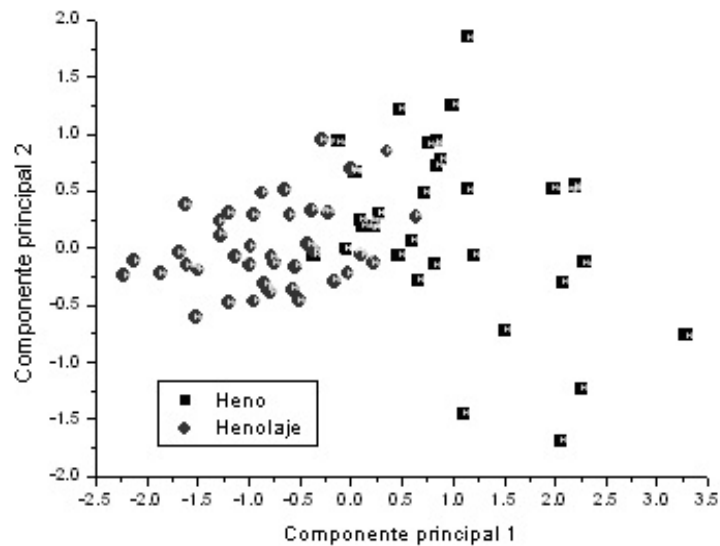


Figura 1: Componentes principales de muestras de heno y henolaje analizadas por la técnica NIRS.
Figure 1: Principal component of hay and haylage samples analyzed using NIRS.

torio, y con el tiempo transcurrido entre el análisis y la lectura NIRS, los que pueden explicar los bajos R^2 en calibración y altos SEVC para las predicciones de materia seca (Roberts et al., 2004). El poder de predicción de NIRS decrece con el aumento de la complejidad del parámetro analizado, como es el caso de la FDA (Roberts et al., 2004). En la región del infrarrojo es difícil determi-

nar entidades complejas como son la FDN y FDA, ya que los datos espectrales obtenidos por el NIRS representan con mayor exactitud a la estructura química real de la muestra que a estructuras o elementos determinados por la química húmeda, como son las fracciones fibra ácida o neutra o sus constituyentes que componen la pared celular de los vegetales (Cozzolino et al.,

Cuadro 2: Parámetros estadísticos de las calibraciones NIRS para heno de pradera.
Table 2: Statistics for the NIRS calibrations in hay samples.

	n	R ²	SEVC	RPD
MSp	60	0,85	17,2	1,5
PC	71	0,93	1,54	3,0
FDA	73	0,75	5,0	1,5
FDN	66	0,95	4,97	2,0
Cenizas	70	0,60	0,82	3,0

MSp: materia seca parcial, PC: proteína cruda, FDA: fibra detergente ácido, FDN: fibra detergente neutro, n: número de muestras utilizadas en la calibración, R²: coeficiente de determinación en la calibración, SEVC: error estándar de la validación cruzada en % base materia seca, RPD= SD/SEVC.

2000; Deaville y Flinn, 2000). Estas últimas no corresponden a entidades moleculares definidas sino a determinaciones empíricas que, por tanto, no permiten definir los reales grupos químicos involucrados (Alomar y Fuchlocher, 1998; Roberts et al., 2004). Para el caso de las cenizas, se debe tener en cuenta que las sustancias inorgánicas y los minerales no poseen absorción en la región del infrarrojo. Sin embargo se pueden asociar a la estructura orgánica bajo la forma de óxidos, quelatos u otros complejos, e indirectamente ser estimados por la técnica NIRS. La Figura 2 muestra los coeficientes de regresión en la región del infrarrojo de 1400 a 2500 nm para las ecuaciones NIRS desarrolladas. Las longitudes de onda entre 1900 - 1950 nm (O-H, contenido de humedad), 2070 - 2100 nm y entre 2290 - 2400 nm (C-H y C-C combinaciones) son las que influyen las ecuaciones desarrolladas. Una forma de evaluar las ecuaciones NIRS con

relación a su precisión y exactitud es a través de la relación entre la desviación estándar del análisis químico y el SEVC, llamada RPD (Williams, 2001). Si el RPD es mayor a 3 las ecuaciones resultan en un elevado poder de predicción y pueden ser utilizadas en el análisis de rutina (Williams, 2001). El valor de RPD obtenido para los parámetros analizados en este estudio fue 1,5 para MSp; 3 para PC; 3 para cenizas; 2 para FDN y 1,5 para FDA respectivamente. Los valores de RPD obtenidos sugieren que el NIRS puede ser utilizado para la predicción de cenizas, PC y FDN en heno y heno-laje de pasturas. Sin embargo las ecuaciones necesitan ser validadas con nuevas muestras, ya que el número de muestras utilizadas en este estudio no es lo suficientemente grande. Del mismo modo se sugiere la evaluación de calibraciones para los dos tipos de muestra separadamente.

