

AVANCES EN LA UTILIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS. APLICACIONES EN PRODUCCIÓN ANIMAL

A. Garrido Varo, M.D. Pérez Marín, J.E. Guerrero Ginel y A. Gómez Cabrera
Departamento de Producción Animal
Universidad Politécnica de Córdoba

1.- INTRODUCCIÓN

Durante el XII Curso de Especialización FEDNA, realizamos una revisión del estado del conocimiento científico relativo a la tecnología NIRS y de sus aplicaciones en Alimentación y Producción Animal (Garrido et al. 1996). Concluíamos exponiendo lo que denominábamos “Servicio Integral en Alimentación Animal apoyado en la Tecnología NIRS”. Desde entonces, diferentes Universidades, Centros de I + D y, lo que es más relevante, numerosas empresas ligadas al sector agro-ganadero dentro y fuera de nuestro país, han continuado realizando esfuerzos de consolidación de esta tecnología, se definía entonces como un “potente multisensor para apoyar al control de calidad agroalimentario en general y al de la alimentación animal en particular”.

El presente artículo trata de mostrar algunos ejemplos que nos ayuden a entender los avances registrados en los últimos diez años, en la aplicación de la tecnología NIRS en el área de la Producción Animal, con particular énfasis en la industria de la alimentación animal. En la mayoría de los casos, y con en el ánimo de poder profundizar en algunos aspectos metodológicos de interés, mostraremos información generada en nuestro propio grupo de investigación, en colaboración con empresas del sector de la alimentación animal y/o con otros grupos de investigación nacionales e internacionales.

2.- AVANCES EN LA FORMA DE ANÁLISIS DE PRODUCTOS SÓLIDOS: ANÁLISIS DE PRODUCTO INTACTO

La teoría de la reflectancia difusa, sobre la que reposa el conocimiento científico de la tecnología NIRS, nos indica que, para el cumplimiento de la ley de Beer-Lambert, que en su forma mas simple establece que la concentración de un determinado absorbente

(analito) es directamente proporcional a la absorbancia, es absolutamente imprescindible el mantener un paso óptico constante, por diferentes razones, pero sobre todo para tratar de minimizar los fenómenos de radiación dispersa (“scatter”), fenómenos estos que en principio modifican el “paso óptico efectivo” (Birth and Hetch, 1987). Un requisito para el mantenimiento de dicho paso óptico constante es el del someter las muestras a una molienda fina y homogénea, de ahí que la bibliografía NIRS recoja numerosos trabajos que concluyen acerca de la idoneidad de utilizar molinos de tipo ciclónico y tamaños de partícula pequeños (1 mm) y, sobre todo, la recomendación de usar el mismo tamaño de molienda para el desarrollo de calibraciones y para el análisis NIRS de muestras futuras. La preocupación por el mantenimiento de un tamaño uniforme de partícula y por el desarrollo de algoritmos de minimización de las fuentes de error causadas por diferencias en el tamaño de las mismas, ha sido una constante en los trabajos NIRS realizados en la década de los 80 y de los 90. En el caso concreto de los piensos compuestos, un trabajo muy temprano (Abrams, 1989), resaltaba la importancia de la molienda muy fina, debido a la gran heterogeneidad de este producto, e incluso apuntaba la necesidad de la aplicación de algoritmos de regresión no lineales para la obtención de ecuaciones con una adecuada capacidad predictiva.

A finales de los 90 aparecen en el mercado instrumentos NIRS dotados de módulos de análisis y cápsulas que utilizan ventanas ópticas de gran superficie y que permiten el análisis de producto intacto (Wetzel, 2001). Además, algunos fabricantes diseñan modelos de instrumentación que son versiones simplificadas de los monocromadores de uso más generalizado a nivel de investigación y que solo están dotados de detectores de reflexión lo que, como veremos, ha afectado al problema que comentamos.

Como ha sido habitual en el desarrollo de la tecnología NIRS la aplicación, de nuevo, se adelantaba al conocimiento científico. Los suministradores de instrumentos comenzaron a ofertar a los fabricantes de piensos una versión más económica de la instrumentación, que admite diferentes opciones de modos de análisis (molido e intacto) y, asimismo, el uso de diferentes tipos de cápsulas, sin que existiera evidencia científica de las ventajas y desventajas de cada uno de estos medios de análisis y sí, serias dudas, sobre la repetibilidad y reproducibilidad del análisis NIRS de productos intactos analizados mediante reflectancia.

Sin embargo, nuestro conocimiento sobre estas mejoras en instrumentación y sobre la existencia de algoritmos de minimización del error en la medida espectroscópica, así como de corrección de los fenómenos de radiación dispersa, nos hacía ser optimistas en cuanto a las posibilidades del análisis de producto intacto en reflexión, y nos animaba a desarrollar trabajos de I + D en este sentido, convencidos de que, de existir alguna pérdida de capacidad predictiva de las ecuaciones desarrolladas en producto intacto, en relación a las desarrolladas en producto molido, las ventajas obtenidas con el análisis de producto intacto superarían con creces a las causadas por la pérdida en precisión y exactitud, al permitirnos o agilizar el análisis y la respuesta, y lo que como nutricionistas consideramos de mayor importancia, el aumentar la presión de muestreo. Así, Coleman (1999) indicaba que la prevención de problemas nutricionales debido a un desequilibrio en nutrientes,

requiere un muestreo y análisis frecuente de materias primas, piensos y mezclas. Para dicho autor, el método de análisis no es tan importante (una vez optimizado y validado) como el obtener una muestra representativa y el tener la posibilidad de analizarla rápidamente y de forma precisa.

Por todo de ello, desde 1998, y ante la ausencia de información científica que comparara ecuaciones desarrolladas en diferentes modos de análisis para idénticos colectivos, iniciamos diferentes proyectos de I + D en colaboración con distintas empresas de nuestro país, con el objetivo, entre otros, de evaluar la precisión y exactitud de ecuaciones desarrolladas para producto intacto o molido y diferentes modos de análisis. Particularmente, los resultados del Proyecto FEDER 1FD0990-1997 titulado (*“Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) como herramienta para la innovación tecnológica de los sistemas de control de calidad de alimentos y productos animales en el ámbito de la CAA”*), generaron este tipo de información para numerosas materias primas (trigo, cebada, maíz, harina de soja, soja full-fat, harina de girasol, palmiste, gluten feed, salvado, alfalfa, pulpa de remolacha, mandioca y harina de carne) y, asimismo, para piensos compuestos de diferentes especies (vacuno, porcino, aves ovino, caprino, conejos, perros, gatos...), estados fisiológicos y formas de presentación.

El cuadro 1 recoge los estadísticos de validación cruzada obtenidos para la predicción de proteína bruta en diferentes materias primas analizadas en forma molida e intacta. El cuadro 2 muestra los estadísticos de validación cruzada para el análisis de piensos compuestos, también analizados molidos y sin moler. Para el análisis de productos molidos se ha utilizado tanto una cápsula circular de 11,04 cm², que gira durante el análisis (G), como una cápsula rectangular (1/4) que posee una superficie de ventana de 26, 22 cm² y que se analiza en modo estático. En el caso del producto analizado sin moler, se han obtenido ecuaciones utilizando una cápsula denominada “coarse” o de “productos groseros” (C), con superficie de ventana de 54,12 cm², y en algunos casos, se ha utilizado también una cápsula de “productos naturales” (N), que posee una superficie de ventana de 94 cm².

Los resultados mostrados en los cuadros 1 y 2 sugieren múltiples comentarios, pero nos alejarían de nuestro objetivo de mostrar la posibilidad de realización del análisis NIRS de productos intactos. Por ello, solo resaltaremos como las calibraciones obtenidas tanto en forma molida como en forma intacta, muestran una capacidad predictiva similar, estimada por los estadísticos ETVC, r^2 , RPD, RER y CV.

Cuadro 1.- Estadísticos de calibración para la predicción de proteína bruta, en diferentes materias primas, analizadas en forma intacta y molida.

