

USO DE LA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO PARA EL ANÁLISIS DE CALIDAD DE ENSILAJE DE MAÍZ¹

Use of near infrared reflectance spectroscopy to analyze corn silage quality¹

Daniel Cozzolino^{2,3*}, Alberto Fassio³, Enrique Fernández³

ABSTRACT

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) was used to predict the chemical composition of corn silage samples (*Zea mays* L.). Two hundred samples of a wide range of both chemical characteristics and origins were scanned in a monochromator instrument (NIRS 6,500, NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA) over the wavelength range between 400 to 2,500 nm, in reflectance mode. Calibration coefficients of determination (R^2_{cal}) and standard error in cross validation (SECV) were 0.94 (SECV: 0.74%), 0.94 (SECV: 0.54%), 0.91 (SECV: 1.8%), and 0.90 (SECV: 3.8%) for dry matter (DM), crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) respectively, dry weight basis. The results demonstrate the potential of NIRS for the routine analysis of corn silage to determine DM, CP and ADF.

Key words: Near infrared reflectance spectroscopy, NIRS, quality, corn silage, *Zea mays* L.

RESUMEN

La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) fue utilizada para predecir la composición química del ensilaje de maíz (*Zea mays* L.). Doscientas muestras de un amplio rango de características físico-químicas y origen, fueron leídas en un equipo monocromador (NIRS 6.500, NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA) en el rango de longitudes de onda de 400 a 2.500 nm, en reflectancia. Los coeficientes de determinación en calibración (R^2_{cal}) y el error estándar de la validación cruzada (SECV) fueron 0,94 (SECV: 0,74%), 0,94 (SECV: 0,54%), 0,91 (SECV: 1,8%), y 0,90 (SECV: 3,8%) para materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) en base materia seca. Los resultados demuestran el potencial del NIRS para el análisis de rutina del ensilaje de maíz para MS, PC, y FDA.

Palabras clave: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, NIRS, calidad, ensilaje de maíz, *Zea mays* L.

¹ Recepción de originales: 24 de septiembre de 2002.

² The Australian Wine Research Institute (AWRI), Waite Road, PO Box 197, Urrbrae, South Australia 5064.
E-mail: Daniel.Cozzolino@awri.com.au *Autor para correspondencia.

³ Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Estanzuela, Ruta 50 – km 12, Colonia, Uruguay.
E-mail: fassio@inia.org.uy eferman@inia.org.uy

INTRODUCCIÓN

El ensilaje de planta entera de maíz (*Zea mays* L.) es la base de la suplementación invernal y estival, en los sistemas de producción animal intensiva en Uruguay. Los cambios bacteriológicos y químicos durante el proceso del ensilaje pueden afectar el rendimiento en nutrientes y la calidad final del ensilaje como alimento para los animales. Por esta razón es necesario conocer la calidad y valor nutritivo de los alimentos para uso animal, para el mercadeo de productos agrícolas a nivel predial y comercial. Los métodos cuantitativos y cualitativos tradicionales de análisis de alimentos son dificultosos, demandan tiempo, mano de obra y son de un elevado costo (Murray, 1986; Osborne *et al.*, 1993; Cozzolino, 1998; Cozzolino *et al.*, 2000).

Las propiedades ópticas de los alimentos, y en particular la aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), se emplea desde la década del 70 en la industria alimenticia, farmacéutica, y petroquímica, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales (Norris *et al.*, 1976; Murray, 1986; 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 2.500 nanómetros (nm) del espectro electromagnético (Alomar y Fuchslocher, 1998; Murray, 1996; Deaville y Flinn, 2000). Este método se basa en que cuando la luz incide sobre una muestra, una parte de los fotones es transmitida a través de la misma, siendo el resto absorbido. 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).

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, 1998). 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 encuentran 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 son la regresión múltiple, los componentes principales y los cuadrados mínimos parciales.

