UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DEL USO DE NIRS PARA LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA CRUDA EN MUESTRAS DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL

por

Belén ARTAGAVEYTIA TRABAL

Mateo ZABALA MARTÍNEZ

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2021

Tesis aprobada por:

Director: …….

Ing. Agr. PhD. Martín Jaurena

…….

Ing. Agr. PhD. Martín Durante

…….

Ing. Agr. PhD. Pablo Boggiano

…….

Ing. Agr. PhD. Álvaro Simeone

…….

DMV. PhD. Gilberto Kozloski

Fecha: 29 de abril de 2021

Autores: …….

Belén Artagaveytia Trabal

…….

Mateo Zabala Martínez

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres por darnos la oportunidad de poder estudiar una carrera como esta.

A nuestros familiares y amigos que nos apoyaron a lo largo del proceso.

A nuestros tutores Ing. Agr. PhD. Martín Jaurena y Ing. Agr. PhD. Martín Durante, por el apoyo y la dedicación de su tiempo para lograr realizar este trabajo.

A DMV. Carlos Schild, Ing. Agr. Laura Núñez, Zoot. Luciana Marín y Zoot. Marlon Risso por proporcionarnos amablemente las muestras de forraje de campo natural para la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de poder realizar este trabajo con su apoyo e instalaciones.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN....II
AGRADECIMIENTOS....III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES....VI
1. INTRODUCCIÓN....1
1.1. OBJETIVOS....2
1.1.1 Objetivo general....2
1.1.2 Objetivos específicos....2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA....3
2.1 PROTEÍNA....3
2.1.1 Proteína cruda....3
2.1.2 Proteína en producción animal....4
2.1.2.1 Requerimientos animales....5
2.1.2.2 Efecto del contenido de PC en el consumo....6
2.1.3 Concentración de PC en los forrajes....7
2.1.3.1 Concentración de PC en campo natural....11
2.2. DETERMINACIÓN Y PREDICCIÓN DE NITRÓGENO/PC EN FORRAJES....14
2.2.1 Metodologías actuales....14
2.2.2 Espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS)....15
2.2.2.1 Descripción y bases del funcionamiento....15
2.2.2.2 Antecedentes....17
2.3. HIPÓTESIS....19
3. MATERIALES Y MÉTODOS....20
3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL....20
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS....20
3.3 ANÁLISIS DE REFERENCIA....21
3.4 NIRS....22
3.5 PREDICCIÓN....22
3.6 CALIBRACIÓN....23
4. RESULTADOS....26

4.1 COMPARACIÓN KJELDAHL-DUMAS 26
4.2 PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE PC CON LOS MODELOS DISPONIBLES 27
4.3 CALIBRACIÓN 30
4.3.1 Validación independiente 35
4.3.2 Selección de bandas 39
5. DISCUSIÓN 42
5.1 KJELDAHL-DUMAS 42
5.2 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS PREEXISTENTES 42
5.4 BANDAS 44
5.5 CONSIDERACIONES PRÁCTICAS Y SUGERENCIAS 45
6. CONCLUSIONES 48
7. RESUMEN 49
8. SUMMARY 50
9. BIBLIOGRAFÍA 51
10. ANEXOS 63

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No. Página

1. Contenido de proteína cruda (PC, % base MS) del forraje de campo natural en distintos grupos de suelos del país. 12

2. Resumen de antecedentes del uso de NIRS para estimación de PC en forrajes. 18

3. Valores de N por los métodos de Kjeldahl y Dumas, la relación entre ambas medidas.....26

4.Estadísticos de la predicción de los modelos de Gramíneas, Forrajeras y el modelo precargado del equipo Perten para forrajes en términos absolutos. 28

5. Estadísticos de la predicción de los modelos de Gramíneas, Forrajeras y el modelo precargado del equipo Perten para forrajes en términos relativos.....28

6. Estadísticos de la predicción de los modelos calibrados en términos absolutos.....31

7. Estadísticos de la predicción de los modelos calibrados en términos relativos. 31

8. Estadísticos de la predicción de los modelos con validación independiente en términos absolutos. 37

9. Estadísticos de la predicción de los modelos con validación independiente en términos relativos. 37

10. Bandas en nm relevantes seleccionadas por todas las muestras disponibles y los modelos generados. 41

Figura No.

1. Diagrama contrastando los sistemas de Weende y Van Soest 4

2. Rangos de concentración de energía metabolizable (EM), proteína bruta (PB), calcio y fósforo mínimos requeridos en la dieta por bovinos con distinto nivel de producción 6

3. Concentración de PC en pastos templados y tropicales y leguminosas 7

4. Variación de la concentración de N (%N) en relación a la masa de forraje durante un crecimiento de *Festuca arundinacea* Schreb. bajo diferentes niveles de fertilizante nitrogenado aplicado 8

5. Fotosíntesis aparente según la concentración de N orgánico (%MS) para tres especies de gramíneas (Poaceae Barnhart.): *Panicum maximum* Jacq. (C4), *Panicum milioides* Nees ex Trin. (C3), *Festuca arundinacea* Schreb. (C3).....9

6. Concentración de proteína cruda (%) promedio (línea), rango (área), y desvío estándar (barras) de muestras de forraje de campo natural en cada estación del año 11

7. Recuperación esperada de las principales fracciones de nitrógeno en tejidos vegetales para métodos analíticos seleccionados para la determinación de N 14

8. Bandas de absorción en la región NIR 16

9. Espectro de una muestra de cereal molido (línea superior) y los picos de absorción que lo constituyen 17

10. Histogramas de la concentración de proteína cruda en los cuatros grupos de muestras de forraje (como porcentaje de la MS) 21

11. Derivada segunda del log (1/R) y suavizado mediante Savitzky-Golay y normalización por SNV (varianza normal estándar) de las muestras analizadas en el equipo Perten para la calibración de los modelos 24

12. Relación entre la concentración de N determinada por los métodos de Kjeldahl (eje x) y Dumas (eje y) 26

13. Predicción de los modelos de Gramíneas, Forrajeras y el modelo precargado del equipo Perten para forrajes 27

14. Error y sesgo de las predicciones de los modelos disponibles por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra 29

15. Error y sesgo relativos de las predicciones de los modelos disponibles por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra 30

16. Ajuste de la calibración con validación cruzada (sup.) y predicción (inf.) de los modelos generados 32

17. Error y sesgo de las predicciones de los modelos calibrados por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra 33

