

PREDICCIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE LOS COMPONENTES MORFOLÓGICOS DE LA PLANTA DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) MEDIANTE NIRS

PREDICTION OF NUTRITIVE VALUE OF MORPHOLOGICAL COMPONENTS OF SUNFLOWER PLANT (*Helianthus annuus* L.) BY NIRS

S. PEREIRA-CRESPO, G. FLORES-CALVETE, A. GONZÁLEZ-ARRÁEZ, B. FERNÁNDEZ-LORENZO, J. VALLADARES-ALONSO, N. DÍAZ-DÍAZ Y C. RESCH-ZAFRA

Instituto Galego de Calidade Alimentaria. Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo (INGACAL-CIAM). Apdo. 10, 15080 A Coruña soniapereira@ciam.es

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa la capacidad de predicción de las ecuaciones de calibración desarrolladas mediante NIRS para estimar el valor nutritivo de las diferentes fracciones morfológicas de la planta de girasol (*Helianthus annuus*, L.). Un total de 120 muestras correspondientes a las fracciones hojas, tallos, receptáculo (incluyendo brácteas y pétalos) y frutos (incluyendo inflorescencias y semillas) procedentes de plantas cosechadas en diferentes estados fenológicos comprendidos desde la floración hasta la madurez fisiológica del cultivo fueron analizadas por métodos de referencia. Se determinó el contenido en materia orgánica, proteína bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, lignina-sulfúrico, carbohidratos no estructurales, carbohidratos solubles, extracto etéreo, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y energía bruta. Las calibraciones fueron desarrolladas utilizando regresión mínima cuadrática modificada, realizando la regresión entre los datos espectrales y los de referencia. La capacidad predictiva de las ecuaciones obtenidas se considera como excelente, mostrando coeficientes de determinación superiores a 0,97 y valores del índice RER (relación entre el rango de los datos de referencia y el estándar de calibración (SEC) y de validación cruzada) superiores a 10 para todos los parámetros estudiados excepto para lignina-sulfúrico, cuyos estadísticos indicaron una inferior calidad de las predicciones.

Palabras clave: forraje, espectroscopía de infrarrojo cercano, composición química.

SUMMARY

In this work it is studied the predictive ability of NIRS calibration equations for the estimation of the nutritive value of the different morphological fractions of sunflower (*Helianthus annuus*, L.) crop growth for forage. A total of 120 fresh samples representing leaves, stems, receptacles (plus bracteas and ray flowers) and fruits (including inflorescences and seeds) from plants harvested at different developmental stages from flowering to plant physiological maturity were analysed by reference methods. Analytical determinations included organic matter crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, cellulose, lignin, non-structural carbohydrates, water-soluble carbohydrates, ether extract, organic matter *in vitro* digestibility and gross energy. NIRS calibrations were developed by modified partial least-square regression between spectral and reference analytical values. Performance of calibrations obtained was deemed as very good, based on determination coefficient values exceeding 0.97 and RER values higher than 10 for all parameters studied, except for LAD content for which the quality of predictions was somewhat lower.

Key words: Sunflower forage, near infrared reflectance spectroscopy, chemical composition.

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un cultivo de verano muy poco aprovechado como forraje, pero ofrece una serie de características que lo sitúan como un buen candidato a ser alternativa al maíz forrajero en ciertas condiciones y zonas de Galicia, como terrenos menos productivos, debido a su tolerancia a condiciones de escasez de agua y nutrientes (Tan y Turner, 1996).

El conocimiento de su composición química es fundamental para evaluar su valor nutritivo, y requiere el análisis de un gran número de muestras mediante métodos analíticos convencionales que son lentos y caros. La tecnología NIRS (Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano) está ampliamente reconocida como una técnica analítica rápida, barata y de gran precisión en la determinación de la composición química de forrajes (Shenk y Westerhaus, 1985).