El objetivo principal de este trabajo fue explorar el uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis cuantitativo de PC, MS, y fibras detergente ácido y neutro del ensilaje de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron doscientas muestras de ensilaje de maíz (*Zea mays* L.) ($n = 200$) provenientes de distintas regiones de Uruguay. Las muestras frescas fueron secadas a 60°C en estufa de aire forzado por 48 h previo análisis químico y NIRS. Las muestras fueron posteriormente molidas en un molino tipo Wiley con mallas de 4 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. Materia seca (estufa a 103°C), cenizas (incineración de las muestras a 500°C) y PC ($PC = N \times 6,25$) fueron analizadas según procedimientos convencionales (AOAC, 1990). Fibra detergente ácida (FDA) (Goering y Van Soest, 1970) y fibra detergente neutra (FDN) se analizaron acorde la modificación de la técnica según Van Soest, *et al.* (1991). Los análisis químicos se expresaron en base materia seca.

Las muestras de ensilaje de maíz (secas y molidas) fueron analizadas en el rango de longitud de onda de 400-2.500 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 (1.050 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 (Alomar y Fuchslocher, 1998). En forma paralela a la señal digital de luz reflejada, la computadora recibió una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia almacenada, le corresponde una longitud de onda.

El conjunto de valores de diferentes longitudes de onda para una muestra constituye su espectro que representa la "huella dactilar" o "espectro" típico o representativo de la muestra. Se desarrollaron las ecuaciones de calibración y predicción usando el método estadístico de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1993). Las ecuaciones de regresión se detallan a continuación:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \dots\dots\dots b_nx_n$$

donde Y representa el parámetro químico o característica (PC, FDA, etc.); b_0 es el intercepto, b_1 a b_n los coeficientes de la regresión, x_1 a x_n absorbancias a diferentes longitudes de onda. Se empleó la validación cruzada para evitar el sobre ajuste de los modelos (NIRS 2, 1995) y 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 (1,5,5); donde el primer número indica el orden de la derivación o substracción (uno es la primera 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. Se exploraron otros tratamientos matemáticos (1,4,4), (2,5,5) y (2,10,10), los cuales no determinaron una mejora en las calibraciones. Las estadísticas de la calibración calculadas incluyen el error estándar de la calibración (SEC), el coeficiente de determinación en la calibración (R^2_{cal}), el error estándar de la validación cruzada (SECV) y el coeficiente de determinación en la validación cruzada (R^2_{val}) (Shenk y Westerhaus, 1993). Las ecuaciones de calibración fueron seleccionadas sobre la base de minimizar el error estándar de la validación cruzada (SECV) y/o el error estándar de la calibración (SEC). El programa utilizado fue NIRS 3.01 de ISI (Infrasoft International, Maryland, USA) (Shenk y Westerhaus, 1993). El error estándar de la calibración y el de la validación cruzada fueron calculados por el programa mediante la fórmula:

$$SEC/V : [(Quim - NIRS)^2 / (n - t - 1)]^{1/2}$$

Donde Quim es el valor del método de referencia; NIRS: valor de predicción NIRS; n: número de muestras en la calibración, t: número de términos del modelo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1993). Se utilizó la eliminación de outliers que incorpora el programa NIRS 3.01. Muestras con un $t > 2,5$ y un H (H: distancia de Mahalanobis) > 3 fueron consideradas outliers.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el **Cuadro 1** se presenta la composición química, media, rango y la desviación estándar de las muestras de ensilaje de maíz utilizadas para construir 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_{cal} se ordenan en 0,94 (SECV: 0,74%), 0,94 (SECV: 0,54%), 0,91 (SECV: 1,8%), y 0,90 (SECV: 3,8%) para MS, PC, FDA y FDN respectivamente. Los resultados fueron similares a los reportados por otros autores (De Boever *et al.*, 1997; Amari y Abe, 1997).

Cuadro 1. Composición química (%) de muestras de ensilaje de maíz utilizadas para la construcción de calibraciones NIRS (base materia seca, %).

Table 1. Chemical composition (%) of corn silage samples used to perform the NIRS calibrations (dry matter basis, %).

	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
MS	93,4	2,7	83,6	99
PC	7,9	1,5	3,7	14,8
Ceniza	6,3	0,98	4,2	11,8
FDA	31,3	4,2	19,7	45,8
FDN	59,8	8,8	40,1	82
pH	3,9	0,4	3	5,2

MS: materia seca; PC: proteína cruda; FDA: fibra detergente ácido; FDN; fibra detergente neutro, NIRS: espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Cuadro 2. Calibración y validación cruzada NIRS para distintos parámetros de calidad en ensilaje de maíz (base materia seca, %).