Materia Prima	Presentación	Media	Rango	DT	ETVC	r²	RPD	RER	CV
Cebada N = 200	Molida Giro	10,94	8,3-14,1	0,93	0,23	0,94	4,04	25,22	2,10
	Molida 1/4	10,41	8,9-13	0,97	0,31	0,90	3,13	13,23	2,98
	Intacta (C)	10,87	8,4-12,4	0,77	0,26	0,89	2,96	15,38	2,39
Trigo N = 200	Molida Giro	11,42	9,4-13,71	0,72	0,22	0,90	3,27	19,59	1,93
	Molida 1/4	11,02	9,3-12,2	0,62	0,22	0,88	2,82	13,18	2,00
	Intacta (C)	11,28	9,3-12,5	0,63	0,28	0,80	2,25	11,43	2,48
Maíz N = 100	Molida Giro	7,37	6,1-9,2	0,59	0,35	0,66	1,69	8,86	4,75
	Molida 1/4	7,33	6,1-8,6	0,57	0,32	0,68	1,78	7,81	4,37
	Intacta (C)	7,37	6,3-9,2	0,57	0,37	0,59	1,55	7,85	5,01
H. Soja N = 380	Molida Giro	45,15	41,6-49,3	1,14	0,62	0,70	1,84	12,46	1,37
	Molida 1/4	45,45	42,6-47,4	0,96	0,60	0,62	1,61	8,04	1,31
	Intacta (C)	45,16	43-47,6	0,97	0,64	0,56	1,51	7,20	1,42
Soja Full-Fat N = 70	Molida Giro	36,57	34,2-39,2	1,11	0,74	0,58	1,50	6,76	2,02
	Molida 1/4	36,56	34,4-39,2	1,07	0,66	0,63	1,62	7,27	1,81
	Intacta (C)	36,63	34,4-39,2	1,06	0,66	0,56	1,60	7,23	1,81
Soja (A+B) N = 160	Molida Giro	40,73	34,2-46,6	3,47	0,69	0,96	5,03	17,97	1,69
	Molida 1/4	40,76	34,4-45,0	3,37	0,70	0,96	4,81	15,14	1,72
	Intacta (C)	40,83	34,4-45,0	3,32	0,63	0,96	5,27	16,83	1,54
Alfalfa N = 80	Molida Giro	15,13	8,8-17,9	2,04	0,64	0,91	3,19	14,22	4,23
	Molida 1/4	15,08	8,8-17,9	2,10	0,66	0,90	3,18	13,79	4,38
	Intacta (C)	15,03	8,8-18	2,11	0,67	0,90	3,17	13,79	4,44
Salvado N = 95	Molida Giro	15,09	12,1-16,6	1,00	0,29	0,92	3,45	15,52	1,92
	Molida 1/4	15,11	12,1-17,2	1,01	0,38	0,86	2,66	13,42	2,51
	Intacta (C)	15,1	12,1-17,2	0,99	0,46	0,79	2,15	11,06	3,05
	Intacta (N)	15,06	12,1-17,2	1,01	0,43	0,82	2,35	11,79	2,87
Gluten Feed N = 90	Molida Giro	19,47	18,0-21,1	0,70	0,35	0,74	2,00	8,86	1,80
	Molida 1/4	19,44	18,0-21,1	0,69	0,41	0,67	1,68	7,56	2,11
	Intacta (C)	19,47	17,8-21,1	0,70	0,27	0,85	2,56	12,01	1,41
	Intacta (N)	19,43	18,0-21,1	0,69	0,36	0,72	1,92	8,56	1,86
Palmiste N = 50	Molida Giro	16,44	15,0-18,8	0,98	0,37	0,86	2,65	10,27	2,25
	Molida 1/4	16,41	15,0-18,8	0,99	0,41	0,83	2,41	9,27	2,50
	Intacta (C)	16,41	14,5-18,4	0,93	0,42	0,81	2,23	9,36	2,54
Pulpa de Remolacha N = 50	Molida Giro	8,86	7,2-11,2	0,99	0,42	0,82	2,36	9,52	4,74
	Molida 1/4	8,86	7,2-11,2	0,99	0,42	0,82	2,36	9,52	4,74
	Intacta (C)	8,85	7,2-11,2	1,00	0,36	0,89	2,77	11,02	4,10

DT = Desviación Típica; ETVC = Error Típico de Validación Cruzada; r² = Coeficiente de determinación para la Validación Cruzada; RPD: DT/ETVC; RER = Rango/ETVC; CV= Coeficiente de Variación.

Cuadro 2.- Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de la composición química en piensos analizados en forma molida e intacta (N = 413).

Parámetro	Modo Análisis	Media	Rango	DT	ETVC	r ²	RPD	RER
Humedad	Molido Giro	10,28	6,00-12,80	1,35	0,57	0,82	2,38	11,97
	Molido(1/4)	10,23	6,00-12,80	1,35	0,53	0,84	2,54	12,80
	Intacto(C)	10,30	6,00-12,90	1,39	0,49	0,87	2,82	14,02
Proteína	Molido Giro	18,19	12,20-33,30	3,46	0,51	0,98	6,80	41,47
	Molido(1/4)	18,21	12,20-33,30	3,42	0,50	0,98	6,90	42,53
	Intacto(C)	18,22	12,20-33,30	3,47	0,52	0,98	6,65	40,46
Grasa	Molido Giro	5,14	1,60-14,90	2,32	0,54	0,95	4,26	24,44
	Molido(1/4)	5,17	1,60-14,00	2,29	0,55	0,94	4,17	22,64
	Intacto(C)	5,19	2,00-14,90	2,41	0,55	0,95	4,39	23,49
Fibra	Molido Giro	6,65	2,20-18,60	3,66	0,56	0,98	6,57	29,45
	Molido(1/4)	6,66	2,30-18,60	3,71	0,46	0,98	8,06	35,46
	Intacto(C)	6,70	1,70-18,60	3,79	0,54	0,98	7,03	31,35
Cenizas	Molido Giro	8,06	3,90-14,80	1,89	0,61	0,90	3,09	17,83
	Molido(1/4)	8,15	3,90-14,90	1,99	0,63	0,90	3,15	15,80
	Intacto(C)	8,10	3,90-15,30	1,92	0,75	0,85	2,55	15,16

DT = Desviación Típica; ETVC = Error Típico de Validación Cruzada; r² = Coeficiente de Determinación para la Validación Cruzada; RPD: DT/ETVC; RER = Rango/ETVC; CV= Coeficiente de Variación.

Los resultados del cuadro 2 confirman la viabilidad del análisis de piensos en forma intacta, ya que los ETVC, RPD, RER y CV obtenidos para los 5 parámetros estudiados, son similares a los mostrados en producto molido. Las ligeras diferencias que pueden observarse en algunos casos entre los estadísticos obtenidos para calibraciones de producto molido e intacto, reflejadas en los cuadros 1 y 2, no deberían ser atribuibles en ningún caso al modo de análisis, si no mas bien al hecho de que, al no tratarse de ecuaciones que pudiéramos denominar robustas, cada uno de los modelos puede mostrar una sensibilidad diferente ante uno o varios datos espectroscópicos o químicos anómalos. De hecho y como indican Naes et al (2001), es necesario entender que los modelos de regresión NIRS son dependientes del colectivo de datos espectroscópicos utilizados y esto se agrava especialmente cuando los colectivos de calibración contienen un número reducido de muestras de características extremas. Como se observa en el cuadro 1, los valores máximos y mínimos del rango proteína bruta no permanecen idénticos para un mismo producto la forma intacta, las muestras con valores superiores a 12,4 de proteína bruta fueron catalogadas como anómalas, lo que no ocurrió en el módulo de giro o solo parcialmente en la cápsula de ¼.

En el cuadro 3 se recogen estadísticos de calibración obtenidos para el mismo producto (trigo) analizado en instrumentos similares, si bien utilizando muestras procedentes de diferentes laboratorios de referencia y con una cobertura del rango

diferente. En ella se nos muestra que, mientras los laboratorios 1 y 2 obtienen unos valores del ETVC para las calibraciones de trigo intacto, que son inferiores a los obtenidos por el laboratorio 5, en ecuaciones desarrolladas para producto molido, en los laboratorios 3 y 4 se alcanzan valores del ETVC de una magnitud muy superior al de los laboratorios 1 y 2. Este ejemplo nos ayuda a confirmar que mas importante que el modo de análisis NIRS es el error derivado del método analítico de referencia y de las las características de cobertura del rango del colectivo de calibración, que puedan haber existido en cada caso.

Cuadro 3.- Comparación de la capacidad predictiva de ecuaciones NIRS para el análisis de la proteína bruta de trigo.

Laboratorio	Modo Análisis	Rango	ETVC	r ²
Laboratorio 1	Intacto	9,3-12,5	0,28	0,80
Laboratorio 2	Intacto	9,3-14,1	0,28	0,92
Laboratorio 3	Intacto	8,0-15,9	0,53	0,90
Laboratorio 4	Intacto	8,0-15,6	0,47	0,87
Laboratorio 5	Molido (G)	8,0-15,5	0,28	0,93
	Molido(1/4)	8,0-16,1	0,33	0,92

Brimmer y Hall (2001) indican que la mayor dificultad para medir el espectro de copos o pellets, es la derivada de la no uniformidad de la muestra, en relación a los productos pulverulentos. Esta no homogeneidad de dichas formas físicas de presentación de muestra produce grandes variaciones en la línea base. Los autores recomiendan, como una de las aproximaciones para la mejora de la reproducibilidad de productos pelletizados el recoger el espectro NIRS de dichos productos usando una gran superficie de análisis (60 cm² o mas).

Las calibraciones mostradas en el cuadro 2, fueron obtenidas utilizando piensos muy diferentes, tanto por la especie animal (vacuno, ovino, caprino, aves, cerdos, perros, conejos) como por la forma de presentación (gránulos y pellets de diferente tamaño, piensos en harina, y piensos extrusionados). El cuadro 4 muestra los estadísticos de calibración para ecuaciones de predicción de proteína bruta y grasa bruta de cinco piensos utilizados para cinco especies animales diferentes. Como se observa en dicha tabla, cuando el colectivo de muestras es suficientemente elevado y las características de las muestras permiten cubrir de forma homogénea la variabilidad de piensos de cada especie, es posible obtener una mejora de la capacidad predictiva en comparación con la observada cuando se utiliza una ecuación de calibración única para todas las especies. En cualquier caso, nuestro objetivo de mostrar la posibilidad del análisis de piensos intactos, queda puesto de manifiesto, tanto para el caso de utilizar un colectivo único (cuadro 2), como en el caso de utilizar colectivos diferentes para cada especie (cuadro 4).

