

## Investigación

# PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PARÁMETROS FERMENTATIVOS DE ENSILAJES DE PRADERA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS)

## Prediction of the chemical composition and fermentation parameters of pasture silage by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)

Lorena Ibáñez<sup>1\*</sup> y Daniel Alomar<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The capability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) was evaluated to predict the content of total ash (A), crude protein (CP), crude fibre (CF), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and metabolizable energy (ME); as well as pH and ammonia nitrogen content (N-NH<sub>3</sub>), in pasture silage with and without additives. Nine hundred and twenty dried and ground pasture silage samples with known chemical composition were scanned over the visible and NIR region (400 to 2500 nm) at 2 nm intervals. Calibration equations were developed by modified partial least square regression models (MPLS) with different mathematical treatments and light scatter correction as standard normal variation and Detrend (SNV & D) of the spectra. For each parameter, the optimum calibration was evaluated on the basis of the coefficient of determination of cross validation (1-VR) and standard error of cross validation (SECV). NIRS showed a high predictive ability with 1-VR > 0.89 and SECV (%) of 5.14, 6.69, 9.96, 16.01 and 9.15 for A, CP, CF, NDF and ADF, respectively. NIRS showed moderate accuracy for ME, with 1-VR > 0.87, SECV: 0.07 Mcal kg<sup>-1</sup> and low accuracy, although with feasibility as a ranking method, for pH and N-NH<sub>3</sub>, with 1-VR > 0.72 and SECV of 0.14 and 1.49, respectively. We conclude that the equations obtained can be used to predict nutritional composition of pasture silages.

**Key words:** nutritional composition, silage, pasture, spectroscopy, NIRS.

---

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilmapu, Vicente Mendez 515, Casilla 426, Chillán, Chile. E-mail: libanez@inia.cl \*Corresponding author.

<sup>2</sup>Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal, Casilla 567, Valdivia, Chile. E-mail: [dalomar@uach.cl](mailto:dalomar@uach.cl).

Recibido: 23 octubre 2007.

Aceptado: 14 enero de 2008.

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para la predicción de la composición química: cenizas totales (CT), proteína bruta (PB), fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), energía metabolizable (EM) y parámetros fermentativos: pH y nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), en ensilajes de pradera, con y sin aditivos. Se tomaron espectros (400 a 2500 nm, cada 2 nm) de muestras secas y molidas (n = 920) de ensilajes de pradera con composición química conocida. Se desarrollaron calibraciones evaluando diferentes tratamientos matemáticos del espectro y corrección de dispersión de luz como la variación normal estándar y Detrend (SNV & D) y se ajustaron ecuaciones de predicción mediante regresión de cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS). Las mejores ecuaciones se seleccionaron considerando el coeficiente de determinación (1-VR) y el error estándar (SECV), obtenidos en una validación cruzada. NIRS mostró alta capacidad predictiva con 1-VR > 0,89 y SECV (%) de 5,14; 6,69; 9,96; 16,01 y 9,15 para CT, PB, FC, FDN y FDA, respectivamente. La confiabilidad fue razonable para EM, con 1-VR > 0,87 y SECV de 0,07 Mcal kg<sup>-1</sup>; y poco confiable, pero con posibilidad de uso en clasificación por rangos para pH y N-NH<sub>3</sub>, con 1-VR > 0,72 y SECV de 0,14 y 1,49%, respectivamente. Se concluyó que las ecuaciones obtenidas pueden ser usadas para predecir la composición nutricional de ensilajes de pradera.

**Palabras clave:** composición nutricional, ensilaje, pradera, espectroscopía, NIRS.

## INTRODUCCIÓN

Una de las claves para mejorar la rentabilidad de la producción de leche en las regiones templado-húmedas del sur de Chile, es la producción de ensilajes de alta calidad, ya que cerca del 30% de la superficie cubierta por praderas se conserva mediante ensilaje (Anrique *et al.*, 1999). La composición nutricional de estos ensilajes puede ser obtenida mediante técnicas tradicionales de carácter químico y biológico que en general se caracterizan por un alto costo, tiempo, instrumentación y ser contaminantes (Deaville y Flinn, 2000). Sin embargo, existe una técnica alternativa, la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) que en las últimas décadas se ha desarrollado y cobrado importancia por ser multianalítica, no destructiva, rápida, no contaminante, de gran precisión y exactitud; sin embargo requiere de ecuaciones de calibración apropiadas (Deaville y Flinn, 2000; Osborne, 2000).