Table 2. NIRS calibration and cross validation for distinct quality parameters of corn silage (% dry matter basis).

	SEC	R ² _{cal}	SECV	R ² _{val}
MS	0,6	0,94	0,7	0,91
PC	0,4	0,94	0,5	0,89
Ceniza	0,4	0,80	0,5	0,71
FDA	1,2	0,91	1,8	0,85
FDN	2,8	0,90	3,8	0,80
pH	0,2	0,80	0,2	0,75

MS: materia seca; PC: proteína cruda; FDA: fibra detergente ácido; FDN; fibra detergente neutro; SEC: error estándar de calibración; R²_{cal}: coeficiente de determinación en calibración; SECV: error estándar de la validación cruzada.

NIRS: espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

El contenido de humedad residual de la muestra varió considerablemente con el tiempo de conservación en el laboratorio, y con el tiempo transcurrido entre el análisis y la lectura NIRS, lo que puede explicar los bajos R² en calibración y altos SECV para las predicciones de fibra.

Del mismo modo, el método de análisis utilizado (estufa 105°C) no es el más recomendado para la determinación de humedad de la muestra cuando se utiliza como método de referencia para la construcción de ecuaciones de calibración NIRS, particularmente con ensilajes. El efecto del secado sobre la composición de las distintas fracciones y cómo afectan a las predicciones NIRS ha sido tratado por varios autores (Alomar *et al.*, 1999).

Distintos autores comprobaron que la liofilización o titulación (método Karl Fischer) son mejores como métodos de referencia en la determinación de humedad con la técnica NIRS (Shenk y Westerhaus, 1993; Murray, 1993).

El poder de predicción de NIRS decrece con el aumento de la complejidad del parámetro analizado, como es el caso de la FDN y cenizas. En la región del infrarrojo es difícil determinar entidades complejas como la FDN, 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 (Abrams *et al.*, 1987). Estas últimas no corresponden a entidades moleculares definidas, sino a determinaciones empíricas que, por tanto, no permiten definir los grupos químicos reales involucrados (Alomar y Fuchslocher, 1998). Para el caso de las cenizas, se debe destacar que las sustancias inorgánicas y los minerales no poseen absorción en la región del infrarrojo. Sin embargo, los minerales y otros elementos inorgánicos se pueden asociar a la estructura orgánica bajo la forma de óxidos, quelatos u otros complejos, e indirectamente ser estimados por el NIRS. Para pH, las calibraciones obtenidas son moderadas. La determinación de pH por NIRS está asociada a la correlación con grupos OH de la muestra, principalmente en correspondencia con el contenido de humedad. Para cenizas y pH las calibraciones obtenidas son consideradas con un valor de predicción medio.

La relación entre la predicción NIRS y los datos reales para MS y PC se presentan en las **Figuras 1 y 2**, respectivamente.

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 error estándar de la validación cruzada (SD/SECV). Si esta relación es menor a 3 las ecuaciones resultan en un bajo poder de predicción (Murray, 1993). La relación para los parámetros en este trabajo fue 3,8 para MS; 3 para PC; 1,96 para C; 2,33 para FDA y 2,31 para FDN, respectivamente. La **Figura 3** presenta el espectro típico del ensilaje de maíz en la región del visible

y del infrarrojo cercano. Se observan absorbancias en la región del espectro visible a 420 y 660 nm, que corresponden con la absorción de la banda Soret y con la clorofila. En la región del infrarrojo se observan absorciones a 1.200, 1.450 y 1.930 nm que corresponden a la absorción de los grupos OH, asociados con el contenido de agua de la muestra. En la zona de los 1.730 a 1.750 nm corresponde con la absorción de los enlaces CH, asociados a lípidos y ácidos grasos (Murray, 1986; Cozzolino, 1998; Cozzolino *et al.*, 2000). Absorciones entre 2.100 y 2.400 nm corresponden a la absorción de los enlaces CH y combinaciones (Murray, 1986).