El objetivo del presente trabajo es evaluar el uso de la técnica NIRS para predecir parámetros de la composición química, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y energía bruta de diferentes fracciones morfológicas de la planta de girasol (*Helianthus annuus*, L.) en estado fresco.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal proviene de un ensayo realizado en la finca experimental del

CIAM en Mabegondo (A Coruña, zona costera de clima atlántico a 100 m de altitud) durante el año 2004. La siembra de la variedad PR63A90 de girasol se realizó el 21 de mayo de 2004 en líneas separadas 70 cm con plantas a 15 cm de distancia, resultando una densidad final de 89×10^3 plantas ha^{-1} . Siguiendo un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones, el cultivo se cosechó en diez fechas diferentes desde el inicio de la floración hasta la madurez fisiológica (estados R4 a R9 de Schneiter y Miller, 1981) a intervalos semanales. En cada fecha de corte y en cada repetición se cortaron a mano a 12 cm del suelo las plantas de un transecto de 3 m, separándose en el laboratorio dos fracciones: parte vegetativa (constituida por tallo y hojas) y capítulo (constituida por receptáculo, brácteas e inflorescencias o semillas). Adicionalmente, en dos repeticiones las plantas cosechadas en los cortes de las semanas 1, 3, 5, 7 y 9 se escogieron seis plantas representativas del cultivo y se obtuvieron cuatro fracciones: hoja, tallo, receptáculo (incluyendo las brácteas y pétalos) y semilla. Posteriormente, cada una de las fracciones se picaron por separado en una picadora de forrajes VIKING y, por cuarteos sucesivos, se tomó una alícuota de aproximadamente 1000 g.

El análisis NIRS se realizó sobre las muestras secas y molidas a 1 mm ($n=120$) procediéndose al registro por duplicado de

los espectros de reflectancia ($\log I/R$ vs λ) de todas las muestras en un espectrofotómetro monocromador Foss NIRSystem 6500 (Foss NIRSystem, Silver Spring, Washington, USA) provisto de módulo de giro y situado en cámara isoterma. Para los procesos de calibración y validación cruzada se utilizó el espectro medio abarcando la región NIR del espectro (rango de longitud de onda entre 400 y 2500 nm), con lecturas a intervalos de 2 nm. La recogida de los datos espectrales y el análisis quimiométrico de los mismos se llevó a cabo mediante el programa WinISI II v. 1.5 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA, 2000). La selección de las muestras representativas del grupo de calibración se realizó utilizando el algoritmo SELECT basado en el análisis por componentes principales, que elige muestras espectralmente diferentes (Shenk y Westerhaus, 1991), acotando a 100 las muestras a seleccionar para la calibración.

Las muestras seleccionadas fueron analizadas por vía húmeda mediante métodos de referencia y por duplicado. Se determinó el contenido en materia orgánica (MO) por ignición en mufla a 550°C; el de proteína bruta (PB), expresada como nitrógeno total $\times 6,25$, mediante digestión micro Kjeldahl seguida de la determinación colorimétrica del ión amonio, según el método descrito por Castro et al. (1990) adaptado al autoanalyzer de flujo continuo AAIII (Bran-Luebbe,

Inc., Technicon Industrial Systems Corp., Tarrytown, NY, EEUU), el de Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD), Celulosa (CEL) y Lignina (LAD) se realizaron siguiendo los procedimientos propuestos por Van Soest y Robertson (1991) para FND y por Goering y Van Soest (1970) para FAD, CEL y LAD, adaptados al digestor Fibertec System modelo 1020 de la marca Foss Tecator y al FibreAnalyzer (ANKOM Technology Co., Fairport, NY, USA); el de carbohidratos no estructurales (CNET) y carbohidratos solubles en agua (CSA), según Castro (2000), el análisis de grasa total (EE) se realizó por el método oficial AOAC (2003) para forrajes, cereales-grano y alimentos animales en general, utilizando un equipo Soxtec TM 2050 de FOSS (FOSS Analytical AB, Hógenas, Suecia) y el análisis de energía bruta (EB) se realizó en un calorímetro isoperibólico PARR-1281EF (Parr Instruments Company, Moline, IL, EEUU. La determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DMOIV) se realizó mediante el procedimiento descrito por Tilley y Terry (1963), modificado por Alexander y McGowan (1966). En el caso de las muestras que contenían semillas de girasol la determinación de digestibilidad se realizó sobre material desengrasado por lavado con éter de petróleo para evitar el efecto depresor del aceite de las muestras sobre su digestibilidad (Valdez et al., 1988) Todos los parámetros se

refirieron a materia seca.

Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración se trataron los espectros mediante SNV-Detrend (Tipificación de la absorbancia y corrección de la tendencia; Barnes *et al.*, 1989) para corregir los efectos de dispersión de la luz. Las calibraciones fueron desarrolladas utilizando regresión mínima cuadrática modificada (MPLS), realizando la regresión entre los datos espectrales y los de referencia (Martens y Naes, 1987), eliminando previamente las muestras anómalas utilizando para ello la distancia de Mahalanobis (estadístico H). Este modelo de regresión incluyó validaciones cruzadas para prevenir el sobreajuste, dividiendo el total de muestras de calibración en cinco grupos, que fueron secuencialmente utilizados para efectuar la validación de las ecuaciones generadas con los restantes cuatro grupos. El procedimiento se repitió hasta que todas las muestras fueron predichas una vez y se obtuvieron los errores estándar de la validación cruzada.

Los estadísticos usados para seleccionar la ecuación de calibración fueron los errores estándar de calibración (SEC) y de validación cruzada (SECV) y los coeficientes de determinación (R^2 y r^2) obtenidos en el proceso de calibración y validación externa, respectivamente, así como el índice RER o relación entre el rango de los datos de referencia y el SECV, por ser un estadístico útil

para evaluar la precisión y exactitud de los modelos de calibración (Williams y Sobering, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los valores mínimos, máximos, y la desviación estándar de los parámetros para las diferentes fracciones (capítulo, parte vegetativa, hojas, tallos, receptáculo y semillas) utilizadas en este trabajo, observándose que tanto el número de muestras como la variabilidad en su composición química, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y energía bruta se consideran adecuados para el desarrollo inicial de las calibraciones NIRS.

El rango y la desviación estándar del set de calibración y los estadísticos que describen la calidad de las ecuaciones de predicción obtenidas se muestran en la Tabla 2. Los coeficientes de determinación en el proceso de calibración (R^2), que ofrecen información sobre la calidad de la calibración, alcanzaron el valor de 0,99 para la mayoría de los parámetros, excepto para LAD y MO con valores de 0,77 y 0,97, respectivamente. Shenk y Westerhaus (1996) indican que las ecuaciones NIRS, con un coeficiente de determinación superior a 0,90, poseen una precisión excelente. Según Williams (2003) se definen siete niveles de precisión de la calibración basándose en los valores del coefi-

Tabla 1. Valor mínimo, máximo y desviación estándar de todos los parámetros de las fracciones de la planta de girasol cosechada para forraje.

Fracción		MO	PB	FND	FAD	CEL	LAD	EE	CNET	CSA	DMOIV	EB
Capítulo (n= 40)	SD	5,06	1,39	2,11	3,82	4,51	1,52	12,78	11,34	10,87	10,51	2,96
	Max	94,00	10,77	37,03	37,05	33,59	8,46	35,24	34,91	33,72	76,24	25,65
	Min	80,78	6,66	29,46	23,48	16,92	3,66	2,79	3,77	3,71	46,73	18,10
Parte ve- getativa (n= 40)	SD	1,64	1,14	6,15	5,87	4,70	1,21	0,14	8,14	8,10	7,66	0,19
	Max	91,73	6,15	67,75	52,46	44,18	8,27	1,18	23,73	23,78	55,24	17,39
	Min	87,47	2,80	48,36	36,19	31,56	4,61	0,76	2,35	2,18	32,14	16,79
Semillas (n=10)	SD	0,86	1,19	5,11	3,69	3,42	0,51	21,29	16,43	17,07	12,31	4,62
	Max	97,30	12,40	33,70	25,95	20,02	6,77	51,86	43,63	42,66	70,77	29,46
	Min	95,15	9,63	22,33	16,64	12,24	5,62	2,14	3,92	3,14	40,48	18,54
Receptácu- los (n=10)	SD	3,70	1,02	4,39	6,48	5,88	1,25	1,16	12,58	12,69	11,38	0,55
	Max	92,11	6,04	37,57	36,04	31,28	5,33	4,57	33,27	32,92	75,03	17,42
	Min	83,61	3,84	27,44	20,54	18,64	2,73	2,34	3,82	3,38	45,96	16,06
H o j a s (n=10)	SD	2,45	3,76	3,42	8,26	9,84	2,20	0,22	3,38	4,10	6,69	0,79
	Max	83,02	15,94	31,00	45,02	41,50	9,09	4,07	11,15	12,12	60,38	17,13
	Min	76,44	6,88	22,66	23,78	17,30	3,63	3,51	3,57	3,22	43,93	15,24
T a l l o s (n=10)	SD	0,61	0,33	7,90	8,11	6,72	1,91	0,07	10,04	10,22	13,00	0,06
	Max	94,09	1,84	76,48	62,34	56,07	9,04	0,51	26,65	26,20	57,30	17,16
	Min	92,47	1,01	57,70	42,81	38,47	4,53	0,33	3,70	3,21	22,41	17,01

