

ARTÍCULO TÉCNICO

Diana Rocío Vásquez¹,
Beatriz Abadía¹,
Luis Carlos Arreaza¹

ABSTRACT

Title: Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) applied to nutritional characterization of Guinea grass and corn grain.

In this study, the use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) as a method to estimate the nutritional quality of Guinea grass (*Panicum Maximum*) and corn (*Zea Mays*), was evaluated. These forage species were collected in the Cesar and Sinú valleys of the Colombian Caribbean. Activities included chemical analysis (content of dry matter, ash, ether extract, crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, lignin, non structural carbohydrate and non protein nitrogen as well as the *in situ* digestibility) on 70 Guinea grass and 193 corn samples; generation of the samples absorption spectra; correlation of the chemical and absorption spectra data for each component (calibration equations) and validation of the calibration equations with 22 Guinea grass and 55 corn samples.

Predictions obtained with the NIRS method were similar to the chemical measurements, except for non-structural carbohydrates, which did not relate properly due to overlapping of their spectra with those from cellulose and from non protein nitrogen because this component involves many compounds (amines, amides, amino acids, peptides that no precipitate with TCA, nucleic acids, nitrites and nitrates), that apparently do not absorb at the near infrared region tested.

Key words: NIRS, *Panicum maximum*, *Zea maiz*, calibration, validation, maize, corn.

1. Joven Investigadora; Programa de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA – COLCIENCIAS; e-mail: dinanavas@latinmail.com

2. Investigadora Adjunta; Programa de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, CI Tibaitatá; e-mail: babadia@corpoica.org.co

3. Coinvestigador; Programa de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, CI Tibaitatá; e-mail: larreaza@corpoica.org.co

Aplicación de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano de maíz

RESUMEN

El objetivo fue estandarizar la técnica de Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, NIRS) a fin de obtener la valoración nutricional del pasto Guinea (*Panicum maximum*) y del grano de maíz (*Zea maiz*) procedentes de la región Caribe (microregiones de Valle del Cesar y Valle del Sinú, respectivamente). Este objetivo se cumplió en cuatro etapas, así: Inicialmente se hicieron análisis químicos de las muestras para los siguientes componentes nutricionales: Materia Seca (MS), cenizas, extracto etéreo, proteína cruda, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, lignina, digestibilidad *in situ*, carbohidratos no estructurales y nitrógeno no proteico, sobre 70 muestras de pasto Guinea y 193 muestras de maíz. La segunda etapa se obtuvieron espectros de absorción de las muestras en el espectrofotómetro (NIRS). El tercer paso consistió en correlacionar los datos químicos con el barrido de absorción para cada uno de los componentes (ecuaciones de calibración); por último, se realizó la validación de las ecuaciones mediante análisis de 22 muestras adicionales de pasto Guinea y 55 de maíz. Según los resultados finales, el método NIRS funcionó para la mayoría de los componentes, excepto los carbohidratos no estructurales, puesto que éstos no se diferencian de la celulosa al superponerse sus espectros en diferentes longitudes de onda; así mismo, el nitrógeno no proteico, ya que está constituido por una mezcla de diferentes compuestos como aminos, amidas, aminoácidos, péptidos (que no precipitan con TCA), ácidos nucleicos, cierta cantidad de nitritos y nitratos (parte inorgánica), los cuales aparentemente no fueron absorbidos en la zona evaluada del infrarrojo cercano.

Palabras clave: NIRS, *Panicum maximum*, calibración, validación, maíz, pasto Guinea.

INTRODUCCIÓN

LA IMPORTANCIA ECONÓMICA de la ganadería ha aumentado extraordinariamente; la carne, la leche, la manteca y el queso son apreciados cada vez más como alimentos de gran valor biológico. Evidentemente, la obtención de tales productos requiere una alimentación cuidadosamente equilibrada de los animales, y por ello, el conocimiento del valor nutritivo de los alimentos es de gran importancia económica y nutricional, no sólo para el ganadero, sino también para el sector industrial. En efecto, con estos conocimientos nutricionales, y el de los requerimientos animales, se tendría una idea clara acerca de cómo debe suplementarse para maximizar la respuesta productiva animal (Church, 1992).

El control de calidad de las materias agroalimentarias constituye una necesidad cada vez más apremiante para las industrias de producción y la ganadería. En gran medida, las técnicas para la realización de estos controles se basan en su determinación en laboratorio, mediante el análisis químico o por medio del animal (en el caso de la digestibilidad *in situ*), siendo procedimientos largos, complicados y costosos en términos de materiales y de reactivos (Belitz, 1992).

Como complemento de las técnicas tradicionales surge el uso de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR), la cual se fundamenta en un principio según el cual, al irradiar con un haz de luz monocromática los materiales orgánicos,

éstos –en función de la naturaleza de los enlaces y cargas electrostáticas existentes entre sus átomos y moléculas–, absorben una determinada cantidad de energía; este valor puede expresarse en términos de la *reflectancia* (log reflectancia estándar / reflectancia de la muestra) a partir de lo cual se logra un espectro característico de cada material que refleja su composición química (Morcillo y Rubio, 1981).