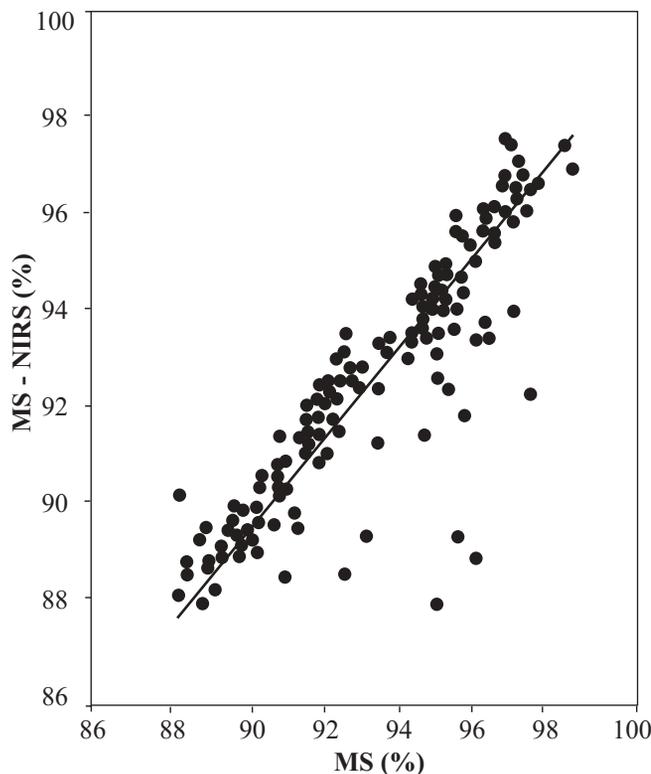


Figura 1. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para MS (%).
Figure 1. Relation between NIRS prediction and real data for dry matter (MS) (%).
 NIRS: espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

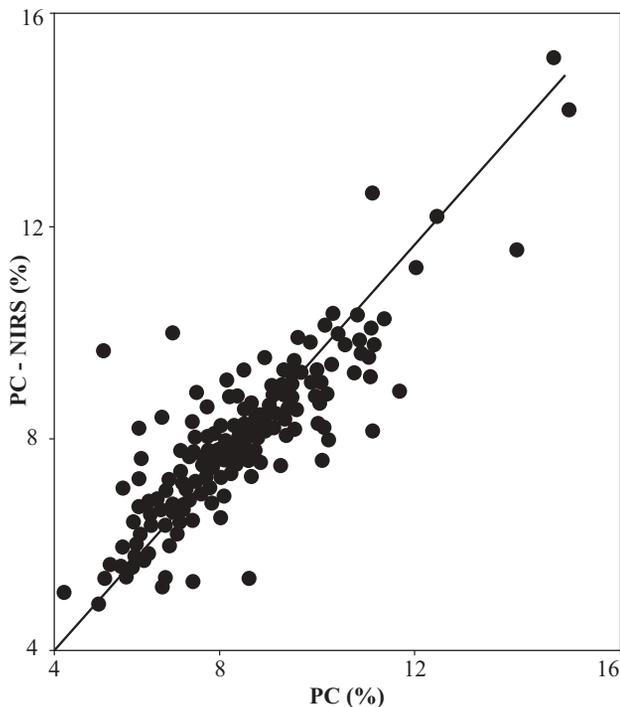


Figura 2. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para proteína cruda (PC) base MS (%).
Figure 2. Relation between NIRS prediction and real values for crude protein (PC) dry matter basis (%).