La región NIR se encuentra en el rango de longitudes de onda entre 700 y 2500 nm en el espectro electromagnético (Norris, 1989; Deaville y Flinn, 2000). Cuando una muestra es escaneada, la energía radiante se absorbe selectivamente de acuerdo a las frecuencias de vibración específicas de las moléculas

presentes y produce un sobretono en el espectro. Todos los enlaces orgánicos (i.e., C-H, N-H y O-H) tienen bandas de absorción en la región NIR, mientras que los minerales sólo pueden ser detectados en complejos orgánicos (Osborne, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005). Por lo tanto, NIRS puede detectar los enlaces de las fracciones de proteínas, grasas y carbohidratos en forrajes. Los datos ópticos almacenados como espectros NIRS son sometidos a regresión con datos químicos o de referencia, para entregar la mejor correlación y la ecuación resultante es usada para predecir los parámetros en muestras desconocidas (Park *et al.*, 2005).

De esta forma, siendo NIRS una técnica secundaria, varios estudios han entregado resultados con calibraciones NIRS para predecir tanto componentes nutricionales como parámetros fermentativos en ensilaje (Peldoza, 1999; Park *et al.*, 2005). En los trabajos desarrollados en la Universidad Austral de Chile se han obtenido ecuaciones para predecir la calidad nutricional de ensilajes del sur de Chile (Peldoza, 1999). Sin embargo, el uso de aditivos en el proceso de ensilado constituye una variable que no ha sido considerada como factor relevante en la calidad de las predicciones.

El uso de aditivos en la confección de ensilajes se orienta a mejorar las condiciones de fermentación y conservación del forraje. Entre los aditivos más utilizados están los acidificantes orgánicos, entre los que se destaca el ácido fórmico que disminuye el pH de la masa ensilada y tiene acción antibacteriana, restringiendo la actividad de bacterias ácido-lácticas, lo que permite mayor disponibilidad de carbohidratos solubles residuales como fuente de energía para el rumen (Elizalde *et al.*, 1996). Otro tipo de aditivos son los biológicos, que corresponden a inóculos de bacterias ácido-lácticas homo fermentativas, o mezclas de éstas con enzimas que hidrolizan los polisacáridos para aumentar la disponibilidad de sustrato fermentable.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar y evaluar la aplicación de NIRS en la predicción de la composición nutricional de ensilajes de praderas con y sin aditivos de la zona templado-húmeda del sur de Chile, a fin de verificar el potencial de predicción de la técnica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras**

Se utilizaron muestras frescas de ensilajes de pradera (n = 920) dominada principalmente por ballica perenne (*Lolium perenne* L.), obtenidas en predios ubicados en la región templado-húmeda del sur de Chile (39°05' a 41°30' lat. S), en el período 2004 a 2006. Del total de muestras analizadas, 464

correspondieron a muestras de ensilajes sin aditivos y 456 a muestras de ensilajes con aditivos de distintos tipos. De las muestras con aditivo, 246 contaban con la identificación de éste: 12 muestras contenían ácido fórmico; 36 muestras tenían Biomax 5: *Lactobacillus plantarum* con cepas PA-28 y K-270 (Chr. Hansen Biosystems, Milwaukee, Wisconsin, USA); 88 muestras contenían Powerstart: *L. lactis*, *L. plantarum* L-54, y *L. plantarum* Aber F1 (Genus plc, Cheshire, UK de ABS Global, DeForest, Wisconsin, USA) y 110 muestras presentaron Sill all: *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *L. salivarius*, celulasa, hemicelulasa, amilasa y pentosanasa (Alltech, Nicholasville, Kentucky, USA).

### **Análisis de referencia para composición química**

En el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, las muestras frescas se presecaron en duplicado usando horno de ventilación forzada a 60 °C por 48 h, posteriormente se molieron en un molino tipo Wiley con malla de 1 mm (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA) y se almacenaron en bolsas de polietileno hasta la colección de sus espectros y análisis por las técnicas de referencia. La materia seca (MS) se determinó eliminando la humedad residual en estufa a 105 °C por 12 h. Las cenizas totales (CT) se obtuvieron mediante calcinación en mufla a 550-600 °C por 5 h (Bateman, 1970; AOAC, 1996). El contenido de proteína (PB), calculado como el contenido de nitrógeno  $N \times 6.25$ , se determinó por el método Kjeldahl, adicionando selenio como catalizador (Bateman, 1970). El método de Weende se usó para la determinación de fibra cruda (FC) (AOAC, 1996). La fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinaron de acuerdo al procedimiento de Van Soest y AOAC (Van Soest, 1991; AOAC, 1996). La energía metabolizable (EM) se obtuvo de la ecuación:  $EM \text{ (Mcal kg}^{-1}\text{)} = 1,279 + 0,0325 D$ , donde el valor D corresponde al contenido de la materia orgánica digestible (%) en la MS, determinada *in vitro* (Tilley y Terry, 1963). El valor de pH se obtuvo por medición potenciométrica del extracto (pH metro) (Playne y McDonald, 1996). Se calculó el N amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) con una determinación titrimétrica previa destilación Kjeldahl (AOAC, 1996). Todos los parámetros se expresaron base MS.