El NIR se fundamenta en la quimiométrica, es decir, la aplicación de las matemáticas a la química analítica. Esta técnica combina la espectroscopia, la estadística y la computación y genera modelos matemáticos que relacionan la composición química (presencia de grupos químicos activos) con cambios de energía en la región correspondiente al rango infrarrojo cercano (longitudes de onda entre 800 y 2.500 nm).

Las ventajas de esta técnica incluyen el proveer información acerca del valor nutricional de un alimento en segundos, ser un método no destructivo, que requiere un mínimo o ningún tratamiento de la muestra, minimiza el daño ambiental y es una técnica multianalítica de alta precisión que permite predecir varios factores simultáneamente. Una vez calibrado el espectrofotómetro, el uso del NIRS redundará en bajos costos de análisis para los usuarios que los requieran, por lo que, a nivel internacional, es una metodología que tiene amplia acogida (Reeves, 2000).

Con este trabajo se pretendió aplicar el método de Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para caracterizar muestras de pasto Guinea y maíz; así mismo, estimar su valor nutricional mediante la elaboración de ecuaciones de calibración y predicción, basados en los análisis químicos correspondientes. El instrumento aporta una buena cantidad de información nutricional en poco tiempo y permite a los fitomejoradores implementar modificaciones en los bancos de germoplasma, de modo que el mejoramiento de variedades, acepciones o especies, pueda realizarse de manera más eficiente y en más corto tiempo.

Materiales y métodos

Origen de las muestras. Para la calibración del pasto Guinea (*Panicum maximum*) se utilizaron un total de 70 muestras constituidas por 18 variedades con tiempos de corte de 3, 5, 7 y 9 semanas y en épocas de invierno y

verano. Estas muestras fueron suministradas por los Centros de Investigación: Motilonia (Codazzi) y Creced Norte del Cesar (microrregión Valle del Cesar) de CORPOICA. Para la calibración de maíz (*Zea mays*) se usaron 193 accesiones procedentes del Banco de Germoplasma de CORPOICA, sembradas en el C.I. Turipaná (Cereté, microrregión Valle del Sinú), y de Palmira y El Cerrito (microregión valles interandinos). Las muestras utilizadas para realizar la validación fueron suministradas por el Centro de Investigación Turipaná e incluyeron 22 muestras de 7 variedades de Guinea y 55 muestras de maíz de diferentes variedades (CORPOICA, 2000).

Determinación de la composición química. Las muestras de Guinea fueron molidas a través de una malla de un mm en un molino Thomas Willey Modelo 4 y las muestras de maíz, en un molino Tecator (Cemotec) 1.090, malla un mm. A dichas muestras se les determinó el contenido de: materia seca (MS), ceniza (CEN), extracto etéreo (EE), proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), lignina (LIG), digestibilidad *in situ* (DIVMS), carbohidratos no estructurales (CNE) y nitrógeno no proteico (NNP) por duplicado, según las normas estandarizadas que se citan a continuación:

- NNP: Licitra, G., Hernández, T.M., Van Soest, P.T. 1996. Standardization of procedure for nitrogen fractionation of ruminants feed. Anim. Feed Sci. Tech. 57: 347-358.
- FDN: Van Soest, P.J. and R.H., Wine. 1967. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. IV. The determination of plants cell wall constituents. J. Assc. Official Anal. Chem. 50:50.
- FDA: Fiber (acid detergent) and lignin in animal feeds. 973.18 (4.6.03). AOAC. 1995.
- Proteína cruda: Microjeldahl. 988.05 (4.2.2.03).
- Materia Seca: Secado a 105° C. 934.01 (4.1.03).
- Ceniza: incineración a 550° C. 942.05 (4.1.10).
- Extracto etéreo: extractor Golfish. 920.39. (4.5.01).
- Digestibilidad *in situ*: Meherez, et al. (1977). The use of dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. Journal of Agricultural Science, p. 93.

- CNE: Somogy, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Of Biological Chemistry 195: 19-23.

Análisis mediante el infrarrojo cercano. Las muestras fueron barridas en un espectrofotómetro de infrarrojo cercano, Modelo 6500® (FOSS NIR SYSTEMS) y se utilizó el Programa WINISI II de Infracsoft International para desarrollar las ecuaciones de calibración y realizar la validación de cada uno de los componentes nutricionales (FOSS NIR SYSTEMS, 1999).

Ecuaciones de calibración. La aplicación del NIRS es un procedimiento sencillo, pudiéndose combinar estas calibraciones dentro de un mismo programa, de manera que con un único barrido de cada ingrediente o muestra, se pueden realizar simultáneamente todos los análisis citados. Así, se evita la utilización de reactivos y la emisión de vapores y residuos que contaminan el medio ambiente, facilitándose el análisis de materia seca, ceniza, extracto etéreo, proteína, fibra, lignina y la digestibilidad *in situ*; no obstante, su utilidad es restringida para carbohidratos no estructurales y nitrógeno no proteico. El uso de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) ofrece la posibilidad de analizar rápidamente los forrajes y elude la utilización de vacas canuladas, técnica que consume mucho tiempo.