MS: materia seca; MO: materia orgánica (%MS); PB: proteína bruta (%MS); FND: fibra neutro detergente (%MS); FAD: fibra ácido detergente (%MS); CEL: celulosa (%MS); LAD: lignina (%MS); EE: extracto etéreo (%MS); CNET: carbohidratos no estructurales (%); CSA: carbohidratos solubles en agua (%MS); DMOIV: digestibilidad in vitro de la materia orgánica (%); EB: energía bruta (MJ kg⁻¹ MS); SD: desviación estándar; Min: Mínimo; Max: Máximo

ciente de determinación en el proceso de calibración, considerando que los modelos que tienen valores por encima de 0,91 se consideran excelentes; por lo tanto, las ecuaciones obtenidas presentan una calibración excelente para todos los parámetros, excepto para LAD.

Los errores estándar de calibración (SEC) y de validación cruzada (SECV) se sitúan dentro de los intervalos aceptables citados por otros trabajos de desarrollo de calibraciones del valor nutritivo de forrajes (Murray, 1993).

Tabla 2. Estadísticos de la ecuación de calibración desarrollada para la predicción de todos los parámetros de las fracciones de la planta de girasol cosechada para forraje

Parámetro	SD	Rango		SEC	R ²	SECV	r ²	RER
MO	4,50	76,98	94,53	0,83	0,97	1,65	0,88	10,61
PB	3,00	1,13	14,72	0,21	0,99	0,29	0,99	47,38
FND	15,75	23,07	75,87	1,01	0,99	1,49	0,99	35,32
FAD	11,98	17,20	60,35	1,00	0,99	3,64	0,90	11,85
CEL	11,02	12,72	54,46	1,06	0,99	3,19	0,91	13,09
LAD	1,70	2,78	8,89	0,82	0,77	1,13	0,55	5,40
EE	13,31	0,33	51,44	0,26	0,99	0,85	0,99	59,83
CNET	9,60	1,07	40,52	0,61	0,99	0,92	0,99	42,77
CSA	8,80	2,92	39,46	0,66	0,99	1,23	0,99	29,67
DMOIV	11,64	16,10	29,20	1,41	0,98	1,87	0,96	45,82
EB	3,62	29,44	73,90	0,16	0,99	0,29	0,99	23,84

MS: materia seca; MO: materia orgánica (%MS); PB: proteína bruta (%MS); FND: fibra neutro detergente (%MS); FAD: fibra ácido detergente (%MS); CEL: celulosa (%MS); LAD: lignina (%MS); EE: extracto etéreo (%MS); CNET: carbohidratos no estructurales (%); CSA: carbohidratos solubles en agua (%MS); DMOIV: digestibilidad in vitro de la materia orgánica (%); EB: energía bruta (MJ kg⁻¹ MS); SD: desviación estándar; SEC: error estándar de calibración; SECV: error estándar de validación cruzada; R² y r²: coeficiente de determinación en calibración y validación cruzada; RER = Rango/SECV

El índice RER confirmó la buena precisión de las ecuaciones desarrolladas para todos los parámetros, superando en todos los casos el umbral de 10, excepto para LAD, sugerido por Williams y Sobering (1996), como indicador de la posibilidad de predecir cuantitativamente. Sólo se ha encontrado en la bibliografía la información proporcionada por Fassio *et al.* (2007) acerca de aplicabilidad de la técnica NIRS para la predicción del valor nutricional de girasol forrajero, cuyos resultados muestran una calibración menos robusta a la obtenida en este trabajo, con valores menores valores de R² y mayores de SECV.

CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que la tecnología NIRS se trata de una herramienta precisa y apropiada para la predicción de los parámetros estudiados, excepto para el contenido de lignina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER R.H. Y MCGOWAN M. (1966) The routine determination of in vitro digestibility of organic matter in forages. *J. Brit. Grassld Soc.*, 21, 140-147.
- AOAC (2003). Official Method 2003.06 Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages. *Journal of AOAC International*, 86, 888-899.

BARNES R.J., DHANOA M.S. Y LISTER S.J. (1989) Standard normal variate transformation and Detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772-777.

CASTRO P., GONZÁLEZ-QUINTELA A. Y PRADA-RODRÍGUEZ D. (1990) Determinación simultánea de nitrógeno y fósforo en muestras de pradera. En: Pastos (Ed) Actas de la XXX Reunión Científica de la SEEP, pp. 200-207. San Sebastián, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

CASTRO P. (1996) Efecto de tres temperaturas de secado sobre la composición química de forrajes y heces. En: Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Ed) Actas de XXXVI Reunión Científica de la SEEP, pp. 365-368. La Rioja, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

CASTRO P. (2000) Determinación de carbohidratos no estructurales en forrajes. En: Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria (Ed) Actas de la III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes, pp. 447-453. Santiago de Compostela, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos

FASSIO A., GIMENEZ A, FERNANDEZ E, VAZ MARTINS D Y COZZOLINO, D. (2007) Prediction of chemical composition

in sunflower whole plant and silage (*Helianthus annuus* L) by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 15, 201-207.

GOERING H. Y VAN SOEST P. (1970) Forage fiber analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some applications). *Agriculture Handbook*, 379, 20 pp. ARS, USDA, Washington, EEUU.

MARTENS H.Y NAES T. (1987) Multivariate calibration by data compression. En: P. Williams and K. Norris (Eds) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists, pp. 57-88. St. Paul, Minnesota, USA.

MURRAY I. (1993) Forage analysis by Near-Infrared Spectroscopy. En: A. Davies et al. (Eds) *Sward Measurement handbook* (2nd. edition) Chapter 14, pp. 285-312. BGS Publications. Reino Unido.

TAN S. Y TUMER S. (1996). Research on the evaluation of silage quality of sunflowers. *Anadolu*, 6, 45-57.

TILLEY J.M.A. Y TERRY R.A. (1963) A two stage technique for in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grasslands Society*, 18, 104-111.

SCHNEITER A.A. Y MILLER J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21, 901-903.

SHENK J.S. Y WESTERHAUS, M.O. (1985). Accuracy of NIRS instruments to analyse forage and grain. *Crop Science*, 25, 1120-1122.

SHENK J.S. Y WESTERHAUS M.O. (1991) Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*, 31, 469-474.

SHENK J.S. Y WESTERHAUS M.O. (1996) Calibration the ISI way. En: Davies A.M.C. y Williams P. (Eds). *Near Infrared Spectroscopy: the Future Waves*, NIR Publications, pp.198-202. Chichester, Reino Unido.

VALDEZ F. R., HARRISON J. H. Y FRANSEN S. C. (1988). Effect of feeding corn-sunflower silage on milk production, milk composition, and rumen fermentation of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 71 (9): 2462-2469.

WILLIAMS (2003) Near-infrared technology getting the best out of light. A Short Course in the Practical Implementation of Near Infrared Spectroscopy for the User. PDK Projects Inc., Nanaimo, Canadá.

WILLIAMS P. Y SOBERING D. (1996) how do we it: brief summary of the methods we use in developing near infrared calibration. En: Davies A.M.C. y Williams P. (Eds). *Near Infrared Spectroscopy: The fu-*

ture waves, NIR Publications, pp.185-188. Chichester, Reino Unido.

WIN ISI 1.5, 2000. ISI WINDOWS Near-Infrared Software, The Complete Software Solution for Routine Analysis, Robust Calibration and Networking, ISI (Infrasoft International), LLC, Port Matilda, PA, USA.