18. Error y sesgo relativos de las predicciones de los modelos calibrados por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra 34

19. Error relativo de predicción, como porcentaje, en función del valor de PC de referencia 35

20. Relación entre el contenido de proteína cruda estimado por Dumas y predicho por los modelos basados en NIRS. 36

21. Error y sesgo de las predicciones de los modelos calibrados independientes por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra 38

22. Error y sesgo relativos de las predicciones de los modelos calibrados independientes por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra 39

23. Bandas seleccionadas mediante regresión Stepwise considerando todas las muestras disponibles y para los modelos generados 40

1. INTRODUCCIÓN

El campo natural uruguayo forma parte del bioma pampa, una de las regiones de pastizales naturales más extensas del mundo, que incluye también a áreas del Sur de Brasil y parte de Argentina. Es un recurso altamente biodiverso, tanto a nivel de especies vegetales como también de animales. Constituye la base forrajera de la ganadería de Uruguay, y con un manejo adecuado es posible combinar en un mismo sistema la conservación de la biodiversidad y la actividad económica bajo la forma de la producción agropecuaria (carne, lana y cueros).

A nivel productivo, los campos naturales se destacan por su resiliencia frente a la variabilidad climática. Sin embargo, a veces este recurso es desestimado, ya que puede ser de menor producción y calidad nutricional que otras alternativas forrajeras. En los últimos años el área de campo natural ha ido disminuyendo a medida que otras actividades productivas, como la agricultura y la forestación, han avanzado en vista de una mejor rentabilidad (Baeza y Paruelo, 2020). En general las áreas de campo natural restantes corresponden a suelos de menor aptitud productiva (con menor capacidad de almacenaje de agua y fertilidad natural).

Para poder mantener este recurso, se debe optimizar su explotación y evitar su degradación, para lo cual es necesario un manejo de precisión para mejorar el resultado económico y conservación de los servicios ecosistémicos. Uno de los aspectos básicos del manejo de sistemas ganaderos basados en campo natural es ajustar la carga animal para optimizar el consumo de forraje de los animales. Luego, entra en juego la calidad del forraje y con ella el contenido de proteína cruda (PC), que puede ser una de sus limitantes productivas más importantes. La proteína es requerida en mayor proporción por categorías en crecimiento y también juega un papel importante en el consumo por parte de los animales. Es por esto que conocer el contenido de PC es clave para la toma de decisiones para: i) definir el manejo del pastoreo, ii) determinar necesidades de fertilización, iii) asignar potreros a diferentes categorías animales, iv) diseñar estrategias de suplementación eficientes, y vi) planificar ganancias de los animales, entre otras actividades.

Actualmente las metodologías tradicionales para estimar PC en forrajes son costosas, llevan bastante tiempo y pueden llegar a ser riesgosas, ya que el análisis de referencia (método Kjeldahl) implica la manipulación de químicos que pueden ser nocivos para el operador. Por lo tanto, en este trabajo se plantea evaluar la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS) para estimar la concentración de proteína cruda del forraje del campo natural.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el uso de la espectroscopía en el infrarrojo cercano para la estimación de la concentración de proteína cruda en muestras de forraje de campo natural.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la viabilidad de utilizar el método Dumas como método de referencia para la estimación de la concentración de PC en muestras de forraje de campo natural, como alternativa al método tradicional de Kjeldahl.
2. Evaluar el ajuste de predicción de la concentración de PC de forraje de campo natural en dos equipos NIRS.
3. Calibrar y validar un modelo de estimación de la concentración de proteína cruda, a partir de información espectral NIR, específico para muestras de forraje de campo natural.
4. Identificar las bandas de absorción del espectro electromagnético más relevantes para la predicción del contenido de proteína cruda de forraje de campo natural.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÍNA

2.1.1 Proteína cruda

La proteína cruda (PC), también llamada proteína bruta (PB), representa un estimador del contenido proteico de los alimentos. Es una de las fracciones estimadas a partir del Sistema de Análisis Proximal de Weende (Hennberg y Stohmann, 1859), el cual se caracteriza por identificar en forma conjunta compuestos con características químicas comunes de solubilidad o insolubilidad frente a distintos reactivos: proteína cruda, extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno, fibra cruda y cenizas (Figura 1). Para superar las limitaciones que el sistema de Weende presentaba para valorar nutricionalmente a la fibra, Van Soest et al. (1991) desarrollaron un sistema de detergentes que divide a los componentes de los alimentos en 3 fracciones: i) contenido celular y pectinas (proteínas, lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pectinas), ii) fibra detergente neutra (pared celular) y iii) fibra detergente ácida (celulosa, lignina, sílice y nitrógeno no proteico).

Para la cuantificación de la proteína cruda se multiplica el contenido de nitrógeno por el factor 6.25, dado que los aminoácidos contienen en promedio 16% de N (CSIRO, 2007). Sin embargo, las asunciones que se consideran para esta determinación presentan limitaciones. En primer lugar, no todo el N se encuentra en forma de proteína; en forrajes frescos y ensilados, tan solo 60-80% es proteína verdadera, mientras que el restante es N no proteico (NNP) y N no disponible (Van Soest, 1994). En segundo lugar, no todas las proteínas contienen 16% de nitrógeno, pudiendo variar entre 15 y 19% (Crampton y Harris, 1974). Sin embargo, debe considerarse que en la estimación de los requerimientos proteicos de los animales el cálculo de la proteína está hecho partiendo de este supuesto, y que es una convención generalmente aceptada a nivel internacional. También debe tenerse en cuenta que el NNP tiene valor nutricional para los rumiantes, ya que es incorporado a la proteína microbiana que es sintetizada en el rumen (CSIRO, 2007).