El método de selección de ecuaciones de calibración desarrollado en el *Handbook of Agriculture* No. 643 (ARS, Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC) para el análisis de forrajes por NIR, establece que para cada componente, el error estándar de calibración (SEC) y el coeficiente de determinación (RSQ) de cada ecuación de calibración, representan criterios importantes para tomar una decisión respecto de la selección de la ecuación.

Existe un número disponible de métodos de calibración multivariados que incluyen la regresión lineal de pasos múltiple (MSR), los cuadrados mínimos parciales (PLS), los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) y los componentes principales (PCR) (Blanco, 1994).

En resumen, se tiene la forma básica:

$$Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n$$

Donde,

Y = componente a ser calibrado.

$X_1, X_2, \dots, X_n = n$ variables espectrales independientes, una combinación de uno o más valores espectrales.

$b_1, b_2, \dots, b_n = n$ coeficientes de regresión.
 $a =$ es el intercepto.

En la calibración, un grupo de X_s (espectros) y un grupo de Y_s (datos químicos) se usan para derivar el b_s (coeficiente de correlación), mientras que en la validación y la subsecuente predicción, un grupo de X_s (espectros) y la derivada b_s se utilizan para predecir un Y desconocido.

Resultados y discusión

Análisis químicos. En primer lugar se presentan los resultados de los análisis de calibración NIRS y los análisis químicos realizados a las muestras de Guinea (Tablas 1 y 2), y la relación que se establece entre éstos en el caso del grano de maíz (Tabla 3).

Como se puede observar, los rangos de variación de este conjunto de muestras de validación están dentro del correspondiente rango de variación del conjunto de muestras de calibración, a excepción de los carbohidratos no estructurales.

En el caso del maíz el rango de variación de las muestras de validación estuvo incluido en las correspondientes muestras de calibración. Por tanto, tal como se observa en el conjunto de muestras analizadas, se tiene un amplio rango de variación en los parámetros estudiados.

Obtención de espectros. A continuación se muestran los compendios de los espectros logrados colectivamente a partir de 70 muestras de pasto Guinea (Figura 1) y 193 muestras de granos de maíz (Figura 2).

Las Figuras 1 y 2 muestran la similitud entre grupos de espectros del mismo tipo de alimento, respecto de las principales regiones de reflectancia; a su vez, hace evidentes las diferencias debidas a otras características de cada muestra.

En los espectros se encuentra una región visible que corresponde a vibraciones electrónicas que van desde 400 nm hasta 700 nm, dividida en 6 segmentos, así: de 400 a 425, absorción violeta; de 425 a 492, absorción azul; 492 a 575, verde; de 575 a 585, amarillo; de 585 a 645, naranja; y de 645 a 700, rojo. La siguiente es la región del infrarrojo cercano cuya información de absorción presenta sobretonos desde 700 nm a 1900 nm y desde 1900 nm a 2500 nm; son bandas de combinación fundamentales de una o más bandas de sobretonos. Algunas de las más importantes bandas de CH_2 de grasa o aceite fueron encontradas en 890, 1.162, 1.720, 1.760, 2.308 y 2.340 nm. Bandas fuertes de OH propias del agua se hallaron en 960, 1.150, 1.405 y 1.905 y hasta 2.000 nm. Algunas de las más importantes bandas de NH para proteína fueron encontradas en 1.040, 1.496, 2.050 e incluso 2.176 nm (Simon, 1968).

De las calibraciones infrarrojas, es decir de la correlación entre la señal espectral del barrido y el método químico (quimométrica), se obtiene el modelo matemático estadístico que relaciona ambos parámetros, el cual se observa en la Tabla 4 para el pasto Guinea y en la Tabla 5 para el grano de maíz. En general, las ecuaciones encontradas son apropiadas, no sólo por arrojar un error estándar de calibración bajo, sino también por el alto valor del coeficiente de determinación (RSQ) (Norris, 1976).

Las ecuaciones de regresión fueron desarrolladas para aceptar la adición de más términos (absorbancias); el progra-

Tabla 1. Contenido nutricional de las muestras de pasto Guinea usadas para calibrar el espectrofotómetro NIRS.

Componente	Rango	Promedio	DE	CV
% MS	62.52 - 93.81	91.10	1.24	1.36
% CEN	8.03 - 17.10	13.43	2.03	15.11
% EE	0.56 - 2.46	1.45	0.43	29.55
% PC	2.79 - 13.98	7.69	2.08	27.01
% FDN	52.81 - 79.37	65.66	4.77	7.26
% FDA	25.59 - 45.84	33.51	4.71	14.07
% LIG	0.80 - 12.57 - 12.57	6.14	2.91	52.14
% DIVMS	31.90 - 76.45	59.13	11.87	20.08
% CNE	2.25 - 18.18	8.80	2.30	26.11
% NNP	0.47 - 6.36	3.27	1.90	58.03

Tabla 2. Composición química del grupo de muestras de pasto Guinea utilizadas en el proceso de validación.