### **Espectros NIR**

Los espectros de reflectancia se obtuvieron mediante un monocromador de barrido (Foss-NIR Systems, Modelo 6500, Silver Spring, Maryland, USA) con un módulo de rotación, poniendo la muestra en una cubeta circular de aluminio anodizado con ventana de cuarzo, de 35 mm de diámetro y 10 mm de profundidad. Un computador personal con el software WINISI 1.04 (Infrasoft International, 1992) se utilizó para manejar el equipo, procesar los datos ópticos y desarrollar las calibraciones.

El espectro de cada muestra se obtuvo promediando 16 lecturas sucesivas, sometiendo las muestras a la radiación electromagnética en el rango visible-NIR, entre 400 y 2500 nm, a intervalos de 2 nm, con lo que se dispuso de espectros de 1050 valores por cada muestra. Los datos espectrales (microabsorbancia) se almacenaron como el logaritmo del recíproco de la reflectancia ( $\log_{10} 1/R$ ).

### **Calibración de la composición química y espectros NIR**

Las ecuaciones de calibración se obtuvieron usando el método de regresión de cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) (Hruschka, 2001). Para evitar el sobreajuste, limitar el número de términos y seleccionar las mejores ecuaciones se utilizó una validación cruzada, dividiendo el set de calibración en cuatro grupos. En este proceso de validación se calculó un estimador de incertidumbre o error estándar (SECV) y uno de certidumbre o coeficiente de determinación ( $1-VR$ ), los que finalmente se promediaron, arrojando un valor de SECV y de  $1-VR$  para la validación (Infrasoft International, 1992; Shenk y Westerhaus, 1994). Se evaluó con o sin pretratamiento de datos espectrales, combinando la varianza normal estándar (SNV) y Detrend (SNV & D) que corresponden a algoritmos que reducen el efecto del tamaño de partículas y mejoran la exactitud de calibración (Infrasoft International, 1992; Deaville y Flinn, 2000).

Se probaron tratamientos matemáticos descritos por cuatro cifras (e.g., 2, 4, 4, 1), donde el primer dígito indica orden de la diferenciación o pseudoderivada del  $\log_{10} 1/R$ , el segundo número es el intervalo de sustracción o “gap”, y el tercer y cuarto dígito indican el primer y segundo segmento de suavización o “smooth” (Osborne, 2000). Estos tratamientos se aplican con el objetivo de destacar información espectral relevante y reducir el número de datos, mediante sustracciones de segmentos suavizados del espectro.

Se definió un protocolo de detección y eliminación de muestras aberrantes (“outliers”), tanto de carácter espectral (H), como respecto de la magnitud de su desviación entre el valor predicho por NIRS y el valor de referencia (T). El valor crítico para muestras aberrantes de tipo H se fijó en 10, mientras que el valor crítico para eliminar muestras por diferencia residual de valores analíticos (T) se fijó en 2,5. Las mejores ecuaciones de calibración se seleccionaron por su menor valor de SECV, mayor valor de  $1-VR$  y la mayor relación entre la desviación estándar de los datos de referencia del set de calibración y el SECV, conocida como ratio performance deviation (RPD). Según Williams (2001), valores de RPD menores a 2,4 corresponden a ecuaciones poco confiables para propósitos de predicción. Con relaciones RPD entre 2,4 y 3,0 la calidad predictiva aumenta y la ecuación se puede aplicar con fines de aproximación o clasificación en rangos. Cuando el RPD es superior a 3,0 la calidad de la ecuación es aceptable para fines de predicción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición química de las muestras

El número de muestras, promedio, rango y desviación estándar para los componentes químicos se presenta en el **Cuadro 1**. Si bien el número total de muestras disponibles fue de 920, la cantidad de datos de composición de referencia que estuvieron disponibles fueron menores y dependieron de las fracciones analíticas, ya que sólo se obtuvieron los valores químicos de aquellos componentes solicitados por cada agricultor, razón por la cual el número de muestras consideradas efectivamente en las calibraciones fue mayor a 434 para PB, FDN, FDA, EM, pH y N-NH<sub>3</sub>.

El amplio rango observado de la composición química de las muestras, representa el rango típico de ensilajes de pradera para las regiones de Los Lagos y de Los Ríos en Chile, según los valores de PB (12-20%) y de EM (2,35 Mcal kg<sup>-1</sup>) indicados por Elizalde *et al.* (1995). La amplia variación de la composición del set de calibración es una condición deseable para desarrollar ecuaciones de predicción, con alta representatividad de la realidad (Murray, 1988).