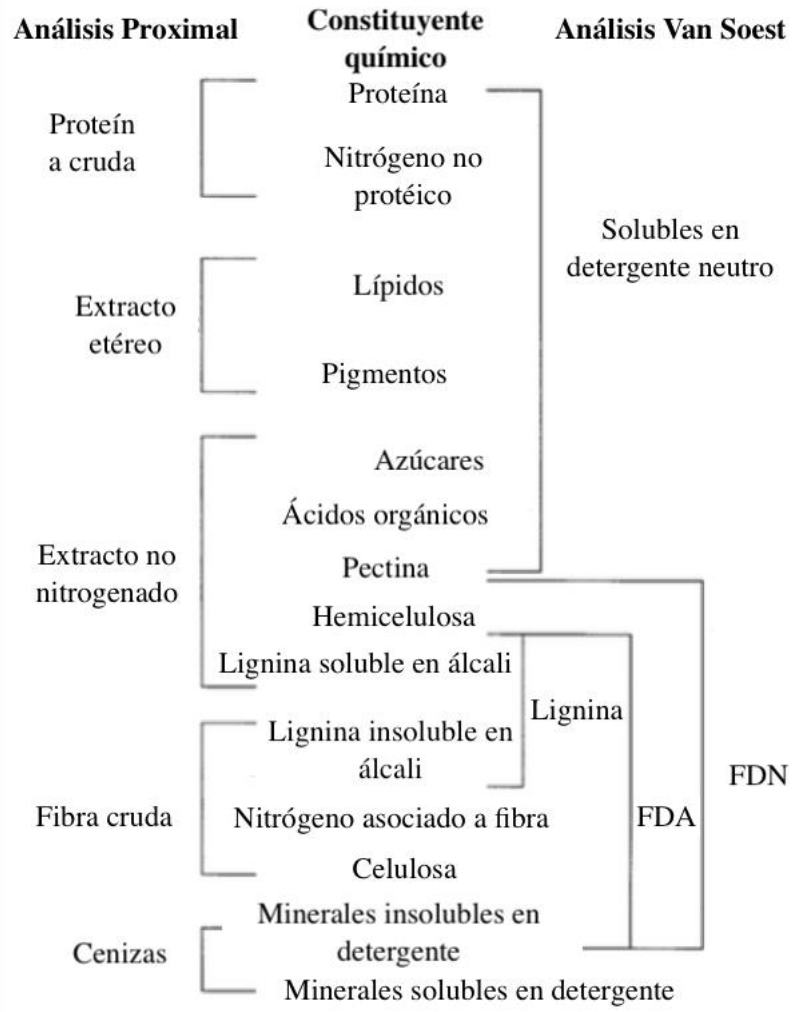


Figura 1. Diagrama contrastando los sistemas de Weende y Van Soest

Fuente: adaptado de Fisher et al. (1995).

2.1.2 <u>Proteína en producción animal</u>

La calidad del forraje depende de los atributos físico-químicos de las plantas, y de las capacidades de ingestión, digestión y utilización de nutrientes de los animales en pastoreo (Illius y Allen, 1994). Según Mott (1973) el desempeño animal es el mejor indicador de la calidad de un forraje. El análisis de los componentes químicos de los forrajes puede proveer información bioquímica importante que lleve a un mejor entendimiento de los factores que limitan la respuesta de los animales (Mertens, 1994). El consumo junto con el valor nutritivo y la eficiencia de utilización de un alimento son los principales determinantes del desempeño animal (Van Soest 1994, Sollenberger y Cherney 1995). Por lo tanto, resultaría deseable medir aquellas características del forraje

que estén más estrechamente relacionadas con el consumo y digestibilidad, como lo son los contenidos de fibra, lignina y proteína (Cherney y Mertens, 1998). Generalmente el valor nutritivo de los alimentos se estima en base a su concentración de energía metabolizable (EM) y de PC (Lemaire y Bélanger, 2020).

Estudios han demostrado que la producción de rumiantes a partir de forrajes puede estar limitada por una deficiencia de proteína (Minson 1990, Berretta 1996). Bajos contenidos de PC en la pastura reducen la tasa de crecimiento de las categorías más jóvenes, y también extienden el tiempo en que alcanzan la pubertad y logran la primera preñez. En animales maduros la deficiencia de proteína puede afectar negativamente el desempeño reproductivo y la producción de leche (Hennessy 1983, Lee et al. 1985, CSIRO 2007).

2.1.2.1 Requerimientos animales

La proteína es un componente estructural de los tejidos de los animales, y actúa en procesos metabólicos bajo la forma de enzimas. Es necesaria para el mantenimiento de estos tejidos y para la producción de leche, músculo, lana y pelo. Por lo tanto, se necesita un mayor aporte de PC si se trata de animales en crecimiento, y según el nivel de producción (Figura 2). En el caso de los rumiantes, los aminoácidos necesarios se obtienen en parte directamente del alimento (proteína no degradada en rumen, PNDR), pero en la mayoría de las situaciones el aporte es mayormente por la producción de PC microbiana (PCM) que ingresa al intestino delgado, siendo esta función directa del consumo de EM fermentable (CSIRO, 2007). Entonces para optimizar la producción animal, es necesario un equilibrio entre nitrógeno y energía dentro del rumen. Poppi et al. (1997) determinaron relaciones de 37,6, 41,8 y 46,0 g PCM/Mcal de EM fermentable para ganado en mantenimiento, en crecimiento, y en lactación, respectivamente.

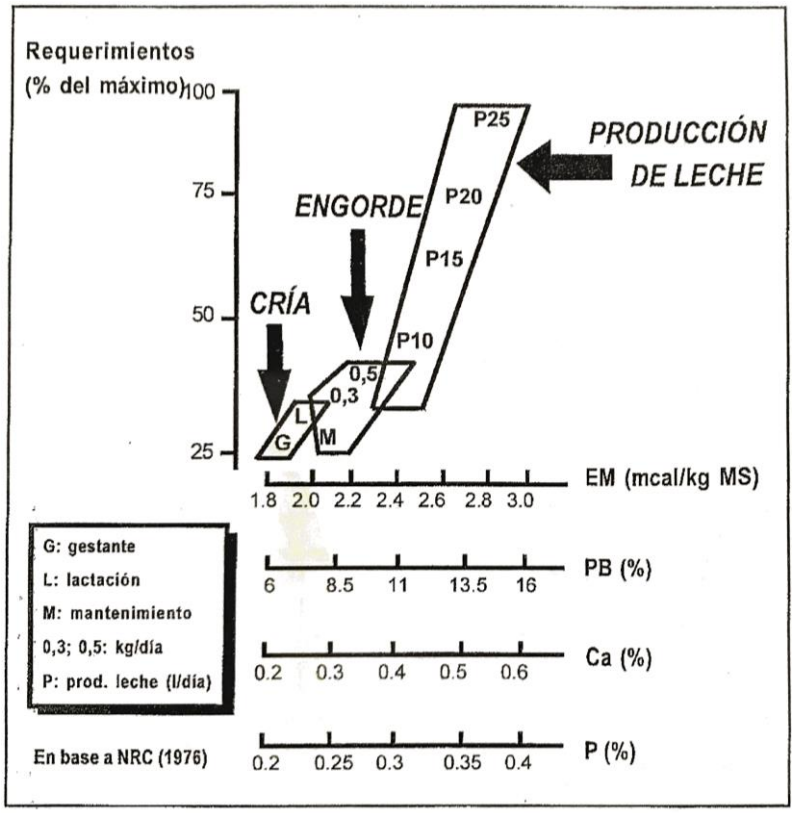


Figura 2. Rangos de concentración de energía metabolizable (EM), proteína bruta (PB), calcio y fósforo mínimos requeridos en la dieta por bovinos con distinto nivel de producción

Fuente: tomado de Simeone y Beretta (2002).