Componente	Rango	Promedio	DE	CV
% MS	93.57 - 90.53	92.82	0.80	0.86
% CEN	13.35 - 9.25	10.90	1.16	10.66
% EE	1.51 - 0.93	1.20	0.18	14.94
% PC	10.38 - 3.65	4.74	1.73	36.57
% FDN	72.15 - 65.95	69.31	1.75	2.52
% FDA	39.75 - 33.00	35.71	1.93	5.40
% LIG	10.99 - 5.92	7.93	1.45	18.33
% DIVMS	68.88 - 40.65	48.97	5.85	11.94
% CNE	20.87 - 5.64	12.88	5.55	43.13
% NNP	1.00 - 0.21	0.47	0.21	44.45

Tabla 3. Datos químicos de muestras de calibración y validación de maíz.

Componente	Calibración		Validación	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo
% Materia seca	72.59	96.11	85.79	94.49
% Ceniza	1.06	2.79	0.54	3.78
% Extracto etéreo	1.04	12.54	0.9	8.26
% Proteína	5.69	13.82	7.95	14.12
% FDN	9.71	34.35	9.22	25.4
% Digestibilidad	62.46	88.23	68.67	81.8
% Almidones	44.87	82.78	56.14	77.32

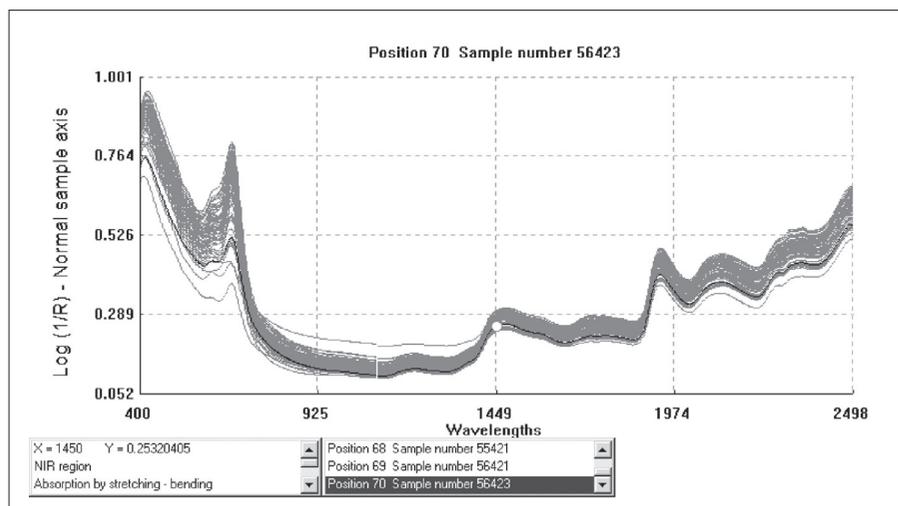


Figura 1. Compendio de espectros NIRS de pasto Guinea (70 muestras en total).

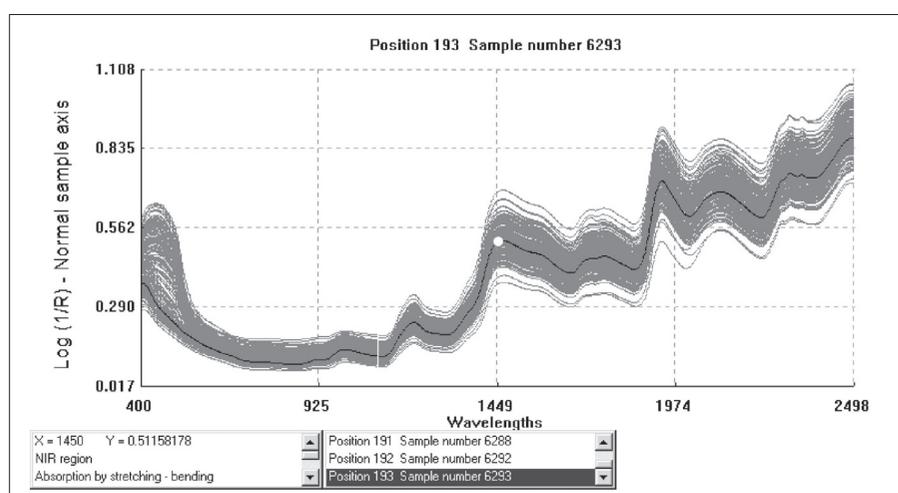


Figura 2. Compendio de espectros NIRS de maíz (193 muestras en total).

Tabla 4. Ecuaciones de calibración del pasto Guinea.