**Cuadro 1. Composición química de muestras de ensilajes de pradera usadas para desarrollar calibraciones de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) (base materia seca).**

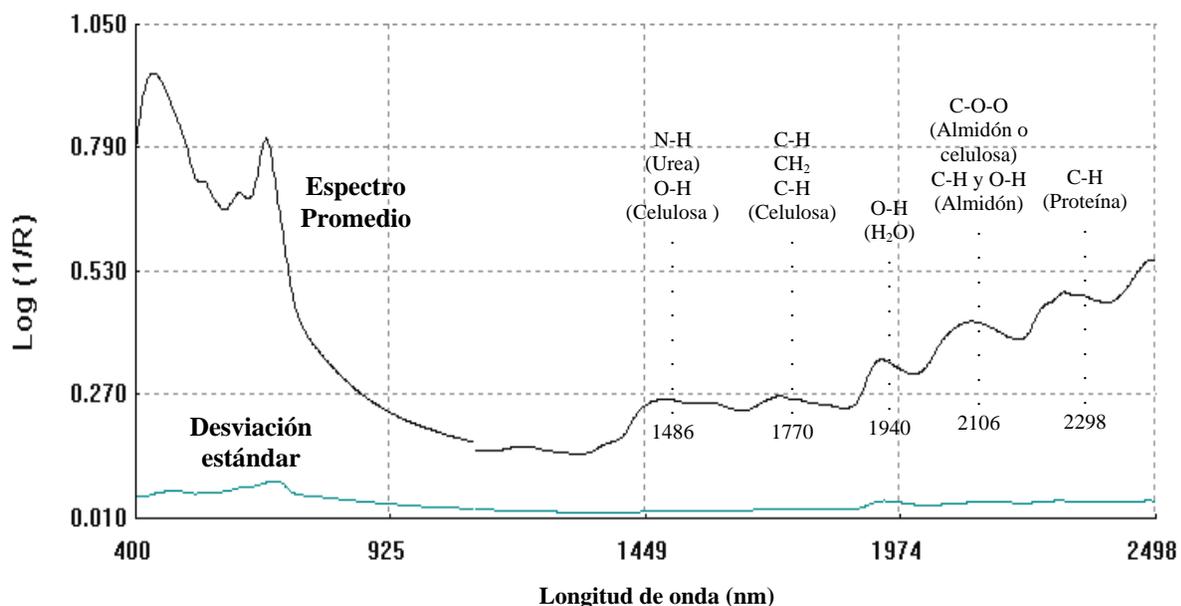
**Table 1 .Chemical composition of pasture silage samples used to perform infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibrations (dry matter basis).**

Parámetro	Número de muestras	Promedio	Rango	Desviación estándar
CT, %	867	8,85	2,06 - 17,48	1,56
PB, %	837	15,02	4,50 - 25,32	3,18
FC, %	66	29,38	21,53 - 42,67	3,93
FDN, %	761	50,71	33,29 - 83,27	7,14
FDA, %	434	32,39	21,45 - 53,52	4,45
EM, Mcal kg <sup>-1</sup>	887	2,57	1,93 - 3,00	0,19
pH	756	4,09	3,51 - 5,02	0,26
N-NH <sub>3</sub> , % N total	721	7,54	2,16 - 20,20	2,44

CT: cenizas totales, PB: proteína bruta, FC: fibra cruda, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, EM: energía metabolizable, N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal.

## Espectros NIRS de las muestras

El espectro promedio de las 920 muestras de ensilaje en la región del visible e infrarrojo cercano se presenta en la **Figura 1**. Si bien en todo el espectro del infrarrojo cercano es posible observar múltiples tipos de bandas de absorción de enlaces C-H, O-H y N-H, las combinaciones más importantes de bandas de absorción relacionadas con enlaces C-H ocurren entre los 2000 y 2500 nm, mientras que las combinaciones de bandas de absorción de O-H, asociados con el contenido de agua de la muestra, se observan entre 1940 y 2080 nm. En tanto, entre los 1730 a 1750 nm se ubican las bandas de absorción de los enlaces C-H, relacionados con lípidos y ácidos grasos. Finalmente, entre los 2100 y 2400 nm existen absorciones correspondientes a enlaces C-H y sus combinaciones (Osborne, 2000).



**Figura 1. Espectro promedio de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) y desviación estándar de muestras de ensilaje de pradera.**

**Figure 1. Average diffuse near infrared reflectance (NIR) spectra and standard deviation of the pasture silage samples.**

De las 48 ecuaciones desarrolladas para cada parámetro se seleccionaron las mejores de acuerdo a los estadísticos 1-VR, SECV y RPD (**Cuadro 2**). En todo los casos, de las dos opciones de corrección y de los múltiples tratamientos matemáticos probados, se obtuvo mejores resultados de calibración usando la corrección SNV & D y la regresión en segunda derivada del dato de reflectancia.