2.1.2.2 Efecto del contenido de PC en el consumo

Existen varios factores que afectan el consumo animal que deben considerarse en su conjunto y dentro de un contexto, dado que están en constante interacción. En pastoreo, el consumo depende de características de los animales, propiedades de la pastura, y otros factores que incluyen a las condiciones del ambiente y de manejo (Poppi et al. 1987, Fisher 2002, Rovira 2008). Existe una relación positiva del consumo con la accesibilidad y aceptabilidad del forraje, y negativa con la cantidad de tiempo que el forraje es retenido en el retículo-rumen (Sollenberger y Cherney, 1995). De la variación en la ingesta de energía digestible (ED), 60% a 90% está relacionada a diferencias en el consumo de alimento (Crampton et al. 1960, Reid 1961, Mertens 1994). Frecuentemente, el consumo se ve deprimido cuando el contenido de PC de la dieta es menor a 6-8% de la MS, que corresponde a los niveles requeridos por los microorganismos del rumen. Aportes insuficientes de este y otros nutrientes pueden reducir o inhibir la fermentación microbiana, aumentando el tiempo que el alimento permanece en el rumen (Blaxter y

Wilson 1962, Minson y Milford 1967, Minson 1990, Mertens 1994, Poppi y McLennan 1995, CSIRO 2007). Colateralmente, una deficiencia proteica en la dieta puede llevar a un déficit energético en el animal a través de una reducción de la ingesta (Poppi y McLennan 1995, Rovira 2008). Debe tenerse en cuenta que, factores nutricionales, como la concentración de PC, afectan el consumo cuando la capacidad de cosecha del animal no está limitada por factores no nutricionales, como la asignación y/o accesibilidad del forraje (Poppi et al., 1987).

2.1.3 Concentración de PC en los forrajes

Existe una gran variabilidad en el contenido de proteína cruda de los forrajes, y ésta depende fundamentalmente de la masa de forraje acumulada, la nutrición mineral de las plantas y la especie en cuestión (Lemaire y Bélanger, 2020). Según información presentada por Minson (1990), el valor medio de PC en forrajes frescos es de 14,2% de la MS, dentro de un rango de 3% a 27% (Figura 3).

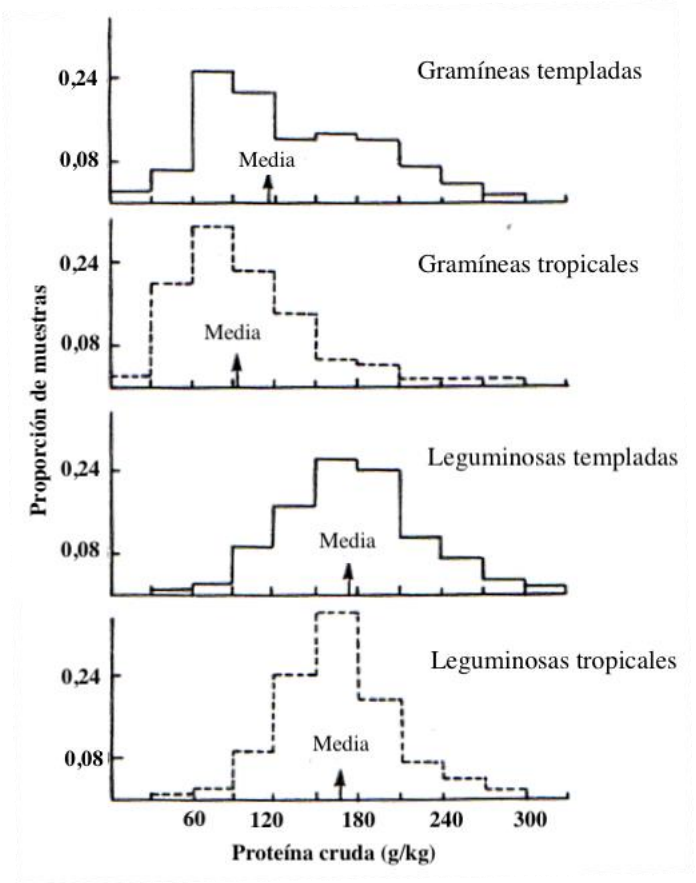
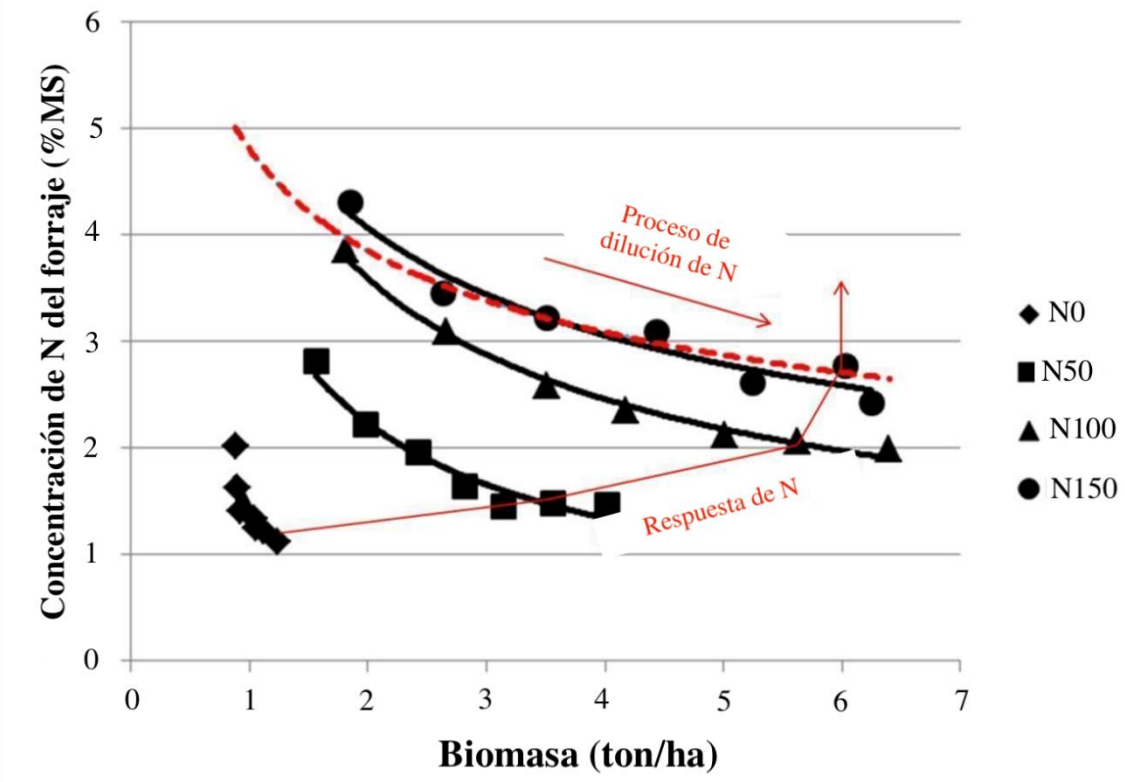