Cuadro 4.- Estadísticos de calibración NIRS de ecuaciones de pienso (intacto), para diferentes especies animales (Maasweide Laboratory Services, com pers.)

Especie	Parámetro	nº muestras	Rango	ETVC	r²
Vacuno	Proteína	3008	10,75-45,80	0,56	0,99
	Grasa	2124	1,6-8,2	0,28	0,90
Porcino	Proteína	2736	4,90-37,05	0,59	0,99
	Grasa	2147	1,4-14,1	0,44	0,94
Ponedoras	Proteína	445	14,1-21,5	0,72	0,96
	Grasa	258	2,4-11,8	0,41	0,96
Broilers	Proteína	1195	15,7-33,3	0,52	0,94
	Grasa	1391	2,6-15,3	0,43	0,97
Caballos	Proteína	143	9,0-15,8	0,28	0,98
	Grasa	117	1,97-8,05	0,29	0,94

El análisis de producto intacto no solo ha resultado útil par la predicción de los parámetros analíticos del Sistema Weende de un producto sino, asimismo, para la predicción de su valor nutritivo. Hemos seleccionado un ejemplo, entre otros posibles, que nos ayuda a reflexionar sobre un aspecto conceptual de importancia para la aplicación al máximo potencial de la tecnología NIRS en el sector de la alimentación animal, como es el desarrollo de ecuaciones de calibración para la predicción del valor nutritivo (digestibilidad, valor energético, ingestión, etc). Para ello es preciso la colaboración de diferentes grupos que aporten datos de evaluación “in vivo” de cada producto en número suficientemente elevado, como para que dichas ecuaciones puedan ser lo suficientemente robustas, para permitir su uso generalizado en la industria de la alimentación animal. Sin embargo, paralelamente, dicho desarrollo necesita también de un trabajo de investigación básico NIRS, de forma tal, que en un futuro cercano, pudiéramos obviar la dependencia que la tecnología NIRS tiene de la existencia de un elevado número de muestras.

Un ejemplo de los esfuerzos realizados en este sentido lo tenemos en el trabajo realizado por Van Barneveld et al (1999), quienes mostraban como el uso del algoritmo denominado “variables indicadoras” permite aprovechar el potencial de varios centros de investigación, para aunar resultados de ensayos “in vivo” de determinación de la Energía Digestible de granos de cereales. Como se deduce claramente de los datos expuestos en el cuadro 5, el uso de “variables indicadoras” para corregir las diferencias existentes, entre los laboratorios que aportan los datos in vivo, produce una marcada reducción en el valor del ETVC, tanto en el caso de ecuaciones desarrolladas para granos molidos, como en enteros. En el caso del producto intacto, cuando se utiliza el algoritmo “variables indicadoras”, el ETVC obtenido 0,38 (Mj/kg) es ligeramente superior al de la estima “in vivo” de la Energía Digestible (ETL = 0,24 Mj/kg) derivada de la variabilidad entre las réplicas de animales.

Cuadro 5.- Estadísticos de calibración para la predicción de la energía digestible en cerdos (ED) de granos de cereal enteros y molidos (Van Barneveld et al., 1999).

Muestra	r ²	ETVC (Mj/kg)
Entero	0,76	0,52
Entero (V.I.)	0,87	0,38
Molida	0,72	0,60
Molida (V.I.)	0,86	0,43

V.I. = Variables indicadoras

La información acumulada en la década de los 90 ha permitido mostrar la posibilidad del uso en otros instrumentos de ecuaciones desarrolladas para producto molido en un determinado equipo, siempre y cuando se utilice un algoritmo adecuado y se sigan protocolos de clonación adecuadamente validados. El procedimiento desarrollado por Shenk y colaboradores (Sheik, 1990, Sheik y Westerhaus 1995), fue puesto a punto para el rango de absorbancias que cubren los productos bajos en humedad y molidos, esto es 0,05 a 0,70 log 1/R. Era necesario por tanto el desarrollar procedimientos de clonación para productos cuyos valores de absorbancia no estuvieran comprendidos en dicho rango. Tal es el caso de los forrajes frescos, las materias primas, los piensos analizados en forma intacta, y los productos líquidos o semilíquidos como las grasas, leche, etc (Garrido et al, 1999).

El cuadro 6 muestra que es posible transferir calibraciones desarrolladas en ensilados analizados en fresco, utilizando como muestras de referencia muestras de ensilado frescas. La transferencia es posible, incluso entre instrumentos de fabricantes diferentes. La metodología puesta a punto por Park et al. (1999), en el sentido de usar para la transferencia muestras similares a las obtenidas para la obtención de calibraciones, ha sido evaluada también en diferentes granos y piensos en el marco de un proyecto de I + D, entre nuestro grupo de investigación y las empresas NUTEGA y GEPISA, Asimismo, Martínez et al (2003) durante el Congreso NIR-2003 celebrado en Córdoba, mostraban los resultados de la transferencia de calibraciones de ensilado de maíz fresco, desde el equipo FOSS-NIRsystems 6500 del SERIDA de Villaviciosa al equipo FOSS-NIRSystems 5000, de la empresa NUTEGA.

Sin embargo, es aún necesario desarrollar trabajos básicos de investigación para optimizar el proceso de transferencia de espectros de muestras analizadas en forma intacta. Por una parte evaluando nuevos algoritmos de estandarización que se han ido desarrollando en los últimos años y/o evaluando nuevos algoritmos de regresión diseñados para eliminar o minimizar la influencia de diferentes fuentes de variación (ej. instrumentales). En el momento actual, se encuentran en evaluación, diferentes estrategias de transferencia de ecuaciones para la predicción de ingredientes en piensos compuestos analizados en forma intacta (Pérez Marín et al., 2003, d.n.p). Se trata no solo de facilitar el proceso de transferencia, si no asimismo de utilizar un procedimiento que sea generalizable a la transferencia de ecuaciones desarrolladas en el mayor número de productos y atributos a predecir, a nivel de fábricas de piensos.

Cuadro 6.- Valores medios predichos NIRS (master vs satélite) para 33 muestras de ensilado fresco antes y después de la clonación (Park et al., 1999).

Variable	Master FNS-6500	Satélite antes B&L IA 500	Satélite después B&L IA 500
MS (gr/kg)	240,06	218,15	236,97
ph	4,19	3,95	4,26
N ₂ (gr/ kg)	4,95	7,48	4,91
NDF (gr/ kg)	130,20	80,51	128,24
ADF (gr/ kg)	82,08	34,44	80,11
MODMS (gr/ kg)	658,50	794,50	656,10
Ing (gr/ kg ¹ P ^{0,75})	77,51	94,55	76,45

3.- AVANCES EN EL TIPO DE PRODUCTOS A ANALIZAR: ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÍQUIDOS Y SEMILÍQUIDOS

Diferentes ingredientes líquidos, tales como las grasas y las melazas, se utilizan en la actualidad en una proporción considerable en la fabricación de piensos, fundamentalmente como fuentes energéticas, pero asimismo por aportar otras características de interés tecnológico y nutritivo. Ambos productos poseen numerosos aspectos en común no solo desde el punto de vista de su utilización en piensos, si no también en la necesidad de su control analítico. El hecho de que dichos ingredientes simples procedan de la transformación agro-industrial de un producto principal puede hacer que su composición sea muy variable. Los cuadros 7 y 8 confirman la importante variabilidad de ambos ingredientes, en condiciones reales.

Dicha variabilidad provoca la necesidad de realizar un control analítico que es recomendable que incluya al menos las determinaciones de humedad y azúcares en el caso de las melazas, y las determinaciones de MIU, acidez oleica, ácidos grasos libres y ácidos grasos saturados e insaturados en el caso de las grasas (Boucqué y Fines, 1988; Edmunds, 1990; Mateos et al., 1996, Alvarez, et al., 2000, 2002). Asimismo, su naturaleza líquida hace que tengan una mayor dificultad desde el punto de vista analítico, tanto por el propio manejo a nivel de laboratorio, como por requerir de análisis mas sofisticados, lentos y costosos que los tradicionalmente utilizados en el análisis de ingredientes sólidos (Garrido et al., 2003). Ello hace que el control de calidad de estas interesantes materias primas sea, en muchos casos, reducido y/o que no se determinen parámetros analíticos de interés nutricional (ej. ácidos grasos).