Componente	Tratamiento matemático ¹	Longitudes de onda	SEC**	RSQ***
Materia seca	2,1,1,1	408 – 1092, 10 y 1108 - 2492, 10	0.0503	0.9912
Ceniza	2,4,4,1	408 – 1092, 8 y 1108 - 2492, 8	0.2143	0.9883
Extracto etéreo	2,1,1,1	408 – 1092, 4 y 1108 - 2492, 4	0.0858	0.9341
Proteína	2,1,1,1	408 – 1092, 8 y 1108 - 2492, 8	0.2638	0.9867
FDN	2,4,4,1	406 – 1090, 10 y 1106 - 2490, 10	0.6861	0.9528
FDA	2,4,4,1	408 – 1092, 10 y 1108 - 2492, 10	0.8314	0.9715
Lignina	2,2,2,1	408 – 1092, 10 y 1108 - 2492, 10	0.5762	0.9210
DIVMS	2,4,8,1	406 – 1090, 10 y 1106 - 2490, 10	2.9863	0.9356
CNE	2,4,4,1	408 – 1092, 10 y 1108 - 2492, 10	0.7526	0.7977
Nitrógeno no proteico	2,4,6,1 (a, b, c, d)	1460 - 1482, 2 y 1484 - 1504, 2 1506 - 1536, 2 y 1566 - 1576, 2 1916 - 1928, 2 y 1976 - 1996, 2 2026 - 2036, 2 y 2046 - 2056, 2 2058 - 2076, 2 y 2176 - 2186, 2	1.2049	0.5803

¹ Se refiere a una transformación que se realiza sobre los datos de reflectancia obtenidos originalmente; el orden de esta transformación es: a: derivada; b: Gap; c: Smooth 1 y d: Smooth 2.

** SEC = Error estándar de calibración.

*** RSQ = Coeficiente de correlación.

ma puede computar 300 correlaciones o más a cada longitud de onda. Además, selecciona las correlaciones más altas, por lo cual se requiere un punto de referencia para evaluar las computaciones de la regresión. Puesto que el r está limitado a valores entre -1.0 y $+1.0$, la curva normal estadística no puede ser aplicada directamente. Se hace la transformación usando la tangente hiperbólica $r' = \tanh^{-1}$, para poder aplicar la curva estadística normal (FOSS, NIRSYSTEMS, 1996).

La desviación estándar, o error estándar de calibración para la distribución de correlaciones, corresponde al cuadrado medio del error de una regresión de cuadrados mínimos para los valores del laboratorio sobre los datos del NIRS (Buxton, 1991).

Para la mayoría de los constituyentes de Guinea se encontró un $RSQ > 0.90$, siendo una correlación fuerte, de alta significancia; excepto para los carbohidratos no estructurales y el nitrógeno no proteico, que presentan correlaciones de 0.79 y 0.58, respectivamente. Sin embargo, el SEC asociado con estos nutrientes es bueno. Para calibrar el nitrógeno no proteico se utilizaron sólo las longitudes de onda cercanas al infrarrojo, pues al utilizar todo el espectro, el RSQ no pasaba de 0.2. Al elegir aquellas longitudes de onda en las que había enlaces N-H distintos de aquellos en los que la proteína absorbe, se mejoró la ecuación. Todas las ecuaciones fueron trabajadas con la segunda derivada, un Gap (distancia entre los puntos de longitudes de onda) no mayor de 4 nm, y un Smooth 1 (eliminación de ruido) de 4, 6 y 8 nm.

En el caso del maíz, todas las ecuaciones presentaron un $RSQ > 0.90$, lo cual evidencia una correlación alta y errores estándar de calibración bajos. En estas calibraciones sobre 193 muestras se utilizó la segunda y tercera derivada, un Gap de 1 y 2, un Smooth de 1, 2, 3 y 4.

Validación de las ecuaciones de predicción obtenidas mediante NIRS. En las Figuras 3 y 4 se observa que no existen diferencias significativas entre los valores estimados al aplicar las ecuaciones de calibración con respecto a los obtenidos por métodos químicos para los componentes nutricionales medidos. Los componentes estimados de CNE y NNP presentan una gran desviación con respecto a los datos químicos en el pasto Guinea, mientras que en aquellos del maíz no se observa mucha variación.

Tabla 5. Ecuaciones de calibración del maíz.

Componente	Valor medio	Tratamiento matemático a, b, c, d	nm λ	DE	SEC	RSQ
Materia seca	89.19	3,1,3,1	1108 - 2492,8	2.27	0.23	0.9894
Ceniza	1.52	2,2,1,1	408-1092, 8 y 1108-2492, 8	0.14	0.02	0.9847
Extracto etéreo	4.49	3,1,2,1	409 - 1092, 8 y 1108 - 2492 ,8	1.79	0.32	0.9682
Proteína	9.56	3,1,4,1	1108 - 2492 ,8	1.19	0.31	0.9307
FDN	13.74	2,1,1,1	1108 - 2492 ,8	1.91	0.37	0.9631
Digestibilidad in vitro	74.59	3,1,2,1	1108 - 2492 ,8	5.20	0.74	0.9796
Almidones	62.97	2,1,1,1	1108 - 2492 ,8	7.54	2.30	0.9069

a: Derivada; b: Gap; c: Smooth 1; d: Smooth 2; SD: Desviación estándar; SEC: Error estándar de calibración.

El análisis estadístico permite comparar los resultados de los análisis químicos con los valores obtenidos a partir de los espectros NIRS y así obtener los respectivos parámetros de validación mediante el programa WINISI. Éste genera un conjunto de datos, los cuales se encuentran en la Figura 3 para Guinea y la Figura 4 para maíz.