Figura 3. Concentración de PC en pastos templados y tropicales y leguminosas

Fuente: adaptado de Minson (1990).

En general, las especies con metabolismo C_3 (como leguminosas y gramíneas templadas) presentan mayores concentraciones de PC que las especies C_4 (gramíneas tropicales). En el caso de las leguminosas el contenido de PC es mayor debido a su capacidad de fijar N_2 atmosférico lo cual mejora su nivel de nutrición nitrogenada, mientras que las gramíneas están limitadas únicamente al N disponible en la solución del suelo (Minson, 1990).

La concentración de N en planta es un indicador de su estado nutricional y existen valores críticos necesarios para obtener el máximo crecimiento del forraje. Estos valores varían entre especies y disminuyen a medida que se acumula biomasa (efecto de dilución, Figura 4). Bajo condiciones de aporte de N limitante, tanto el %N como la cantidad de biomasa acumulada son reducidos, y el efecto de dilución se ve más marcado. Si el aporte de N no es limitante, el %N en planta puede aumentar como acumulación "de lujo" sin efecto en el crecimiento (Greenwood et al. 1990, Lemaire y Bélanger 2020).

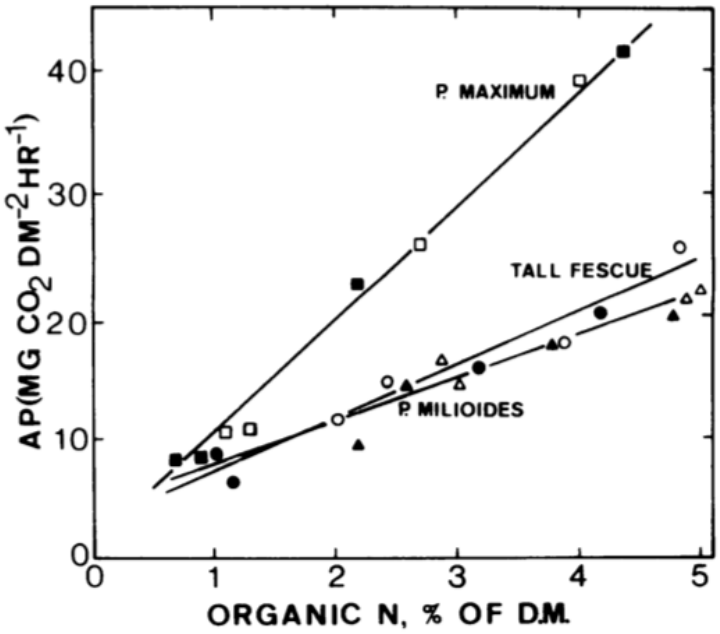


Referencia: la línea roja punteada representa la curva crítica de dilución de N ($\%N=4{,}8W^{-0{,}32}$), correspondiente al %N mínimo para alcanzar la máxima masa de forraje.

Figura 4. Variación de la concentración de N (%N) en relación a la masa de forraje durante un crecimiento de *Festuca arundinacea* Schreb. bajo diferentes niveles de fertilizante nitrogenado aplicado

Fuente: adaptado de Lemaire y Denoix por Lemaire y Bélanger (2020).

En el trabajo de Greenwood et al. (1990), se reportó que la disminución en la concentración de N con la acumulación de forraje fue igual para C_3 y C_4 en términos relativos. Sin embargo, las plantas de tipo C_4 contenían sólo el 72% del nitrógeno relativo a las C_3 a niveles equivalentes de acumulación de materia seca. Por cada unidad de radiación interceptada se produjo aproximadamente un 32% más de materia seca en especies C_4 que en C_3, con lo que finalmente la absorción de N por unidad de radiación interceptada fue aproximadamente la misma en ambos tipos funcionales. Es decir, las especies C_4 presentan menos N en sus tejidos, pero son más eficientes en el uso del mismo (Bolton y Brown, 1980, Figura 5).



Referencia: donde eje Y es fotosíntesis aparente (MG CO_2 MS^{-2} HR^{-1}); eje X es nitrógeno orgánico (% de MS)

Figura 5. Fotosíntesis aparente según la concentración de N orgánico (%MS) para tres especies de gramíneas (Poaceae Barnhart.): *Panicum maximum* Jacq. (C4*), Panicum milioides* Nees ex Trin. (C3), *Festuca arundinacea* Schreb. (C3)

Fuente: Bolton y Brown (1980).