**Cuadro 2. Tratamientos matemáticos e indicadores estadísticos de las mejores calibraciones desarrolladas para las fracciones predichas.**

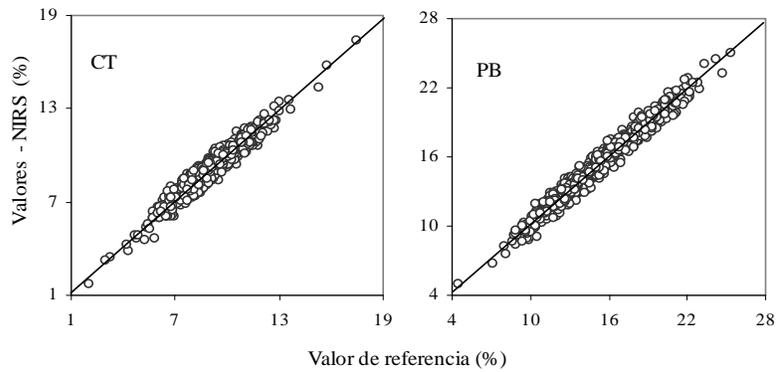
**Table 2. Mathematical treatments and statistical indicators of the best calibrations developed for the fractions predicted.**

Fracción	TM	R <sup>2</sup>	SEC	1-VR	SECV	RPD
CT, %	2,4,4,1	0,93	4,17	0,89	5,14	3,03
PB, %	2,4,4,1	0,97	5,75	0,95	6,69	4,76
FC, %	2,4,4,1	0,99	4,42	0,94	9,96	3,94
FDN, %	2,8,8,1	0,96	14,01	0,95	16,00	4,46
FDA, %	2,8,12,1	0,97	7,90	0,96	9,15	4,87
EM, Mcal kg <sup>-1</sup>	2,5,5,1	0,89	0,06	0,87	0,06	2,77
pH	2,4,8,1	0,78	0,12	0,74	0,14	1,89
N-NH <sub>3</sub> , %	2,4,8,1	0,73	1,27	0,72	1,49	1,64

CT: cenizas totales, PB: proteína bruta, FC: fibra cruda, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, EM: energía metabolizable, N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal, NIRS: espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, TM: Tratamiento matemático, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación de calibración, SEC: error estándar de calibración, 1-VR: coeficiente de determinación de validación cruzada, SECV: error estándar de validación cruzada y RPD: ratio performance deviation.

Los resultados de los modelos NIRS obtenidos fueron variables en su calidad predictiva, según la fracción involucrada. Se obtuvieron modelos con alto valor de predicción para CT, PB, FC, FDN y FDA, con valores de 1-VR > 0,89. Esto concuerda con valores de RPD > 3. La elevada calidad predictiva de estos modelos puede ser explicada en parte por la forma de obtención del dato químico, ya que los datos de referencia de estos parámetros fueron resultados de análisis gravimétricos y químicos, técnicas que presentan baja variabilidad (elevada precisión), en comparación a otras que incluyen elementos biológicos.

Entre los modelos obtenidos, destaca el alto valor de predicción de la ecuación para CT, lo cual resulta inesperado, por corresponder a sustancias inorgánicas y minerales que no poseen absorción en la región del infrarrojo cercano; aunque estos compuestos pueden asociarse a estructuras orgánicas mediante óxidos, quelatos u otros complejos, lo cual podría permitir su estimación indirecta por NIRS (Shenk y Westerhaus, 1994; Cozzolino *et al.*, 2003). Los parámetros de CT y PB tuvieron un alto coeficiente de determinación (R<sup>2</sup> > 0,93) reflejo de la alta relación entre la predicción NIRS y los datos de referencia (**Figura 2**).



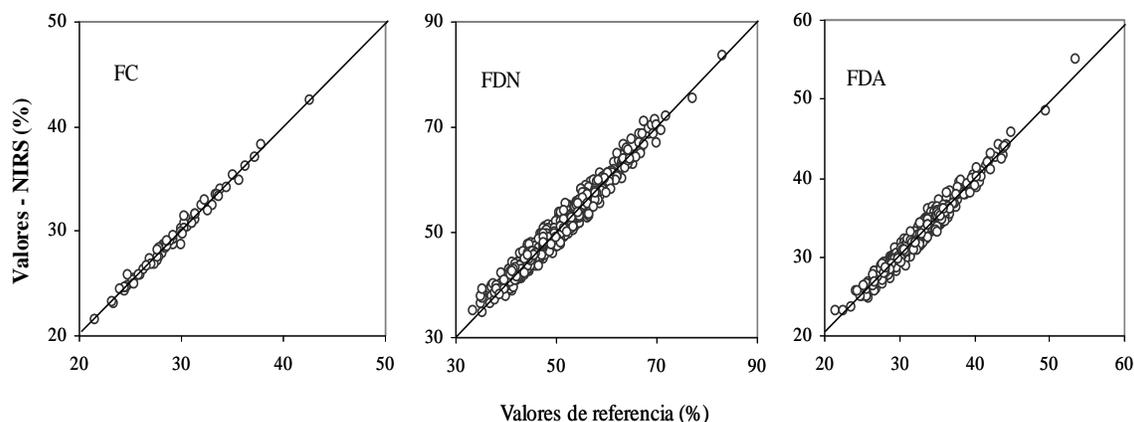
**Figura 2. Relación entre la predicción de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y los valores de referencia para cenizas totales (CT) y proteína bruta (PB) base materia seca (%). Diagonal representa línea de igual respuesta.**