NIRS: espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

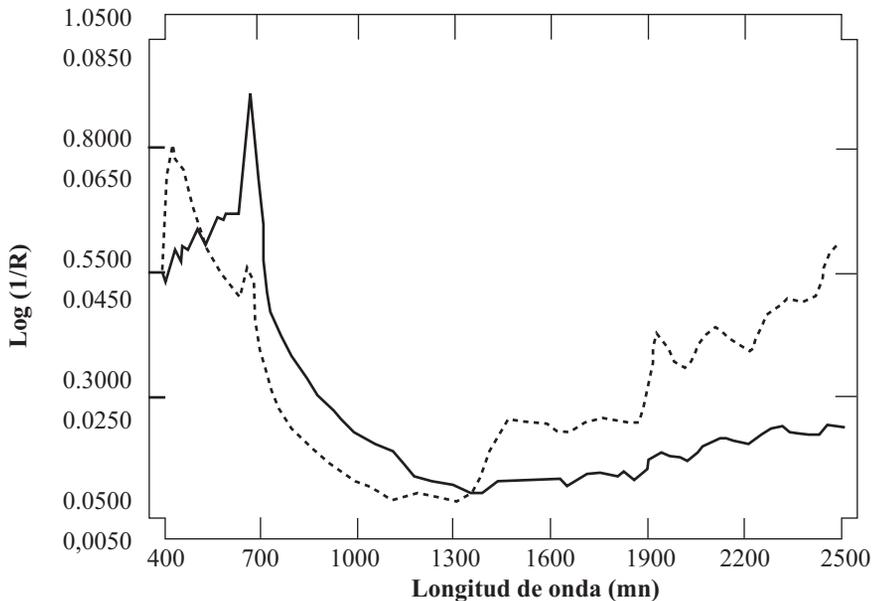


Figura 3. Espectro infrarrojo de muestras de ensilaje de maíz (línea punteada) y desviación estándar de los espectros (línea entera).
Figure 3. NIR diffuse reflectance spectra of maize silage samples (segmented line) and standard deviation (continuous line).

NIRS: espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron buenas calibraciones para MS y PC, y regulares para las fracciones de fibra (FDA y FDN) e inferiores para C y pH. Este trabajo demuestra que la fácil colección de espectros a través del NIRS permite una rápida determinación de la calidad del ensilaje de maíz y un aumento de la velocidad en la realización de los análisis de rutina en los laboratorios de nutrición animal.

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.

LITERATURA CITADA

- Abrams S.M., S.J. Shenk, M.O. Westerhaus, and F.E. Barton. 1987. Determination of forage quality by near infrared reflectance spectroscopy: efficacy of broad - based calibration equations. *J. Dairy Sci.* 70:806-813.
- Amari, M., and A. Abe. 1997. Application of near infrared reflectance spectroscopy to forage analysis and prediction of TDN contents. *Jpn. Agric. Res. Q.* 31:55-63.
- Alomar, D., y R. Fuchslocher. 1998. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur* 26:88-104.
- Alomar, D., R. Fuchslocher, and S. Stockebrand. 1999. Effects of oven or freeze drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 80:309-319.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. *In* Helrich, K. (ed.) 15th. ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.
- Barnes, R.J., M.S. Dhanoa, and S.J. Lister. 1989. Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 43:772-777.
- Cozzolino, D. 1998. Aplicación de la tecnología del NIRS para el análisis de calidad de los productos agrícolas. 15 p. Serie Técnica INIA 97. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.
- Cozzolino, D., A. Fassio, and A. Gimenez. 2000. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *J. Sci. Food Agric.* 81:142-146.
- Deaville, E.R. and P.C. Flinn. 2000. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. p. 301-320. *In* D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omedi (eds.) Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- De Boever, J.L., B.G. Cottyn, D.L. De Brabander, J.M. Vanacker, and Ch. V. Boucque. 1997. Prediction of the feeding value of maize silages by chemical parameters, *in vitro* digestibility and NIRS. *Anim. Feed Sci. Technol.* 66:211-222
- Givens, D.I., and E.R. Deaville. 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50:1131-1145.
- Goering H.K., and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis. *Agricultural Handbook* N° 379. USDA, Washington DC, USA.
- Murray, I. 1986. Near infrared analysis of forages. p. 141-156. *In* W. Haresign, and D.J.A. Cole (eds.). Recent advances in animal nutrition. Studies in the agricultural and food sciences. Butterworths, Reading, UK.
- Murray, I. 1993. Forage analysis by near infrared spectroscopy. p. 285-312. Chapter 14. *In* A. Davies, R.D. Baker, S.A. Grant, and A.S Laidlaw (eds.). Sward herbage measurement handbook. British Grassland Society, Reading, UK.
- NIRS 2. 1995. Routine operation and calibration software for near infrared instruments. 176 p. Perstorp Analytical. ISI International, Silver Spring, Maryland.
- Norris, K.H., R.F. Barnes, J.E. Moore, and J.S. Shenk. 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci.* 43:889-897.
- Osborne, B.G., T. Fearn, and P.H. Hindle. 1993. Practical near infrared spectroscopy with applications in food and beverage analysis. 227 p. 2nd ed. Longman Scientific and Technical, Essex, UK.
- Shenk, J.S., and M.O. Westerhaus. 1993. Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. 116p. Monograph. Infracsoft International, Port Matilda, Pennsylvania, USA.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* 74:3883-3597.