Maíz. Se observa que los componentes FDN, digestibilidad *in vitro* y almidones son los únicos componentes que presentan un error de predicción entre 4 y 8% máximo, lo cual significa que el modelo de calibración se ajusta a las muestras ya que no sobrepasa el 10% aceptado. Para el maíz, los valores de RSQ (Coeficiente de determinación) son muy pequeños,

lo que supone baja correlación entre los datos arrojados por el equipo utilizando la ecuación y los datos químicos. Sin embargo, si se observan las Figuras 3 y 4, es evidente que cada uno de los valores de los componentes de las muestras por NIRS muestran valores muy similares a los valores introducidos por análisis químicos; así, se realizó una prueba de hipótesis de Ji cuadrado (X^2), tanto para Guinea como para maíz, a fin de poder establecer la confiabilidad y precisión de los datos estimados utilizando las ecuaciones desarrolladas.

Guinea. En general, los valores de RSQ para las ecuaciones de validación del pasto Guinea son muy bajos (< 0.4), lo que permite suponer bajos niveles de correlación, excepto para FDA; lo primero sucede cuando el número de muestras es relativamente pequeño.

Validación por prueba de hipótesis con Ji cuadrado (X^2). Esta prueba representa un criterio para la hipótesis nula de que la proporción de la población con algún atributo tiene un valor especificado; establece si los valores observados experimentalmente (O) están de acuerdo con los valores esperados (E); es decir, distribución a la que se ajusta la distribución muestral de la varianza de una población normal. Para el pasto Guinea se observó que los valores experimentales se ajustan a los teóricos esperados; por tanto, hay concordancia para materia seca, ceniza, extracto etéreo, FDN, FDA, lignina, proteína y digestibilidad *in situ* (Steel and Torrie, 1985).

Para carbohidratos no estructurales y para nitrógeno no proteico, los valores experimentales no se ajustan a los teóricos esperados, por lo que las diferencias o desviaciones son significativas y se rechaza H_0 , así:

$$X^2 \text{ Tabulado} = X^2 \alpha (GL) ; X^2 0.05 (12) = 21.00$$

Esto podría deberse a que el nitrógeno no proteico (NNP) no es una estructura química definida, sino una mezcla de diferentes compuestos: aminos, amidas, aminoácidos, péptidos (que no precipitan con TCA), ácidos nucleicos, cierta cantidad de nitritos y nitratos (parte inorgánica), los cuales aparentemente no son absorbidos en la zona del infrarrojo cercano evaluada.

La composición del almidón, de la celulosa y de los carbohidratos no

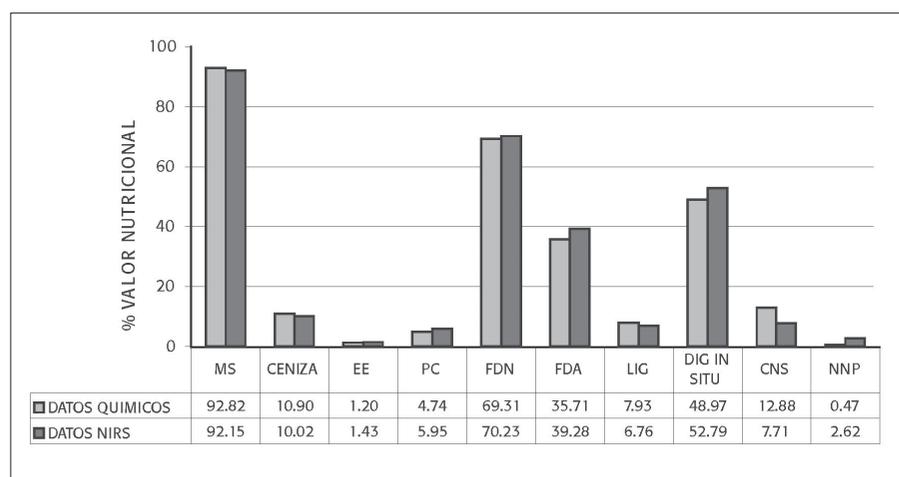


Figura 3. Comparación de datos químicos vs. NIRS para Guinea.

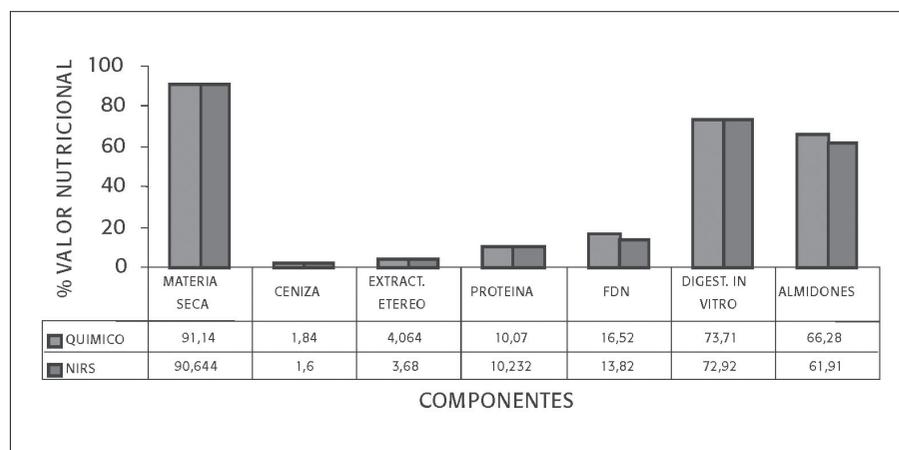


Figura 4 . Comparación de datos químicos vs. NIRS para maíz.