**Figure 2. Relationship between near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) prediction and reference values for total ash (A) and crude protein (CP) dry matter basis (%). Diagonal represents equal response line.**

Los valores de la ecuación para CT son levemente mayores (**Cuadro 2**) a los obtenidos por Peldoza (1999) y Žnidaršič *et al.* (2006), quienes obtuvieron modelos con valores de RPD igual a 2,42 y 2,9, respectivamente. Las calibraciones NIRS para PB mostraron resultados mayores a los obtenidos por Castro (2002), con SECV = 0,89 y levemente menores a los obtenidos por Villamarín *et al.* (2002), con RPD = 5,0.

Podría esperarse que en fracciones complejas como FC, FDN o FDA, NIRS presente un bajo poder predictivo, debido a que éstas son entidades empíricas que representan estructuras complejas constituyentes de la pared celular, en tanto que los datos espectrales obtenidos por NIRS responden con exactitud a los grupos químicos reales de la muestra (Alomar y Fuchslocher, 1998; Cozzolino *et al.*, 2003). Se destaca en este estudio la alta relación entre datos predichos por NIRS y los datos de referencia, lo que conlleva a elevar considerablemente la calidad de predicción de las ecuaciones para fibra, en el caso de las fibras obtenidas por las técnicas de detergentes (FDN y FDA), con RPD > 4,46 y 1-VR > 0,96, la confiabilidad se ve robustecida por el elevado número de muestras utilizadas en calibración y validación.

Al graficar la composición predicha por NIRS y los valores obtenidos por los métodos de referencia (**Figura 3**) se observa que la dispersión de los puntos se concentra alrededor de la línea de igual respuesta, lo que sugiere que los espectros responden fielmente a los cambios respecto de la composición química y, por tanto, permiten el desarrollo de buenos modelos de predicción.



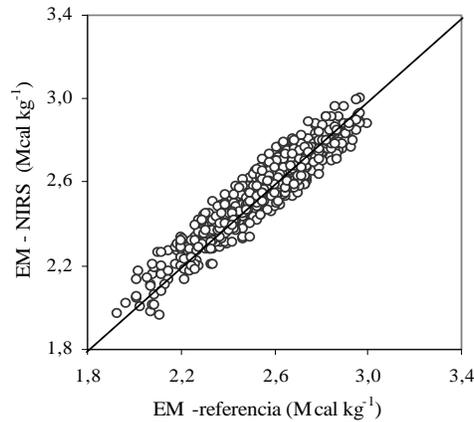
**Figura 3. Relación entre la predicción de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y los valores de referencia para fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) base MS (%). Diagonal representa línea de igual respuesta.**

**Figure 3. Relationship between near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) prediction and reference values for crude fibre (CF), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) dry matter basis (%). The diagonal represents equal response line.**

En el caso de las ecuaciones para predecir FC y FDN, los valores obtenidos fueron levemente más bajos que los conseguidos por Villamarín *et al.* (2002), con RPD de 4,5 y 4,6, respectivamente. Por otra parte, la ecuación para la predicción de FDA, presentó un valor de RPD mayor a los registrados por De la Roza y Martínez (2000) y Villamarín *et al.* (2002), quienes obtuvieron 3,7 y 3,4, respectivamente.

Por otra parte, se obtuvo un modelo NIRS de calidad predictiva moderada para EM, con  $1-VR = 0,87$  y  $RPD < 3$ , lo que se explicaría porque los valores de EM tienden a ser más variables, menos precisos y exactos, ya que en el valor de la digestión *in vitro* influyen varios factores, tales como la dilución del licor ruminal, la concentración microbiana, la condición y el tiempo de colección del licor ruminal, el tipo de buffer usado, el tamaño de partícula de la muestra, el sistema de molienda y el tipo de dieta que recibe el rumiante donante (Murray, 1988; Stern *et al.*, 1997; Deaville y Flinn, 2000). Así también, existe influencia de la disminución del pH del licor ruminal, especialmente cuando se usa el método *in vitro* para estudiar la digestión de la fibra, ya que las bacterias celulolíticas son más sensibles a pH bajos que las especies amilolíticas, de esta forma cuando hay una disminución del pH existiría menor digestión de la fibra y por ende menor valor de EM (Murray, 1988; Stern *et al.*, 1997). Es pertinente enfatizar que la técnica de referencia utilizada para EM consiste en una estimación a través de un modelo de regresión (a partir de la digestibilidad *in vitro*), con lo cual, en el modelo de predicción NIRS se estaría acumulando el posible error de la técnica NIRS más el de la estimación de referencia, que, como se indicó, tiene diferentes