Cuadro 7.- Caracterización química de melazas y estadísticos de calibración

	Media	Rango	DT	ETVC	r ²	RPD	RER
Humedad ⁽¹⁾	23,06	19,3-28,6	2,10	1,69	0,42	1,2	5,5
Humedad ⁽²⁾	22,40	18,5-28,1	1,81	0,34	0,96	5,3	28,23
Proteína	8,37	3,9-10,3	2,64	0,14	0,99	19,1	45,7
Cenizas	10,61	8,0-13,8	1,47	0,60	0,84	2,5	9,7
CINa	2,17	1,16-4,03	1,11	0,05	0,99	20,9	57,4
Azúcares T.	48,48	43,9-53,9	2,83	1,04	0,86	2,7	10,0

(1) Método Referencia: Balanza Infrarrojo; (2) Método Referencia: estufa (arena de mar)

Cuadro 8.- Caracterización química de grasas animales y estadísticos de calibración NIRS

	Media	Rango	DT	ETVC	r ²	RPD	RER
Humedad	0,44	0,07-2,10	0,42	0,14	0,88	2,9	14,0
Acidez (% oleico)	7,22	0,65-11,40	1,90	0,83	0,82	2,3	13,0
RIE	0,32	0,01-0,69	0,16	0,13	0,31	1,2	5,1
Insaponificable	1,45	0,18-5,80	1,23	0,45	0,87	2,7	12,5
MIU*	2,26	1,04-7,59	1,60	0,38	0,94	4,21	17,33
Laúrico	0,11	0,06-0,13	0,02	0,009	0,67	1,7	7,8
Mirístico	1,95	0,11-3,01	0,75	0,13	0,97	5,7	22,1
Palmítico	21,72	7,16-25,89	5,47	0,76	0,98	7,1	24,5
Palmitoleico	2,27	0,09-3,34	0,86	0,33	0,86	2,6	10,0
Esteárico	13,65	4,05-20,38	4,60	0,74	0,98	6,2	22,2
Oleico	37,73	24,59-45,55	3,43	0,97	0,92	3,5	21,7
Linoleico	13,55	3,82-55,95	14,56	0,65	0,99	22,5	80,4
Margárico	0,67	0,05-1,13	0,28	0,06	0,96	4,8	18,6
Margaroleico	0,42	0,19-0,58	0,08	0,039	0,77	2,1	10,0
Araquídico	0,19	0,14-0,43	0,07	0,024	0,86	2,7	12,1
Behénico	0,21	0,01-0,72	0,21	0,035	0,97	6,1	20,3

*MIU: humedad+ impurezas + insaponificable

En lo que respecta al análisis NIRS, ambos ingredientes presentan una problemática muy similar. El análisis espectroscópico tradicional de líquidos y semilíquidos se realiza utilizando cubetas de transmisión. En el caso de la espectroscopía NIRS, dicho modo de análisis representa una importante dificultad para el proceso de llenado y limpieza, debido a lo reducido del paso óptico a utilizar a fin de mantener la linealidad entre absorbancia y la concentración (Shenk et al., 1995). Otro aspecto que dificulta el análisis de líquidos y semilíquidos es la influencia que la temperatura tiene en la señal espectroscópica (Williams, 2001). Ello es especialmente importante en el caso de grasas, ya que el estado físico de las mismas depende de su punto de fusión, o en definitiva, de su composición en ácidos grasos.

Estos y otros factores nos llevaron en su día al inicio de trabajos de profundización en la optimización del análisis NIRS de grasas y aceites utilizando entre otros el modo de

análisis conocido como de Doble Transmisión. La experiencia adquirida en nuestro trabajo de investigación de grasa de cerdo ibérico y aceite de oliva (Garrido et al., 2000) nos permitió posteriormente abordar en el marco del Proyecto FEDER anteriormente mencionado, una colaboración con la empresa SAPROGAL (Garrido et al., 2001), para la realización de sendos estudios de viabilidad que nos permitieran: a) evaluar la capacidad predictiva de las ecuaciones desarrolladas para la predicción de los parámetros analíticos de mayor interés nutricional y / o de mayor uso en las transacciones comerciales de ambos ingredientes líquidos b) detectar las fuentes de error que afectan al análisis NIRS de grasa y melazas y c) estudiar estrategias de eliminación y o minimización de dichas fuentes de error.

Con respecto a las melazas (cuadro 7) las calibraciones obtenidas para la predicción de proteína bruta (ETVC=0,14%; $r^2=0,99$) y CINa (ETVC=0,05%; $r^2=0,99$) presentan una excelente precisión y exactitud. Para la determinación de azúcares y cenizas, los modelos obtenidos explican respectivamente el 86% y el 84% de la variabilidad existente dentro del colectivo muestral empleado, si bien en ambos casos el ratio RPD no alcanza el valor de 3 recomendable por Williams y Sobering (1996) para el análisis de rutina, por lo que es de esperar que los estadísticos mejoren al aumentar el número de muestras. En cualquier caso, dicha ecuación presenta una posibilidad real de analizar de forma rápida y precisa los azúcares totales, de gran interés para la caracterización de las melazas, parámetro que presenta elevados errores interlaboratorio (Gillespie, 2000).

La ecuación NIRS desarrollada para la determinación de humedad presenta una baja capacidad predictiva (ETVC=1,69%, $r^2=0,42$). Esto podría ser debido a que el método de referencia utilizado para obtención de la humedad (balanza de infrarrojo), es un método indirecto que conlleva a su vez una calibración previa no libre de errores. De hecho, cuando la humedad se determina mediante desecación en estufa usando arena de mar, la calibración presenta una alta precisión y exactitud

El cuadro 8 recoge los estadísticos de caracterización química y los de calibración NIRS para las grasas estudiadas. Un comentario inicial sería el observar que la tecnología NIRS es capaz de estimar simultáneamente un importante número de parámetros de calidad en grasas utilizadas en alimentación animal. De todos los parámetros analíticos estudiados, únicamente el residuo insoluble en éter (RIE) presenta una baja correlación ($r^2=0,31$) con los datos espectroscópicos. Ello no es de extrañar si se tiene en cuenta que el RIE no es una entidad química definida (Bisplinghoff, 1993) y presenta un alto nivel de error intra e interlaboratorio (algo similar ocurre con el Índice de Peróxidos, cuyos resultados no se muestran en el cuadro). En la práctica del control y comercio de grasas se utiliza el parámetro denominado MIU, que engloba los valores del RIE junto con la humedad e impurezas (Mateos et al., 1996). Como se observa en la Tabla 8, la ecuación para la predicción de MIU presenta una excelente precisión y exactitud (ETVC=0,38%, $r^2=0,94$). Asimismo, la ecuación NIRS obtenida para la predicción de humedad asegura un control analítico preciso de este parámetro (ETVC=0,14%, $r^2=0,88$), lo que es importante debido a que la misma acelera las reacciones de oxidación.

Un método poco utilizado en los controles de grasas para la alimentación animal es el del oxígeno activo (AOCS Method Cd 12-57) o su versión automática (RANCIMAT), que informa sobre la estabilidad en horas de una grasa o aceite. Una ecuación NIRS desarrollada por Garrido et al (2000) para la predicción de la Estabilidad Oxidativa en aceite de oliva, usando como referencia el método automatizado RANCIMAT, presentaba una elevada capacidad predictiva ($r^2 = 0.95$, ETVC = 9.10 y RPD = 10.8). La predicción de la estabilidad oxidativa utilizando una ecuación NIRS como la indicada, proporcionaría una información mas precisa y fiable sobre el estatus y potencial oxidativo de una grasa animal, que métodos mas usuales y menos precisos como el Índice de Peróxidos (Garrido et al., 2003).

De todos los criterios útiles para la valoración energética y nutricional de la grasas, el conocimiento preciso del porcentaje de ácidos grasos y/o de la relación saturados/insaturados juega un papel importante (Bisplinghoff, 1993, Mateos et al., 1996, Garrido et al., 2003). En la práctica, el elevado coste del análisis de ácidos grasos provoca el que se recurra a la determinación del índice de yodo como dato informativo del grado de insaturación de una grasa.

Nuestros resultados (cuadro 8) indican que la tecnología NIRS tiene una precisión y exactitud elevada para la predicción de los ácidos grasos mayoritarios, tales como el palmítico, esteárico, oleico y linoléico, aunque algo inferior a la alcanzada anteriormente en nuestros trabajos de grasa fundida de cerdo ibérico utilizando un modo de análisis similar (García et al., 2001 y Pérez et al., 2001). El mayor grado de impurezas presentes en las grasas animales y su mayor diversidad, junto con el reducido número de muestras que aún presentan estas calibraciones, permitirían explicar las diferencias en precisión y exactitud. Por otra parte, observamos también que la tecnología NIRS permite predecir con una excelente o aceptable predicción otros ácidos grasos minoritarios. Con respecto al análisis NIRS en rutina de los ingredientes líquidos y semilíquidos, mediante doble transmisión, se ha detectado la influencia, de la existencia de factores de variación incontrolados, que producen predicciones erróneas no esperadas. Nuestra experiencia adquirida en el análisis de grasas de cerdo ibérico, nos permite concluir, que el análisis de productos líquidos o semilíquidos utilizando doble transmisión, precisa de elementos metodológicos vitales para el desarrollo de ecuaciones de calibración robustas, insensibles a las fuentes de variación conocidas y desconocidas. En concreto, es esencial que el uso de lo que se denominan “ficheros de repetibilidad”, utilizados durante el desarrollo de calibraciones, para posibilitar el uso en rutina de ecuaciones de grasa y asimismo para la transferencia de las mismas (Pérez et al., 2002).