Tabla 6. Datos de validación de maíz por WINISI (Monitor Results).

Componente	SEP (a)	Valor promedio químico	Valor promedio NIRS	D.E químico	D.E NIRS	R ²	SLOPE
% Materia seca	1.31	91.14	90.64	2.05	2.04	0.672	0.821
% Ceniza	0.70	1.84	1.60	0.75	0.23	0.241	1.573
% Extracto etéreo	1.59	4.06	3.68	1.78	1.47	0.299	0.664
% Proteína	1.08	10.07	10.23	1.14	1.02	0.255	0.564
% FDN	4.02	16.52	13.82	3.69	2.13	0.332	0.999
% Digestibilidad <i>in vitro</i>	5.13	73.71	72.92	4.33	3.81	0.037	0.219
% Almidones	8.86	66.28	61.91	5.80	3.97	0.080	- 0.413

(a): Error estándar de predicción.

estructurales es muy similar (IICA, 1990); en el caso de CNE, no se podría aceptar concentraciones estimadas por NIRS, probablemente debido a que ellos absorben a longitudes de onda similares; las bandas se superponen y no permiten cuantificarlos adecuadamente.

Para el maíz, los valores experimentales se ajustan a los teóricos esperados por lo que las diferencias o desviaciones no son significativas para materia seca, ceniza, extracto etéreo, FDN, FDA, proteína y digestibilidad *in situ* (Tabla 6).

Para CNE, los valores observados experimentalmente no se ajustan a los teóricos esperados; es decir, no, hay concordancia y se rechaza Ho, como se dijo anteriormente debido a que el almidón podría interferir la celulosa o viceversa en algunas longitudes de onda en el infrarrojo.

$$X^2 \text{ Tabulado} = X^2 \alpha (GL); X^2 0.05 (9) = 16.9$$

Es de importancia mejorar la predicción para el NNP en NIRS, ya sea modificando su modo de cuantificación o incrementando el número de muestras a incluir en el barrido y el análisis químico, pues es esencial en la nutrición de rumiantes: la microflora del rumen es capaz de desdoblar la celulosa como fuente de energía y convertir el NNP en proteína verdadera, la cual es retenida por el organismo y los tejidos de los animales en crecimiento, dado que el nitrógeno no proteico, se convierte en el rumen en aminoácidos y proteína verdadera, que subsecuentemente aparece bajo la forma de proteínas tisulares y lácteas. Se ha visto que este tipo de compuestos (como la urea), puede reemplazar del 30 al 40 % de la proteína en raciones para bovinos y ovinos (Owen, 1976; Loosli, 1969).

Tabla 7. Datos de validación de pasto Guinea mediante WINISI (Monitor results).

Componente	SEP a	RSQ
Materia Seca	1.251	0.092
Ceniza	1.388	0.122
Extracto Etéreo	0.333	0.125
Proteína	1.817	0.366
FDN	2.912	0.002
FDA	4.131	0.737
Lignina	2.445	0.013
Digestibilidad <i>in situ</i>	7.765	0.033
Carbohidratos No Estructurales	7.462	0.007
Nitrógeno No Proteico	2.303	0.020

Tabla 8. X² calculados para los componentes del pasto Guinea.

Componente	X ² Calculado *	Concordancia
Materia Seca	0.22	No se rechaza la Ho
Ceniza	2.36	No se rechaza la Ho
Extracto Etéreo	1.39	No se rechaza la Ho
Proteína	9.91	No se rechaza la Ho
FDN	1.61	No se rechaza la Ho
FDA	6.07	No se rechaza la Ho
Lignina	8.55	No se rechaza la Ho
Digestibilidad <i>in situ</i>	16.5	No se rechaza la Ho
CNS	38.13	Se rechaza la Ho
NNP	188.96	Se rechaza la Ho

* P < 0.05

Tabla 9. X² calculados para los componentes del maíz.

Componente	X ² Calculado	Concordancia
Materia seca	0.11	no se rechaza la ho
Ceniza	0.29	no se rechaza la ho
Extracto Etéreo	4.69	no se rechaza la ho
Proteína	1.27	no se rechaza la ho
FDN	4.04	no se rechaza la ho
FDA	0.43	no se rechaza la ho
Digestibilidad <i>in situ</i>	7.24	no se rechaza la ho
CNE	39.69	se rechaza la ho

Un contexto similar se merecen los carbohidratos no estructurales, que son compuestos activos en el metabolismo de las plantas, se almacenan en órganos de reserva y están constituidos principalmente por azúcares libres, almidón y fructosanos. Este grupo de carbohidratos poseen un potencial de fermentación rápida y total en el rumen, al igual que en el proceso de fermentación del ensilaje.