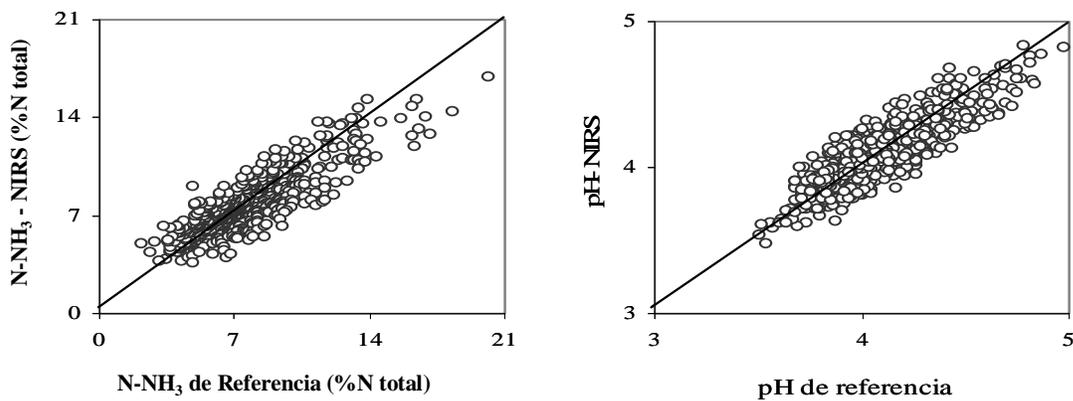
componentes. A pesar de los distintos tipos de error que puedan estar involucrados y su grado de influencia, los valores de EM predichos por NIRS presentan alta relación con los valores de referencia, con  $R^2 = 0,89$ , tal como lo demuestra la concentrada dispersión de los datos alrededor de la línea de igual respuesta (**Figura 4**). La decisión de usar estas estimaciones en la práctica, debería considerar por una parte el nivel de incertidumbre (error) que el técnico o el productor esté dispuesto a aceptar y, por otra, la posibilidad de contar con una estimación en un plazo considerablemente menor al requerido por la técnica de referencia.



**Figura 4. Relación entre la predicción de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y los valores de referencia para energía metabolizable (EM). Diagonal representa línea de igual respuesta.**

**Figure 4. Relation between near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) prediction and reference values for metabolizable energy (ME). Diagonal represents equal response line.**

Finalmente, se obtuvieron modelos NIRS con calidad de predicción más baja o pobre para los parámetros pH y N-NH<sub>3</sub>, con  $1-VR > 0,72$  y  $RPD < 2$  (**Figura 5**).



**Figura 5. Relación entre la predicción de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y los valores de referencia para nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) como % N total y pH. Diagonal representa línea de igual respuesta.**

**Figure 5. Relation between near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) prediction and reference values for ammonia nitrogen content (N-NH<sub>3</sub>) as % total N and pH. Diagonal represents equal response line.**

Lo anterior se confirma al observar la menor correlación entre los valores de referencia de pH y N-NH<sub>3</sub> y sus espectros ( $R^2 > 0,73$ ), lo que se podría atribuir, al menos en parte, a que los respectivos análisis químicos se realizaron sobre las muestras frescas, mientras que los espectros se obtuvieron a partir de las muestras secas. En la determinación de pH por NIRS existe una asociación con grupos OH de la muestra, principalmente en correspondencia con el contenido de humedad (Cozzolino *et al.*, 2003). Por lo tanto, el espectro NIRS sólo logró rescatar una “huella” química de lo que hubo en la muestra fresca y, por ende, la relación entre los valores predichos por NIRS y los valores obtenidos químicamente es más baja, lo que se aprecia gráficamente como una mayor dispersión de los valores alrededor de la línea de igual respuesta, particularmente cuando éstos aumentan

## CONCLUSIONES

La confiabilidad de las predicciones NIRS obtenidas para ensilajes de pradera con y sin aditivos se considera elevada para el contenido de CT, PB, FC, FDN y FDA; razonable para EM y pobre para pH y N-NH<sub>3</sub>. Es difícil generalizar las condiciones específicas para obtener la mejor ecuación de regresión, ya que varían según los parámetros a predecir y las características de los análisis de referencia. Sin embargo, las mejores ecuaciones se obtuvieron con tratamientos matemáticos que incluyeron una sustracción (derivada) de segundo orden y corrección de dispersión de luz (SNV & D). El alto número y la variabilidad de las muestras utilizadas en este trabajo entregaron ecuaciones robustas que pueden ser usadas para predecir la composición nutricional de ensilajes de pradera con y sin aditivos.