El cuadro 9 muestra los efectos del fichero de repetibilidad sobre la predicción del ácido palmítico. En ella se observa que, cuando no se usa fichero de repetibilidad, la predicción resulta inviable; sin embargo, cuando se utiliza fichero de repetibilidad los sesgos se reducen de forma importante. El ensayo pone de manifiesto asimismo la existencia de una cápsula defectuosa (la nº 4), lo que es de gran importancia para reducir algunos de los factores de variación incontrolados a los que hacíamos referencia, así como para el control de este tipo de accesorios que tienen un alto coste de adquisición.

Cuadro 9.- Efecto del uso de un fichero de repetibilidad sobre los valores predichos NIRS de ácido palmítico (C16:0) correspondiente a dos muestras de grasa analizadas en cinco cápsulas diferentes de doble transmisión, de 0,1 mm de paso óptico (Garrido et al., 2001).

Cápsula	C16:0, (%)				
	LAB (CG)	NIR sin fichero de repetibilidad	(Lab-NIR) sin fichero de repetibilidad	NIR con fichero de repetibilidad	(Lab-NIR) con fichero de repetibilidad
C-1	22,6	24,5	-1,9	22,7	-0,1
C-2	22,6	24,9	-2,3	22,8	-0,2
C-3	22,6	23,8	-1,2	22,3	0,3
C-4	22,6	33,0	-10,4	25,2	-2,6
C-5	22,6	25,0	-2,4	22,6	0,0
C-1	24,3	26,3	-2,0	24,0	0,3
C-2	24,3	25,9	-1,6	23,9	0,4
C-3	24,3	24,2	0,2	23,5	0,8
C-4	24,3	33,3	-9,0	26,2	-1,9
C-5	24,3	25,1	-0,8	24,0	0,3

En la revisión sobre las aplicaciones de la tecnología NIRS al control de calidad de grasa y aceites, Garrido et al. (2003) concluyen, que la Espectroscopía NIR ha mostrado su potencial para reemplazar a los métodos tradicionales para el análisis del perfil completo de ácidos grasos y de más de otros veinte parámetros físico-químico y sensoriales. Asimismo, indican que, en gran parte, los esfuerzos de muchos investigadores, a nivel mundial, se han visto frustrados por problemas inaceptables de rutina relacionados con el instrumento y o las cápsulas, y que es necesaria la realización de trabajos de I + D, orientados a disminuir la sensibilidad de las ecuaciones de grasas, a estas fuentes de error no controladas.

4.- LA TECNOLOGÍA NIRS Y EL CUMPLIMIENTO DE NORMATIVAS RELATIVAS A LA TRAZABILIDAD Y A LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

El conocimiento del espectro y de sus propiedades, junto con el avance en los algoritmos de tratamiento multivariante de datos espectrales, hacen posible la aplicación de la tecnología NIRS para un aspecto de gran importancia en el comercio e industria de la alimentación animal, como es el de la declaración de ingredientes en mezclas y piensos y la detección de mezclas fraudulentas. Sin embargo, el abordar de forma completa el desarrollo de una metodología NIRS para la identificación y cuantificación de ingredientes en mezclas es un problema complejo, que exige un diseño experimental cuidadoso para la creación de librerías espectrales de muestras “auténticas”, lo que sin duda alguna requiere una colaboración de la industria y/ o, asimismo, de las autoridades responsables de las inspecciones oficiales (Garrido, et al., 1996).

Conscientes de lo anterior, desde 1998 y en el marco de diferentes proyectos de investigación, el Departamento de Producción Animal, de la ETSIAM de la Universidad de Córdoba, viene colaborando con diferentes empresas nacionales e internacionales del sector de la Alimentación Animal, para mostrar las posibilidades de la tecnología NIRS para dar respuestas a normativas presentes y futuras relativas a la declaración de ingredientes en pienso y/o mezclas. El objetivo era el de realizar una investigación de tipo pre-normativo, que nos permitiera poder apoyar o rechazar científicamente, normativas relativas a trazabilidad de alimentos animales.

De hecho, cuando en el año 2000 se hace pública la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo 2000/0015 (COD) que indicaba la obligatoriedad de declaración del porcentaje de ingredientes de piensos, en orden decreciente de su inclusión en los mismos, y asimismo en Diciembre del 2000 se publica la Decisión del Consejo 2000/766/EC, que prohíbe el uso de harinas de carne y hueso en la alimentación de todos los animales destinados a producción, ya se encontraba en marcha el proyecto FEDER que hemos mencionado anteriormente, el cual contemplaba entre sus objetivos, el mostrar las posibilidades de la tecnología NIRS para la declaración de ingredientes en piensos. Se disponía entonces de una biblioteca de datos espectrales de piensos analizados intactos, para los cuales se conocía el porcentaje de ingredientes en cada una de las fórmulas de dichos piensos. Por ello y aún a pesar de ser conscientes de que un trabajo de obtención de modelos predictivos robustos para cada ingrediente, en una matriz tan compleja como son los piensos, precisaba ser abordado con librerías espectrales de miles de muestras, en principio realizamos un estudio de viabilidad, utilizando un total de 287 piensos analizados en forma intacta. Los resultados de dicho estudio se resumen en el cuadro 10.

Un análisis sintético de los datos del cuadro 10 nos permite resaltar la excelente capacidad predictiva ($r^2 \geq 0,9$; $RPD \geq 3$) de las calibraciones obtenidas para la determinación del porcentaje de alfalfa, girasol, gluten, remolacha, palmiste, harina de ave, harina de carne total (%harina de carne + %harina de ave) y suero. Otras ecuaciones que presentan una buena capacidad predictiva ($r^2 \geq 0,7$) son las desarrolladas para soja, maíz, melaza, grasa y altramuza. Las calibraciones obtenidas para determinar el porcentaje de cebada, mandioca, salvado, arroz, harina de carne y hueso, harina de pescado, carbonato cálcico, cloruro amónico y sal muestran una aceptable capacidad predictiva ($0,5 \leq r^2 \leq 0,7$). Finalmente, la calibración de trigo permitiría al menos clasificar las muestras en bajo, alto y medio contenido en dicho ingrediente.

Los resultados obtenidos en este estudio de viabilidad nos mostraban que el análisis NIRS del porcentaje de ingredientes era posible y que este análisis podía realizarse en muestras intactas, si bien nos informaba de la necesidad de continuar los trabajos de I + D que nos permitieran mejorar la capacidad predictiva de nuestros modelos. En el presente curso FEDNA, se presenta un trabajo (Pérez Marín, d.n.p) que muestra la significativa mejora alcanzada en la capacidad predictiva de las ecuaciones para la predicción del porcentaje de ingredientes en piensos, cuando se utiliza la denominada “regresión local”,

basada en el concepto de predicción individual de muestras, a partir de espectros específicos de bibliotecas espectrales de gran tamaño.

Cuadro 10.- Estadísticos de calibración para la predicción del porcentaje de ingredientes en piensos (N = 287) (Garrido et al., 2001).

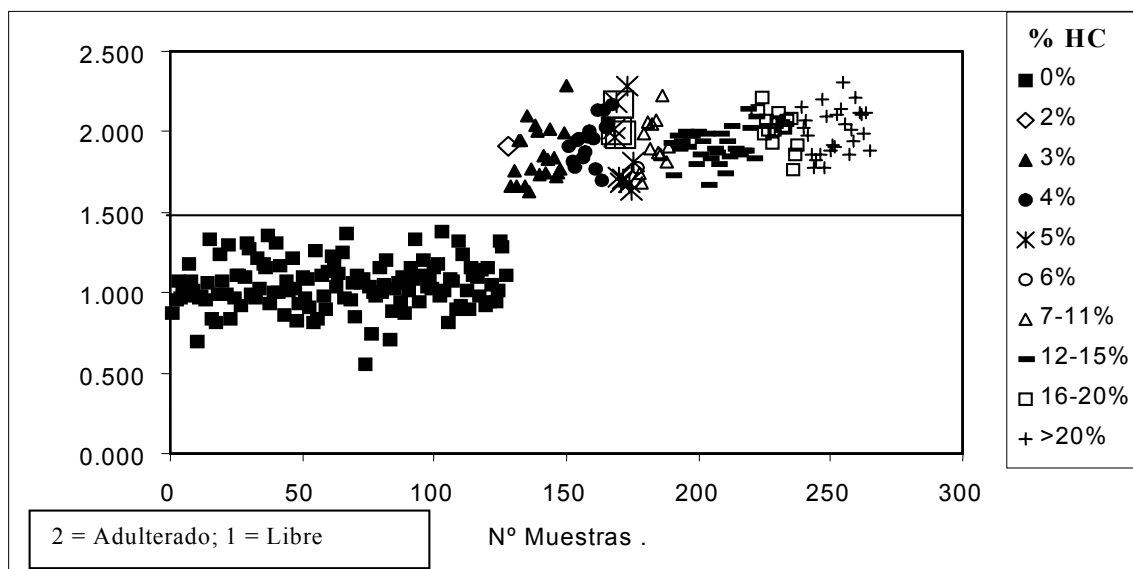
Ingrediente	ETVC	R²	RPD	Ingrediente	ETVC	r²	RPD
% Trigo	8,20	0,43	1,32	%Palmiste	0,75	0,95	4,41
%Cebada	8,93	0,57	1,52	%H. Carne	1,65	0,61	1,59
%Cb+Tri	8,36	0,81	2,28	%H. Ave	1,82	0,89	2,99
%Soja44	4,08	0,83	2,43	%Total Carne	0,88	0,98	8,16
%Maíz	5,37	0,87	2,76	%Melaza	1,17	0,76	2,06
%Alfalfa	1,44	0,94	3,92	%Grasa	0,61	0,89	2,93
%Mandioca	4,01	0,51	1,43	%H. Pescado	0,35	0,68	1,77
%Salvado	4,99	0,66	1,71	%Suero	0,13	0,94	4,38
%Girasol	1,60	0,95	4,67	%Altramuz	2,13	0,77	2,06
%Gluten	2,42	0,93	3,74	%CO ₃ Ca	0,70	0,67	1,74
%Arroz	1,95	0,53	1,47	%CINH ₄	0,04	0,78	2,50
%Remolacha	0,25	0,90	3,24	%Sal	0,09	0,52	1,44