Caloin y Yu (1984) plantearon que el efecto de dilución podría ser resultado del tamaño relativo de dos componentes con contenidos constantes de N: un “componente metabólico” de tejidos vegetales asociados a la fotosíntesis y procesos de crecimiento con alta concentración de N, y un “componente estructural” de tejidos asociados a la arquitectura de la planta y conductividad hidráulica con baja concentración de N (Lemaire y Gastal 1997, Lemaire y Bélanger 2020). Este modelo alométrico fue generalizado por

Lemaire y Gastal (1997), según quienes el componente metabólico es un concepto teórico y no necesariamente identificado como un componente morfológico o histológico. Sin embargo, podría asumirse que representa la masa de tejidos fotosintéticamente activos y que las diferentes concentraciones máximas de N metabólico para C_3 y C_4 (6,5% y 4,8%, respectivamente) reflejan las diferencias de concentración de Rubisco en el parénquima fotosintético entre ambos tipos de especies. Mediciones realizadas por Dengler et al. (1994) demuestran que la distancia entre venas es menor en C_4 que en C_3, y también que sus hojas son más finas, resultando en una menor proporción de tejidos metabólicos. Por lo tanto, las diferencias en la concentración de N en la biomasa serían resultado de diferencias en la concentración de N en el componente metabólico y la proporción de los componentes.

Siguiendo este razonamiento también se pueden explicar las diferencias que existen entre componentes u órganos de una misma planta, por ejemplo: las hojas, principal órgano fotosintético, tienen mayor concentración de PC que los tallos (Minson, 1990). También existen diferencias asociadas a la edad (Heitschmidt et al., 1982): una hoja recién expandida tiene mayor concentración de PC que una vieja, dado que en las primeras etapas de crecimiento gran parte de los tejidos presentan actividad metabólica y el N de las enzimas se encuentran distribuidos en toda la hoja. A medida que crece, el componente metabólico se limita a la parte más superficial (Greenwood et al., 1990).

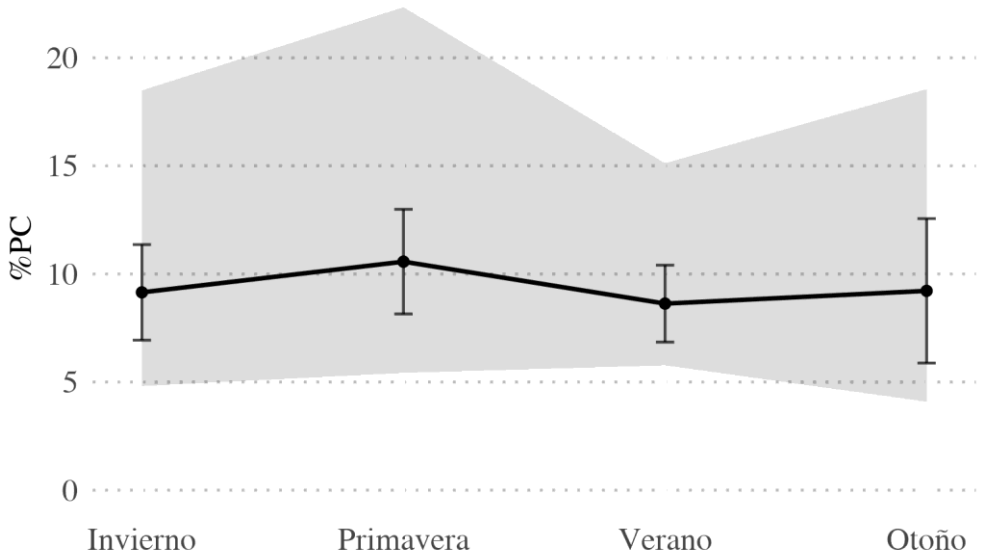
Al acumularse forraje, la canopia de la pastura se hace más densa y las plantas deben generar hojas más grandes y erectas para competir por luz. Estos cambios en la arquitectura de las plantas derivan en un progresivo aumento de los tejidos estructurales necesarios para sostener hojas más altas. A medida que se acumulan hojas de mayor tamaño, la acumulación de componentes estructurales es más rápida que la del componente metabólico asociado al área foliar. La relación de área foliar, que corresponde a la masa por unidad de área de hoja, presenta una relación lineal con la concentración de N, dado que ambos disminuyen de forma similar con la acumulación de biomasa (Ballaré et al. 1997, Lemaire y Gastal 1997, Lemaire y Bélanger 2020). Duru et al. (1997) demostraron que esta relación se mantiene también para pasturas biodiversas con plantas de diferentes morfologías, como podría ser el campo natural.

Debe tenerse en cuenta que el N es un nutriente móvil en planta y que existe un ciclaje interno del mismo. Entonces, además del efecto de dilución que acompaña el crecimiento, parte del N de las hojas viejas y senescentes es movilizado y trascolado a las partes en crecimiento de mayor actividad metabólica, como hojas jóvenes o en expansión (Oertli et al. 1966, Simpson et al. 1982, Li et al. 1992). La teoría de dilución de nitrógeno mencionada hasta el momento refiere a la masa de forraje verde, sin embargo, en situaciones productivas el forraje disponible es consecuencia de un equilibrio dinámico entre crecimiento, senescencia y consumo del forraje (especialmente de los estratos superiores de la pastura), donde una parte variable de la biomasa corresponde a restos secos con muy bajo contenido de PC. Por lo tanto, además de la biomasa acumulada, el

estado de madurez del forraje y la proporción de restos secos son otros factores de gran importancia que definen la concentración de N del total de la biomasa disponible en la pastura (Heitschmidt et al. 1982, Formoso y Allegri 1983a, Olmos 1992, Duru et al. 1997).

2.1.3.1 Concentración de PC en campo natural

En comparación con forrajes de especies forrajeras domesticadas, en general el campo natural uruguayo presenta valores inferiores de proteína cruda, pueden estar entorno a un 10% promedio (base seca), aunque con una gran variabilidad (Pigurina et al. 1991, Mieres et al. 2004). Existe una importante variación a escala temporal, asociada a los cambios estacionales y la variabilidad interanual (Figura 6 y Cuadro 1), y espacial (Cuadro 1, Carámbula 1991). También existe variación por factores de manejo (Olmos 1992, Ayala y Bermúdez 2005, Bermúdez y Ayala 2005, Berreta 2005, Saldanha 2005, Madeira et al. 2018).



Referencia: el número de observaciones fue de 384, 219, 145, 185, , para invierno, primavera, verano y otoño, respectivamente.

Figura 6. Concentración de proteína cruda (%) promedio (línea), rango (área), y desvío estándar (barras) de muestras de forraje de campo natural en cada estación del año

Fuente: elaborado en base a Mieres et al. (2004).