Diversos carbohidratos componen este grupo y sus características de configuración son diferentes, principalmente por su grado de polimerización, por presentar anillos furanosos o piranosos, por los tipos de enlace (α 1-4, α 1-6, β 2-6), por la linealidad de la macromolécula y grado de ramificación en el carbón 6. Estas características modifican la solubilidad y susceptibilidad a la hidrólisis de los éstos.

De lo anterior se puede decir que un correcto balance entre ambos componentes o una adecuada manipulación, mejora el comportamiento animal, tanto en lo productivo, como en lo reproductivo.

Conclusiones

En este trabajo de análisis mediante Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), se mostró, tal como se refiere en la literatura, que es una tecnología aplicable y confiable para la estimación de nutrientes como materia seca, ceniza, extracto etéreo, proteína, fibra cruda, lignina y digestibilidad *in situ*.

En la región del espectro de reflectancia del infrarrojo cercano se miden principalmente las vibraciones de los enlaces químicos en los cuales el hidrógeno se une con átomos de nitrógeno, oxígeno y carbono. Presenta dificultades para el análisis de componentes como el NNP debido aparentemente a que no es una estructura química definida, sino una mezcla de diferentes compuestos, muchos de los cuales no son absorbidos en la zona del infrarrojo cercano usada.

Los carbohidratos no estructurales, como el almidón y los azúcares, tienen el inconveniente de no poder diferenciarse de la celulosa (carbohidrato estructural) como en el caso de las longitudes de onda de 858 nm a 868 nm, de 894 nm a 906 nm, de 916 nm a 918 nm, 2.096 nm a 2.106 nm y en otras longitudes de onda de 2.276 nm, 2.330 nm a 2.336 nm, que se deben a ambos tipos de carbohidratos.

El uso de la segunda derivada, Gap no mayor a 4 nm y Smooth 1 no mayor a 8 nm, para generar las ecuaciones de predicción, permite obtener mejores

resultados en comparación con otros tratamientos matemáticos.

Para la realización de la curva de calibración y posterior validación se requiere gran cantidad de muestras que tengan un amplio rango en sus valores nutricionales para que, así mismo, se vean reflejados en los resultados.

El RSQ obtenido de la validación de las ecuaciones por el software WINISI son bajos debido a la variabilidad natural del material experimental y a causa de la variabilidad de las desviaciones de los datos dentro de la cantidad limitada de las muestras. Por ello se aplicó la prueba del Ji cuadrado, ampliamente usada y de gran valor estadístico para comparar los valores esperados (NIRS) con los valores teóricos observados (químicos) para rechazar o aceptar dichas ecuaciones de calibración.

Cada ecuación de calibración está protegida en el sistema NIRS, de modo que sólo pueden ser usadas en un instrumento. Así mismo, cada ecuación implica un coeficiente de lambda por cada punto a lo largo del espectro. Las ecuaciones que se desarrollaron para este trabajo hacen parte del nuevo conocimiento producido por el Programa de Nutrición y Fisiología Animal de CORPOICA y se desarrollaron para su uso en múltiples aplicaciones de investigación.

Es importante anotar que, para todos los análisis realizados por NIR, la exactitud de estas predicciones dependerá totalmente de la precisión con que se realicen, no sólo los análisis químicos, sino también los tratamientos matemáticos; esto implica un trabajo continuo, donde se debe incluir mayor cantidad de muestras para, así mismo, mejorar la exactitud del equipo.

BIBLIOGRAFÍA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995.** Official Methods of Analysis. Washington D.C. 15ª edición,
- Belitz, H.D. 1992.** Química de los alimentos. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Blanco, M. 1994.** Avances en quimiométrica práctica. Universidad de Santiago de Compostela. Servicios de Publicaciones e Intercambio Científico.
- Buxton, and Mertens. 1991.** Errors in Forage - Quality Data Predicted by NIR. Universidad Estatal de Iowa. Agronomy Hall 31: 212-218.
- Church, P. 1996.** Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. UTEMA: Noriega editores.

CORPOICA. 2000. Plan de Modernización Tecnológica de la Ganadería Bovina Colombiana. Fase I. Bogotá D.C.

FOSS NIRSYSTEMS 1999. Manual Software WINISI. Foss Nirsystems.

IICA Rispal. 1990. Nutrición de rumiantes: Guía metodológica de investigación. Alpa. San José, Costa Rica.

Loosli, J.K. 1969. El Nitrógeno No Proteico en la nutrición de los rumiantes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Mehrez, A.Z. and Orskov, E.R. 1977. The use of a dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. Journal of Agricultural Science 1977: 93.

Morcillo, Rubio. 1981. Espectroscopia Infrarroja. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

Norris, K.H.; Barnes, R.F.; Shenk, J.S. and Moore, J.E. 1976. Predicting forage quality by NIR. Animal Science 43: 889-897.

Owen B., Arthur. 1976. Acerca del Sistema de Carbohidratos y Proteína Neta de Cornell (CNCPS). Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Reeves III, JB. 2000. Use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Farm Animal Metabolism and Nutrition,.

Simón, I. 1968. Radiación Infrarroja. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional (A.I.D.).

Steel, R.G. and Torrie, J.H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. 2ª edición. Ed. McGraw - Hill Latinoamericana, Bogotá, Colombia.