Próximamente (6/11/03) entra en vigor la Directiva 2002/2/EC, que obliga a la utilización en el etiquetado de la llamada “declaración abierta”. Los resultados hasta aquí obtenidos nos permiten, como era nuestro deseo, disponer de unos resultados que hacen posible la aplicación de la tecnología NIRS para el cumplimiento de dicha Directiva.

Independientemente de los aspectos cuantitativos, en muchos casos es crucial el detectar la presencia o ausencia de determinados ingredientes. En el caso particular de la detección de harinas de carne en piensos. La Figura 1 muestra como el análisis discriminante PLS permite reconocer los piensos que contienen harina de carne de aquellos que no contienen (Pérez- Marin et al, 2003, d. n. p). Esta estrategia sería asimismo muy útil, para el soporte analítico necesario para el establecimiento de una Lista Positiva de Ingredientes.

Otros problemas de autenticación sobre los que desde hace dos años venimos trabajando en el marco de diferentes proyectos de I + D, son los relativos a la detección de la especie animal, tanto en harinas de carne (de la Haba et al., 2003) como en grasas animales (Bautista et al., 2003), Nuestro objetivo, de nuevo, era el adelantarnos a futuras normativas relativas a la prohibición del uso específico de determinados subproductos de origen animal. Una vez más en el transcurso de nuestro trabajo, la Directiva CE N° 1774/2002, relativa a los subproductos de origen animal, la cual entre otros, que establece la obligatoriedad de evitar la utilización de un subproducto de origen animal de una determinada especie, para la producción de alimentos de su misma especie, ha puesto en evidencia la importancia de lo que se denomina investigación pre-normativa.

Figura 1.- Análisis Discriminante (PLS) para la detección de piensos adulterados con harina de carne (Pérez Marín et al., 2002 d.n.p)



Los resultados preliminares obtenidos en esta línea de investigación, han resultado muy esperanzadores. Sin embargo, somos conscientes de la necesidad de trabajar de forma intensa y en colaboración con la industria en el desarrollo de bibliotecas espectrales de un elevado número de muestras y, asimismo, en la profundización en el uso e interpretación de algoritmos de análisis multivariante de clasificación y/o autenticación.

5.- AVANCES EN LA CONEXIÓN CON OTROS SENSORES: MICROSCOPIA NIR, NIR-IMAGEN

A lo largo de estos últimos años hemos puesto de manifiesto nuestro convencimiento, acerca de la necesidad de conexión de la tecnología NIRS con otros sensores, a fin de avanzar en el control de los numerosos factores que afectan el proceso productivo a nivel de la explotación agro-ganadera. Entre los sensores que presentan un mayor futuro, como complementarios de la espectroscopía NIR, se encuentran todos aquellos relacionados con la imagen, ya sea de la proveniente de un microscopio o de una cámara. En el primer caso, hablaríamos de Microscopía-NIRS y en el segundo de Imagen-NIRS. La primera de ellas comenzó a desarrollarse en aplicaciones de reconocimiento de ingredientes en aplicaciones farmacéuticas, pero se ha extendido a otros campos donde la identificación de ingredientes es igualmente importante. En el caso concreto de la Alimentación Animal. Piraux y Dardenne (2000) realizan un estudio de viabilidad para la detección y cuantificación de harinas de carne en piensos utilizando un microscopio acoplado a un equipo FT-NIR de Perkin Elmer. El sistema permite la obtención de espectros de muestras extremadamente pequeñas ($5 \mu \times 5 \mu$). El microscopio incluye una cámara y un sistema de visión que magnifica la imagen de la muestra a observar, se posiciona sobre la partícula de interés, a la cual se le obtiene su espectro FT-NIR. Tras los resultados preliminares obtenidos por Piraux y Dardenne (2000), este trabajo está siendo ampliado en el marco del Proyecto (STRATFEED GRD1-2000-25002), que tiene como

principal objetivo el desarrollo de protocolos de validación de PCR, NIRS y microscopía-NIRS para la identificación y cuantificación de harinas de carne en piensos. Los resultados hasta aquí obtenidos muestran que la microscopía_FT-NIR permite detectar la presencia de harina de carne y hueso, a niveles de inclusión tan bajos como el 0,5 %, pero que si pretendemos detectar un nivel del 0,1%, el número de partículas necesarias a analizar, precisaría de un tiempo de análisis superior a tres días, lo que hace al análisis impracticable desde el punto de vista del control rutinario. Por ello, en el marco del proyecto mencionado se trata de minimizar el tiempo de análisis, mediante diferentes estrategias (Baeten et al., 2003).

Bertrand (2000) indica que el desarrollo de sistemas de visión artificial capaces de registrar secuencias de imágenes en el infrarrojo cercano, es un campo de investigación en pleno crecimiento. Lo que podríamos denominar “NIRS- Imagen”, combina tecnología de la imagen convencional con espectroscopía y a veces radiometría y produce imágenes que contienen información “espacial” (imagen) y espectral (NIRS). Si entendemos que la distribución espacial de los ingredientes de productos complejos, posee una gran influencia sobre las propiedades físico-químicas de dichos productos, parece lógico pensar que la combinación de la espectroscopia con sistemas de visualización espacial, podría añadir nuevas dimensiones a la aproximación NIRS clásica.

Durante la 11ª Conferencia Internacional de Espectroscopía NIR, celebrada recientemente en Córdoba, el Dr. Chen, del Instrumentation and Sensing Laboratory del USDA de Beltsville-MD, resaltaba que, entre las ventajas que aporta el acoplamiento de ambas tecnologías, se encuentran las de la posibilidad de incrementar nuestra capacidad para identificar materiales y, asimismo, detectar características muy sutiles en una partícula/muestra (Chen, 2003). En la última década, el desarrollo de la tecnología NIRS-imagen, ha estado limitado por numerosos factores, tales como la incapacidad de las cámaras ordinarias para cubrir todo el rango espectral NIRS, los niveles de ruido elevados, la necesidad de uso de ordenadores de gran capacidad de computación, etc. En el momento actual, la mayor parte de los problemas han sido resueltos y la combinación NIRS-Imagen permite obtener un espectro NIR por cada “pixel”, creando una imagen tridimensional que posibilita explorar la interdependencia de información espectral y espacial de una muestra. Los sistemas actuales de NIRS-Imagen permiten obtener imágenes tridimensionales de cientos o miles de partículas simultáneamente y como indican Koehler, et al., (2003), el desarrollo de la tecnología NIRS-imagen será de gran utilidad para todos los aspectos relacionados con identificación y autenticación de alimentos y productos animales

Asimismo, el desarrollo futuro de micro cámaras-NIRS ofrecerá una herramienta científica de gran importancia para profundizar en numerosos aspectos digestivos y metabólicos.

Otra aplicación de la tecnología NIRS-imagen que pensamos tendrá un gran desarrollo en los próximos años, es el del uso de la información espectroscópica NIRS obtenida en equipos de laboratorio y/o portátiles combinada con la obtenida de imágenes satélite. También durante la 11ª Conferencia Internacional de Espectroscopia NIR, Foley et al (2003) ponían de manifiesto la imposibilidad del estudio de grandes territorios con

una aproximación química clásica. Durante años, su equipo de la Universidad de Canberra ha utilizado la tecnología NIRS para predecir la concentración de nutrientes y antinutrientes de Eucaliptus consumidos por koalas y otros marsupiales. Sin embargo, el entendimiento de los hábitos alimentarios de estos animales y, por tanto, su distribución geográfica a lo largo del territorio australiano, exige un cambio de escala a nivel de superficie de muestreo del material vegetal consumido y este cambio de escala no parece posible teniendo en cuenta que la aproximación analítica clásica conllevaría un enorme tiempo, derivado de recogida de muestras, molienda, obtención de datos espectroscópicos, etc. Por tal razón, Foley y su equipo han iniciado trabajos de investigación que combinan, el análisis NIRS de hojas frescas a nivel de laboratorio, el análisis NIRS de hojas obtenidas con un equipo portátil en campo y el análisis espectral de imágenes de grandes áreas de bosques obtenidas con HYMAP, que recoge datos espectroscópicos de 400 a 2500 nm, con una resolución de 3 metros. Con esta aproximación, han desarrollado ecuaciones para estimar nitrógeno foliar y el compuesto fenólico xideroxilanal-A, identificado como factor antinutritivo que limita la ingestión de hojas de *Eucalyptus melliodora* por koalas y otros marsupiales.