Los campos naturales presentan una gran diversidad de especies, predominando las gramíneas, particularmente las estivales (C_4). No se encuentran muchas leguminosas, asociado a las bajas disponibilidades de P de los suelos, y existe una gran variedad de especies de hierbas enanas y subarbustivas pertenecientes a diversas familias (Carámbula, 1991). Según Berretta et al. (1990), las gramíneas invernales (principalmente C_3)

presentan en promedio los mayores valores de PC, que son máximos en otoño e invierno y comienzan a descender en primavera. Las gramíneas estivales (C_4) presentan valores promedio menores a las invernales, con un máximo en primavera y un descenso en verano. Por ejemplo, el contenido de proteína cruda promedio de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees y *Stipa setigera* J.Presl, fue próximo a 12,8% y 11,0% respectivamente. En el caso de estivales, la concentración promedio de PC para *Paspalum notatum* Flüggé fue alrededor de 10,4%, y para *Bothriochloa laguroides* (DC.) Herter, alrededor de 9%. Los valores pueden ser incluso más bajos, ya que especies que forman maciegas como *Paspalum quadrifarium* Lam., presentan valores de PC en torno a 3,4% cuando se considera la planta entera debido a la gran acumulación de forraje seco (Pigurina et al., 1991).

Las contribuciones relativas de cada grupo de especies a la biomasa, en un determinado campo es principalmente función de los suelos sobre los cuales se desarrollan. Las mayores variaciones se dan entre las formaciones geológicas sobre las que se generan los suelos, y a escala de paisaje dependen del drenaje y la topografía (Carámbula, 1991). Por ejemplo, para distintos suelos de la zona noreste, el porcentaje de PC en suelos arenosos varía entre 7-10%, mientras que en los brunosoles varía entre 10-15%, (Allegri 1979, Formoso y Allegri 1983b, De Souza 1985, Olmos 1992). En general, los niveles de PC en campo natural tienden a ser máximos en invierno y primavera, y mínimos en verano (Berretta et al., 1990). Sin embargo, existen excepciones, por ejemplo, según Formoso (2005) para campos de cristalino, la concentración de PC de la pastura es mínima en invierno debido a la baja contribución de especies de crecimiento invernal.

Cuadro 1. Contenido de proteína cruda (PC, % base MS) del forraje de campo natural en distintas formaciones geológicas del país

Material geológico	**Verano**	**Otoño**	**Invierno**	**Primavera**
Cristalino	7,2±0,05(2)	13,2±11,0(20)	6,6±4,9(21)	15,6±12,3(20)
Basalto superficial	3,9±1,8(7)	10,0±4,3(6)	6,5±3,1(9)	10,7±3,2(8)
Basalto profundo	9,6±7,6(4)	13,9±7,8(3)	8,8±3,9(5)	13,0±2,4(5)
Areniscas Tacuarembó Devónico Cretácico	12,6±10,6(5)	11,0±6,0(5)	4,2±2,3(6)	8,5±3,8(5)

Fray Bentos				
Pampeano				
Libertad	14,6±9,4(5)	21,7±10,6(6)	6,9±5,2(5)	15,1±11,9(6)
F. Muerto				
Cuaternario				
Yaguarí	13,8±9,7(4)	17,0±10,8(5)	9,5±1,2(3)	18,4±5,7(4)
Aluviones modernos	11,2±5,3(6)	3,8±2,5(6)	3,8±3,1(6)	6,1±1,9(6)

Referencia: promedio ± desvío estándar (número de observaciones).

Fuente: adaptado de De Souza por Carámbula (1991).

La frecuencia e intensidad de defoliación de la pastura también tiene importantes efectos sobre la calidad y cantidad de forraje, por medio de efectos directos sobre el crecimiento del forraje, la acumulación de restos secos, y la composición botánica (Olmos 1992, Ayala y Bermúdez 2005, Bermúdez y Ayala 2005, Berreta 2005, Saldanha 2005). El descenso en el %PC por demora en el pastoreo está directamente relacionada a la tasa diaria de crecimiento y acumulación de forraje, y es consecuencia de los cambios en la composición de los tejidos de la planta discutidos anteriormente (alometría, Lemaire y Bélanger, 2020). Por ejemplo, según datos de Pigurina et al. (1991), una muestra de planta entera de *Panicum prionitis* Nees en madurez presentó 5,3% PC, mientras que el rebrote vegetativo post-pastoreo de la misma especie tuvo 9,2%, y si fue quemado y pastoreado fue 15,0%. Además, la relación de forraje verde/forraje seco es resultado de la presión de pastoreo, y presenta también variación estacional y entre años (Olmos, 1992). Además, existe respuesta positiva a la fertilización con N, y en combinación con P, sobre el contenido de proteína y el crecimiento al mejorar el estatus nutricional de las plantas (Allegri 1979, Bermúdez y Ayala 2005, Madeira et al. 2018).

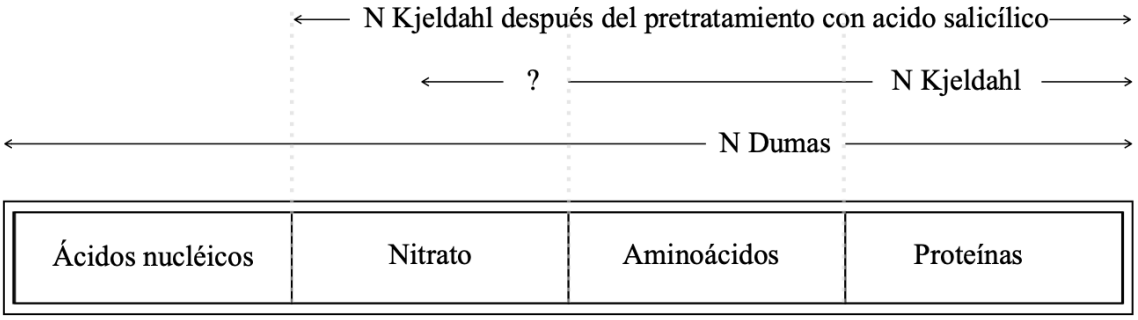
Otro punto a tener en cuenta es que los animales en pastoreo tienen la oportunidad de seleccionar su dieta, habiendo muchos factores en interacción (Arnold, 1964). Montossi et al. (2000) observaron que el componente de mayor importancia relativa de la dieta de ovinos y vacunos es la hoja verde de gramíneas. Se ha demostrado que cuando hay hoja verde disponible el ganado come muy poco forraje seco (Chacon y Stobbs 1976, Hendricksen y Minson 1980). El material muerto es rechazado debido a su baja preferencia y a su inaccesibilidad en la base de la pastura (Poppi et al. 1987, Vallentine 1990), y la mayor facilidad de aprehensión del forraje verde. Además, las hojas verdes tienen estructuras menos rígidas y de mayor facilidad de ruptura que los tallos (Poppi et al., 1987). Según datos de Piaggio et al. (1995), para un sistema de pastoreo rotativo de campo natural mejorado, el contenido de PC de la dieta fue consistentemente mayor al de la pastura ofrecida. Sin embargo, la mayor variación de PC en la dieta está relacionada más a la variación estacional de PC en el forraje que en la selectividad.