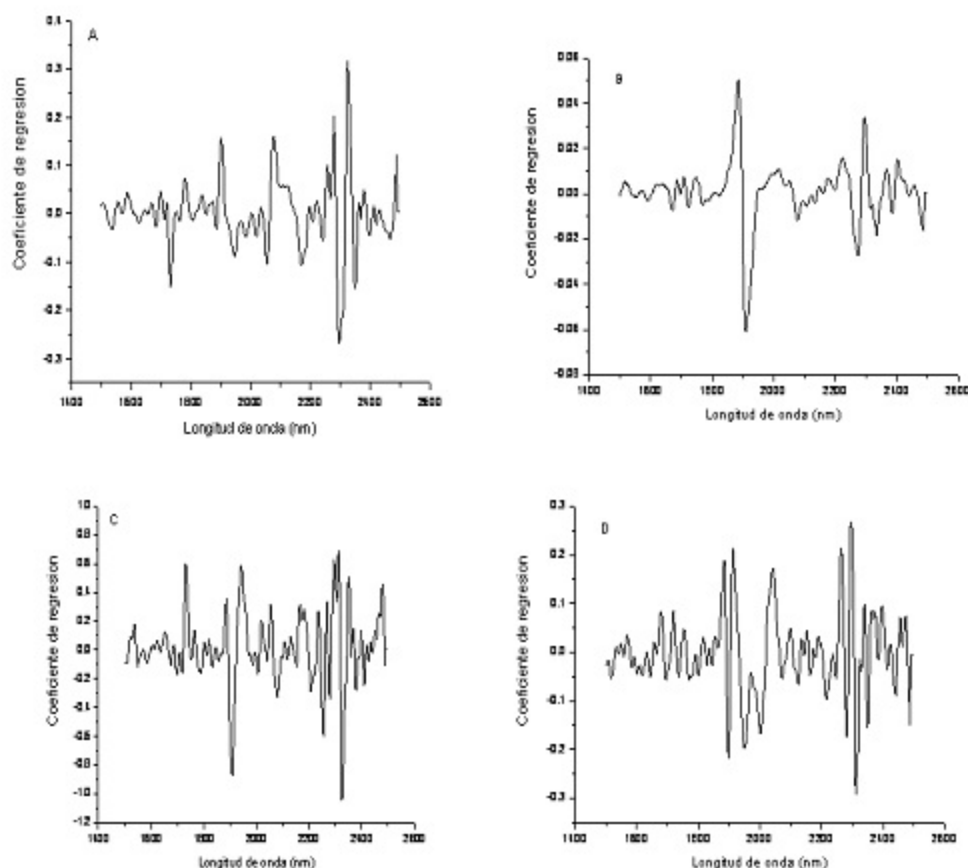


Figura 2: Coeficientes de regresión de las ecuaciones NIRS desarrolladas. PC: proteína cruda (A), FDA: fibra detergente ácido (B), FDN: fibra detergente neutro (C), C: cenizas (D).
Figure 2: Coefficients of regression for the NIRS equations developed.

Conclusiones

Se obtuvieron buenas calibraciones NIRS para cenizas y PC; regulares para la fracción de fibra o pared celular (FDN) e inferiores para FDA y materia seca. Este trabajo demuestra que la fácil colección de espectros a través de la técnica NIRS permite una rápida determinación de la calidad de heno y henolaje de pasturas y un aumento en la velocidad de realización de los análisis de rutina en los laboratorios de nutrición animal y evaluación de forrajes.

Las calibraciones desarrolladas en el presente trabajo necesitan ser validadas con nuevas muestras (nueva cosecha, orígenes botánicos) antes de su uso comercial.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los técnicos del laboratorio de Forrajes y Concentrados de INIA La Estanzuela. El trabajo fue financiado por INIA – Uruguay y productores.

Bibliografía

- Alomar, D. y Fuchslocher, R. 1998. Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur* 26:88 - 104.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K (ed) (15 th. ed). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- Barnes, R.J., Dhanoa, M.S. and Lister, S.J. 1989. Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 43:772 - 777.
- Coleman, S.W. and Murray, I. 1993. The use of near infrared reflectance spectroscopy to define nutrient digestion of hay by cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.* 44: 237 - 249.
- Cozzolino, D., Fassio, A. and Gimenez, A. 2000. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *J. Sci. Food Agric.* 81:142 - 146.
- Cozzolino, D. 2002. Predicción de la composición química de alimentos para rumiantes mediante la espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en Uruguay. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 22: 81 - 86.
- Cozzolino, D., Fassio, A. y Fernandez, E. 2003. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agric. Tec. (Chile)* 63: 387-394.
- Deaville, E.R. and Flinn, P.C. 2000. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. 301-320 p. D.I. Givens, E. Owen; R.F.E. Axford and H.M. Omedi (eds), In: *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Givens, D.I. and Deaville, E.R. 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50:1131 - 1145.
- Murray, I. 1993. Forage analysis by near infrared spectroscopy. 285-312 p. A. Davies; Baker, R.D.; Grant, S.A. and Laidlaw, A.S (eds). In: Chapter 14. *Sward Herbage Measurement Handbook* British Grassland Society. UK.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T. and Davies, T. 2002. A User-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- Norris, K.H., Barnes, R.F, Moore, J.E. and Shenk, J.S. 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci.* 43:889 - 897.
- Roberts, C.A., Stuth, J. and Flinn, P.CH. 2004. Analysis of forages and feedstuffs. In: Roberts, C.A., Workman, J. and Reeves, J.B. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy in Agriculture*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. 231 - 269.
- Robertson, J.B. and Van Soest, P.J. 1981. The detergent system of analysis. In: James, W.P.T. and Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker, N.Y. and Basel, 123 - 158.
- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. 1993. Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. Monograph. Infracore International. Port Matilda, Pennsylvania, USA.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3883-3597.
- Williams, P. C. 2001. Implementation of Near-Infrared technology, In: Williams, P.C., Norris, K.H. (Eds), *American Association of Cereal Chemist*. St. Paul, Minnesota, USA, 145-169.