Trabajos de investigación realizados en nuestro grupo han intentado avanzar en esta dirección, para caracterizar sistemas de Dehesa (González, 2002). Para ello, se han recogido espectros de muestras intactas de suelo, árboles y pastos e imágenes Landsat-5 T, lo que ha permitido cuantificar el grado de cobertura y estado de la vegetación de grandes zonas de Dehesa.

Pensamos que la generalización del uso de la tecnología NIRS, combinada con información procedente de sensores remotos, cada vez de mayor resolución y número de bandas, contribuirá en los próximos años al estudio de los hábitos alimentarios de rebaños en pastoreo y a una mejor caracterización de los sistemas agro-silvo pastorales.

6.- AVANCES EN LA IMPLANTACIÓN DE SERVICIOS ANALÍTICOS NIRS: ALGUNOS EJEMPLOS

En la última década se han consolidado algunos de los Servicios Analíticos basados en la tecnología NIRS que ya mencionábamos en 1996, y se han creado otros muchos, tanto a nivel público como privado. A continuación resumimos algunos ejemplos de tales Servicios Analíticos.

Purines, estiércol y compost son subproductos de las explotaciones agro-ganaderas cuya gestión eficiente es uno de los problemas medio-ambientales de mayor envergadura, sobre todo en zonas donde dominan los sistemas de producción intensiva. Si estos subproductos se gestionan de forma adecuada su uso como fertilizante, resuelve un problema importante de contaminación ambiental, al mismo tiempo que reduce el uso de fertilizantes inorgánicos. Sin embargo, la alta variabilidad en la composición en nutrientes de dichos subproductos, dificulta su papel de aporte de nutrientes, a menos, que exista un conocimiento adecuado de su composición. Varios laboratorios del mundo han

desarrollado o están desarrollando ecuaciones de calibración NIRS, para la predicción de la composición de purines, estiercol y compost y proporcionan recomendaciones para su uso en base a dicha composición (Manley, 2002).

Por otra parte, las necesidades de demostración a nivel de análisis de las características de productos (carne, leche, etc) procedente de animales cuya producción se encuentra inmersa dentro de algún sistema nacional o internacional de aseguramiento o certificación de la calidad, ha provocado la demanda creciente por parte de productores individuales y/o sus asociaciones del análisis rutinario de dichos productos. Algunos laboratorios ligados a industrias del sector de piensos han extendido su rango de servicios analíticos tratando de dar un mayor servicio a sus clientes. Un ejemplo de entre los muchos existentes se resume a continuación.

Maasweide Laboratory Services, uno de los laboratorios del grupo NUTRECO situado en Holanda, es un ejemplo de Servicio Analítico basado en la tecnología NIRS, que, junto al servicio clásico de análisis de ingredientes y materias primas, ha incorporado también otros servicios analíticos de interés para los productores holandeses, tales como el análisis de compost y de carne de cerdo (cuadros 11 y 12). Ambos productos han sido introducidos en los controles analíticos de dicho laboratorio, para colaborar con los productores de porcino en consolidar una imagen de respeto medioambiental, y de trazabilidad de productos ganaderos. Un ejemplo concreto de lo que imaginábamos (Garrido et al., 1996) que sería lo que denominábamos “Servicio Integral en Alimentación Animal, basado en la tecnología NIRS”.

Cuadro 11.- Caracterización química de compost y estadísticos de calibración NIRS (Maasweide Laboratory Services, 2001)

Variable	N	Rango	ETC	ETVC	r²
Humedad	1617	57,4-79,7	0,62	0,65	0,98
Nitrógeno	1314	0,28-1,21	0,03	0,03	0,98
Cenizas	1334	4,36-18,70	0,56	0,58	0,93
FB	960	3,40-11,68	0,34	0,36	0,94
ADF	925	8,80-18,60	0,45	0,49	0,87
NDF	929	8,10-19,30	0,52	0,57	0,87
Ph	1352	5,60-8,80	0,22	0,24	0,91
TVN	1053	0,00-2,88	0,09	0,10	0,98

Cuadro 12.- Caracterización química de carne de cerdo y estadísticos de calibración NIRS (Maasweide Laboratory Services, 2001)

Variable	N	Rango	ETC	ETVC	r²
Humedad (%)	148	68,8-77,7	0,25	0,31	0,98
Grasa (%)	150	0,8-9,8	0,24	0,30	0,99

Desde 1998, Degussa viene proporcionando a sus clientes servicios de análisis NIRS de determinación de aminoácidos en materias primas, tales como soja, colza, girasol, guisantes, harina de pescado, harina de carne y harina de aves. Un ejemplo de las ecuaciones disponibles se muestra en el cuadro 13.

El tipo de servicio posee dos niveles diferentes. En general, los clientes envían sus muestras a analizar al laboratorio de Degussa, situado en Hanau-Wolfgang (Alemania). Sin embargo, a grandes clientes que poseen equipos FOSS-NIRsystems, Degussa les proporciona las ecuaciones, tras clonación de sus equipos al master que ha desarrollado las mismas. Este tipo de servicio solo se presta a clientes seleccionados por el Vice-Presidente de Ventas en Hanau, ya que Degussa considera esta prestación como un “servicio muy especial y valioso” (Fontaine, 2003; comunicación personal).

Este servicio proporcionado por Degussa a sus clientes y muchos otros, que están asimismo proporcionando otras empresas, están mostrando como la tecnología NIRS, en muchos casos, se ha convertido en uno de los argumentos principales de venta.

Cuadro 13.- Predicción NIRS de aminoácidos en harina de girasol (Fontaine et al., 2002)

Variable	Media	CV	Min.	Máx.	ETVC	r ²	R ^{2b} _{CP}
Proteína bruta	33,5	13,4	25,0	49,0	0,948	0,96	
Metionina	0,73	13,9	0,56	0,97	0,034	0,89	0,92
Cistina	0,57	14,5	0,44	0,85	0,029	0,88	0,32
Met+Cis	1,30	13,9	1,00	1,82	0,053	0,92	0,43
Lisina	1,16	13,8	0,84	1,54	0,058	0,87	0,87
Treonina	1,20	12,8	0,92	1,65	0,042	0,93	0,78
Triptófano	0,45	13,3	0,34	0,59	0,013	0,96	0,73
Arginina	2,69	16,0	1,96	4,25	0,108	0,94	0,91
Isoleucina	1,34	14,5	1,02	2,03	0,049	0,94	0,88
Leucina	2,09	13,6	1,56	2,94	0,068	0,94	0,92
Valina	1,64	13,4	1,25	2,35	0,061	0,92	0,92

^a Número de muestras, n = 83; triptófano n = 45; b= coeficiente de determinación de la regresión lineal entre el Aminoácido y PB

En la actualidad, mas de 1000 ganaderos y nutricionistas especializados en manejo de animales en pastoreo en los Estados Unidos, usan un Sistema de Ayuda a la Decisión (SAD) denominado NIRS/NUTBAL, gestionado por el Grasland Animal Nutricional Laboratory (GAN lab), el cual comenzó a funcionar en 1994, como parte del Servicio de Extensión del grupo de Sistemas de Pastoreo de la Universidad de Texas A &M. Dicho Sistema (SAD) surge como consecuencia de la importancia que el grupo de Sistemas de Pastoreo atribuye al conocimiento de la calidad de la ración, para el correcto manejo de los rebaños, sobre todo para diseñar la complementación de concentrados mas adecuada. La base del sistema se fundamenta en la determinación de los perfiles fecales, que fue

finalizada en 1991, y en el año 1994 la investigación había progresado hasta tal punto, que las ecuaciones NIRS desarrolladas se consideraron lo suficientemente robustas, como para establecer un laboratorio nacional de servicio a los ganaderos (Lyons y Stuh, 1992, Leite y Stuth, 1995 y Stuth y Lions, 1995).

El software NUTBAL demanda al usuario el aportar información sobre el tipo, clase y raza de animal, para el cual es preciso realizar un plan de manejo alimentario, características de la condición corporal y de las condiciones ambientales, establecer los pesos finales deseados y después permite, asimismo, proporcionar los resultados de la calidad de la ración obtenidos a partir del análisis de heces. NIRS/NUTBAL produce un balance nutricional para proteína y energía neta. Si existen deficiencias, el usuario usa NUTBAL para determinar la cantidad de concentrado de mínimo coste que es necesario complementar para corregir el déficit. Este SAD se encuentra aún en desarrollo y, en principio, está adaptado para bovino, ovino y caprino.