## LITERATURA CITADA

- 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.
- Anrique, R., O. Balocchi, L. Latrille, D. Pinochet, D. Alomar, V. Moreira, *et al.* 1999. Competitividad de la producción lechera nacional. Vol. 1, 216 p. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- AOAC. 1996. Official methods of analysis. Vol. 1. p. 38. *In* W. Windham (ed.) 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Bateman, J.V. 1970. Nutrición animal. Manual de métodos analíticos. p. 468. Herrera Hermanos, Sucesores, México, D.F.
- Castro, P. 2002. Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for forage analysis. Lowland and Grasslands of Europe: Utilization and Development. Corporate Document Repository, FAO, Rome, Italy. Available at <http://www.fao.org/DOCREP/006/AD236E/ad236e14.htm> (Accessed 20 October 2007).
- Cozzolino, D., A. Fassio, y E. Fernández. 2003. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agric. Téc (Chile)* 63:387-393.
- De La Roza, B., y A. Martínez. 2000. Mejora en nutrición animal mediante análisis de alimentos. p. 53-54. Memoria 1999-2000. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de Asturias (SERIDA), Asturias, España.
- Deville, E., and P. Flinn. 2000. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. p. 301-320. *In* Givens, D.I., E. Owen, R.F.E. Axford, and H.M. Omedi (eds.) Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Elizalde, F., A. Hargreaves, y C. Wernli. 1996. Conservación de forrajes. p. 395-428. *In* I. Ruiz (ed.) Praderas para Chile. 2ª ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- Elizalde, H., F. Salazar, y A. Valdevenito. 1995. Efecto de la fertilización nitrogenada en la productividad, composición química y botánica de una pradera permanente destinada a ensilaje. p. 1-2. XX Reunión anual Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Coquimbo. SOCHIPA, Santiago, Chile.
- Hruschka, W. 2001. Data analysis: Wavelength selection methods. p. 39-48. *In* Williams Ph., and K. Norris (eds.) Near infrared technology in the agricultural and food industries. 2<sup>nd</sup> ed. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota, USA.
- Infrasoft International. 1992. Routine operation, calibration development and network system management manual. 335 p. Infrasoft International, Port Matilda, Pennsylvania, USA.
- Murray, I. 1988. Aspects of the interpretation of near infrared spectra. *Food Sci. Technol. Today* 2:135-139.
- Norris, K. 1989. Definition of NIRS analysis. p. 6. *In* Marten, G.C., J.S. Shenk, and F.E. Barton II (eds.) Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality. Agriculture Handbook N° 643. USDA, Washington, DC., USA.
- Osborne, B. 2000. Near-infrared spectroscopy in food analysis. p. 1-14. *In* Meyers, R.A. (ed.) Encyclopedia of analytical chemistry. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Park, R., E. Agnew, and M. Porter. 2005. Recent developments in methods to characterize the chemical and biological parameters of grass silage. p. 109-119. *In* Park, R., and M. Stronge (eds.) Silage production and utilization. Proceedings of the XIV<sup>th</sup> International Silage Conference, a satellite workshop of the XX<sup>th</sup> International Grassland Congress, Belfast, Northern Ireland. July 2005. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Peldoza, A.C. 1999. Desarrollo de ecuaciones de calibración para predecir la composición nutricional de ensilaje de pradera mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). 126 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Playne, A., and P. McDonald. 1996. The buffering constituents of herbage and silage. *J. Sci. Food Agric.* 17:264-268.
- Shenk, J., and M. Westerhaus. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. p. 406-449. *In* Fahey, G.C., *et al.* (eds). Forage quality, evaluation and utilization. ASA, CSSA, SSSA. Madison, Wisconsin, USA.
- Stern, M., A. Bach, and S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2256-2276.

- Tilley, J., and R. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-109.
- Van Soest, P., J. Robertson, and B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Villamarín, B., E. Fernández, and J. Méndez. 2002. Analysis of grass silage from Northwestern Spain by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. AOAC Int.* 85:541-545.
- Williams, Ph. 2001. Implementation of near infrared technology. p. 145-169. *In* Williams, Ph., and K. Norris (eds.) *Near infrared technology in the agricultural and food industries.* American Association of Cereal Chemist., St. Paul, Minnesota, USA.
- Žnidaršič T., J. Verbič, and D. Babnik. 2006. Prediction of chemical composition and energy value of grass silage by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Central Eur. Agric.* 7(1):117-134.