La gestión de redes NIRS de equipos clonados, se ha visto facilitada en los últimos años con los servicios que algunas empresas proporcionan para el análisis, a través de diferentes servidores de INTERNET. Un ejemplo de ello lo constituye el Servicio Analítico proporcionado por el Departamento de Calidad de las Producciones Agrícolas del CRA de Gembloux, dirigido por el Dr. Dardenne. Dicho Departamento utiliza el sistema denominado RINA (Remote Internet Network Analysis) de Foss-Infrasoft International. Los modelos predictivos NIRS desarrollados durante años por el CRA-Gembloux, son almacenados en el servidor y los clientes autorizados envían espectros vía dicho servidor y reciben de forma instantánea la predicción realizada por las ecuaciones de predicción apropiadas (Dardenne, 2003). Existen otros servicios similares tales como el denominado QTA, Quality Trait Analysis, muy extendido en Canadá para el análisis de ácidos grasos en colza (Tseng, 2003), o NIRNet, que se encuentra en fase de desarrollo por investigadores de la Universidad de Iowa y de CEMAGREF (Dzupin, et al, 2003)

Parece evidente que este tipo de Servicios proliferará en los próximos años y que los propietarios de los mismos, deberán tener en cuenta características del servicio tales como, velocidad de respuesta de sus servidores, número de productos/analitos a predecir, tipos de instrumentos y modos de análisis cuyo espectro pueda ser utilizado para la predicción, y, lo que es más importante, que se ofrezcan garantías de fiabilidad de los datos predichos.

6.- CONCLUSIONES

La Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano se ha consolidado como una verdadera disciplina científica y en la última década ha mostrado su inmenso valor para la industria de la alimentación animal. En el futuro podremos comprobar su contribución científica al entendimiento de los procesos que regulan la utilización del alimento por el animal.

7.- REFERENCIAS

- ABRAMS, S.M. (1989) En: *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Analysis of Forage Quality*. Marten, G.C., Shenk, J.S y Barton II, F.E. (Eds.). USDA-ARS Agriculture Handbook. No. 643: 55-56.
- ALVAREZ, C., DE BLAS, C., SANTOMÁ, G., GORRACHATEGI, M y PEREZ DE AYALA, P. (2000 y 2002). *Normas FEDNA para el Control de calidad de Materias Primas*. FEDNA, Madrid
- BATEN, V., RENIER, A., SINNANEVE, G., GARRIDO-VARO, A. y DARDENNE, P (2003). En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa)
- BAUTISTA, J., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO, J.E., PÉREZ-MARÍN, M.D y BURÓN, T (2003). En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- BERTRAND, D. (2000) En: *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, Chap 9*. Bertrand, D y Dufour, E. (Eds.). Collection Science & Techniques Agroalimentaires, Editions TEC & DOC, Paris. pp: 213-258.
- BIRTH, G.S. y HETCH, H.G. (1987) En: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. Williams, P.C. y Norris, K.H. (Eds.). Amer. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, pp: 1-14.
- BISPLINGHOFF, F.D. (1993) En: *Collection Feeding and Nutrition*, Texas A & M University. pp: 11.
- BOUCQUÉ CH.V. y FIEMS L.O. (1988). En: *Livestock Feed Resources and Feed Evaluation in Europe*. De Boer, F y Bickel, H. (Eds.). EAAP Publication No. 37. Elsevier. Amsterdam. The Netherlands., pp. 97-135.
- CHEN, Y-R (2003) En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- COLEMAN, S. (1999) *Feed Facts: Dairy*.
- DARDENNE, P. (2003) En: *Workshop "New ISI software developments". 11th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy*. Córdoba. (Spain).
- DE BLAS, C., MATEOS, G.G. y REBOLLAR P.G. (1999) *Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos*. FEDNA, Madrid. pp: 455-471.
- DE LA HABA, M.J., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO, J.E., PÉREZ-MARÍN, M.D y BURÓN, T (2003). En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- DZUPIN, R., HURBURGH, C.R. y ROUSSEL, S.A. (2003) En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- EDMUNDS B.K. (1990). En: *Feedstuffs Evaluation*. Wiseman, J y Cole, D.J.A. (Eds.). Butterworths. London. pp. 197-211.
- FOLEY, W.J., WALLIS, I., HUANG, Z., TURNER, B. y DURY, S. (2003) En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- FONTAINE, J., HÖRR, J. y SCHIRMER, B. (2001). *J. Agric. Food Chem.* **49**, 57-66.
- FONTAINE, J. (2003). *Comunicación personal*.

- GARCÍA-OLMO, J., GARRIDO, A. y DE PEDRO, E. (2001) *J. Near Infrared Spectrosc.* **9**: 49-62.
- GARRIDO, A., GÓMEZ, C., GUERRERO, J.E. y FERNÁNDEZ, V. (1996). En: *Avances en Nutrición y Alimentación Animal, XII Curso de Especialización FEDNA*. P.G, Rebollar, G.G, Mateos y C, de Blas (Eds.). FEDNA, Madrid, pp: 275-303.
- GARRIDO, A., COBO, C., GARCÍA-OLMO, J., SÁNCHEZ-PINEDA, M.T., ALCALÁ, R., HORCAS, J.M. y JIMÉNEZ, A. (2000) En: *Near infrared spectroscopy: Proc. of the 9th Int. Conference*. A.M.C. Davies y R. Giangiaco. (Eds.). NIR Publications, Chichester, UK. pp: 867-871.
- GARRIDO, A., PÉREZ-MARÍN, M.D., GÓMEZ, A., GUERRERO, J.E., DE PAZ, F. y DELGADO, N. (2001). *ITEA*. **22** (2): 589-591.
- GARRIDO, A., PÉREZ-MARÍN, M.D., GÓMEZ, A. y GUERRERO, J.E. (2001). *Informes y protocolos para el análisis NIRS de grasas elaborados para las empresas SAPROGAL, NUTEGA, GEPISA y COVAP*.
- GARRIDO, A., PÉREZ-MARÍN, M.D., GÓMEZ, A., GUERRERO, J.E., DE PAZ, F. y DELGADO, N. (2002) En: *Proc. of the 10th Int. Conference on near infrared spectroscopy*. A.M.C. Davies y R.K. Cho. (Eds.). NIR Publications, Chichester, U.K. **5**: 313-317.
- GARRIDO, A., GARCÍA-OLMO, J. y PÉREZ-MARÍN, M.D. (2003). En: *NIR Spectroscopy in Agriculture (Chapter 19)*. C. Roberts., R. Windham y J. Workman. (Eds.). Editorial: American Society of Agronomy (ASA), Crop Science Society of America (CSSA) and Soil Science Society of America (SSSA) (en prensa).
- GILLESPIE, F. (2000) En: *In Focus*, 24-1, pp: 4.
- GONZÁLEZ MATEOS, G., GONZÁLEZ REBOLLAR, P. y MEDEL, P. (1996) En: *Avances en Nutrición y Alimentación Animal, XII Curso de Especialización FEDNA*. P.G, Rebollar, G.G, Mateos y C, de Blas. (Eds.). FEDNA, Madrid, pp: 3-21.
- GONZÁLEZ DUGO, M. P. (2002). Tesis Doctoral Universidad de Córdoba.
- LYONS R.K. y STUTH, J.W. (1992). *J. Range Manage.* **45**:238-244.
- LEITE, E.R., y STUTH, J.W. (1995). *Small Ruminant Research.* **15**:223-230.
- MANLEY, D. (2002). En: *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy*. Davies, A.M.C. y Cho, R. K. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK. pp: 391-398.
- MARTINEZ, A., DE LA ROZA, B y col (2003). En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- NAES, T., ISAKSSON, T., FEARN, T. y DAVIES, T. (2002) En: *A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, UK. pp: 155-175.
- PARK, R.S., AGNEW, R.E., GORDON, F.J. Y BARNES, R.J (1999). *Anim. Feed Sci. Techno.* **78**: 325-340
- PÉREZ-MARÍN, M.D., DE PEDRO, E., GARCÍA-OLMO, J. y GARRIDO, A. (2001) En: *Proc. of the 10th International conference on near-infrared spectroscopy*. A.M.C. Davies y R.K. Cho. (Eds.). NIR Publications, Chichester, UK. pp: 473-475.
- PIRAUX, F y DARDENNE, P (2000). En: *Near infrared spectroscopy: Proc. of the 9th Int. Conference*. A.M.C. Davies y R. Giangiaco. (Eds.). NIR Publications, Chichester, UK. pp: 535-541.

- SHENK, J.S. (1990) En: *Proceedings of the 3rd International conference on near infrared spectroscopy*. R. Biston y N. Bartiaux-Thill. (Eds.). Agricultural Research Centre Publishing, Gembloux, Belgium. pp: 649-654.
- SHENK, J.S. y WESTERHAUS, M.O. (1995) *Monograph*, NIRSystems, Infracsoft International, LLC, Sylver Spring MD, USA.
- STUTH J.W., y R.K. LYONS. (1995). NIRS-NUTBAL .En: *Proceedings of Mid-South Ruminant Nutrition Conference*. Jordan, E.R. (Ed.).
- TSENG, Ch-H. (2003) En: *Stretching the NIR spectrum to the limit*. Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK (en prensa).
- WETZEL, D.L. (2001) En: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition*. Williams, P.K. y Norris K. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp:129-144.
- WILLIAMS, P.C. (2001) En: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition*. Williams, P.K. y Norris K. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp:145-169.