2.2. DETERMINACIÓN Y PREDICCIÓN DE NITRÓGENO/PC EN FORRAJES

2.2.1 Metodologías actuales

Para la estimación del contenido de proteína cruda la técnica analítica estándar es la de Kjeldahl (AOAC, 1984), que determina el contenido de N orgánico y amonio (NH_4^+). Consiste en una digestión de la muestra, donde la mayor parte del N pasa a amonio, que luego es cuantificado. Esta técnica presenta desventajas desde el punto de vista de los costos, la seguridad laboral (por los reactivos y catalizadores que requiere y por la formación de vapores), el tiempo (es relativamente lento) y la contaminación ambiental (por los desechos generados, Simonne et al. 1995, Simonne et al. 1997, Müller 2017).

Otro método que se utiliza cada vez con más frecuencia en análisis de rutina es el método Dumas (AOAC, 2005), que sí determina el nitrógeno total (Etheridge et al. 1998, Crosland et al. 2001, Müller 2017). Se basa en la combustión de la muestra donde todo el N se reduce a N_2, que es cuantificado mediante conductividad termal. Dentro de las ventajas de esta técnica está el reducido tamaño de muestra necesaria (0,1-0,2 g), que es bastante rápido (unos minutos por muestra) y de una precisión y exactitud superiores a Kjeldahl (Schmitter y Rihs 1989, Simonne et al. 1995). Los instrumentos de análisis elemental usados en esta técnica se han vuelto más accesibles en cuanto a su costo, y presentan menores preocupaciones en cuanto al uso de químicos y los desechos que los métodos tradicionales (Cherney, 2000).



Referencia: el tamaño de las celdas no es proporcional al contenido promedio de las fracciones.

Figura 7. Recuperación esperada de las principales fracciones de nitrógeno en tejidos vegetales para métodos analíticos seleccionados para la determinación de N

Fuente: adaptado de Simonne et al. (1997).

Dado que Kjeldahl no cuantifica el N total y Dumas sí, pueden esperarse diferencias en la estimación de PC según el método utilizado y el contenido de N inorgánico (como nitritos y nitratos) de la muestra (Figura 7). En general, en materiales vegetales el proceso de combustión del método Dumas devuelve valores de N levemente mayores que con la técnica Kjeldahl. Por lo tanto, en muchos casos cuando se mide el

contenido de N por Dumas será necesario corregirlos para compararlos con valores obtenidos con Kjeldahl y así evitar sobreestimaciones, por ejemplo, al trabajar con sistemas de alimentación donde los valores de los modelos son basados en Kjeldahl (Simonne et al. 1995, Etheridge et al. 1998, CSIRO 2007, Müller 2017).

Según Simonne et al. (1997), si la relación N-Kjeldahl:N-Dumas es mayor a 0,90, Dumas puede reemplazar a Kjeldahl para la estimación de PC sin problemas. Simonne et al. (1995) encontraron que para muestras de forraje de *Agrostis palustris* Huds. cv. Penncross y *Cynodon dactylon* L., en un rango de 2,6-6,6 %N, la relación media fue de 0,92 (CV = 9%). También generaron un modelo de regresión para estimar N Kjeldahl a partir de estimaciones por Dumas, que es el siguiente: N-Kjeldahl = 0,41 + 0,83 N-Dumas. Por otro lado, Crosland et al. (2001), Reussi et al. (2008) no encontraron diferencias en la cantidad recuperada de N entre métodos, pero sí una precisión superior de Dumas en base a un menor CV (%), para muestras de forraje y planta de trigo, respectivamente.

2.2.2 Espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS)

2.2.2.1 Descripción y bases del funcionamiento

La espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS por sus siglas en inglés) es un método simple, rápido, seguro y de bajo costo operativo para evaluar el valor nutritivo de alimentos. Cuando se cuenta con una calibración adecuada el NIRS es un método muy preciso. Presenta ventajas sobre los métodos químicos ya que no es destructivo, no genera desechos, y requiere muestras de pequeño tamaño (Smith y Flinn 1991, Deaville y Flinn 2000). La muestra entera es caracterizada en términos de sus propiedades de absorción en la región NIR (800 a 2500 nm, Figura 8). En lugar de separar submuestras para ser tratadas con reactivos químicos para aislar ciertos componentes, con una misma muestra se pueden realizar varios análisis si se dispone de las calibraciones (Smith y Flinn 1991, Murra 1993, Alomar y Fuchslocher 1998, Deaville y Flinn 2000, Osborne 2006). Además, en general el nivel de error de los datos ópticos es menor al de los de referencia (Murray 1993, Williams 2001).

Su funcionamiento se basa en las interacciones de la radiación electromagnética con la materia de la muestra (Deaville y Flinn, 2000). Los enlaces covalentes de sustancias orgánicas absorben radiación infrarroja incidente y vibran a una frecuencia específica fundamental (Murray 1993, Kokaly y Clark 1999), y de acuerdo con la ley de Beer-Lambert existe una proporcionalidad entre la absorbancia en estas frecuencias y la concentración de una sustancia (Murray 1993, Shenk y Westerhaus 1994). También se generan sobretonos armónicos, que son vibraciones en longitudes de onda que son fracción de la frecuencia fundamental, aunque de menor intensidad (Murray 1993, Shenk y Westerhaus 1994, Alomar y Fuchslocher 1998, Osborne 2006). Normalmente las absorciones en la región NIR corresponden a sobretonos (Kokaly 2001, Osborne 2006, Figura 8).

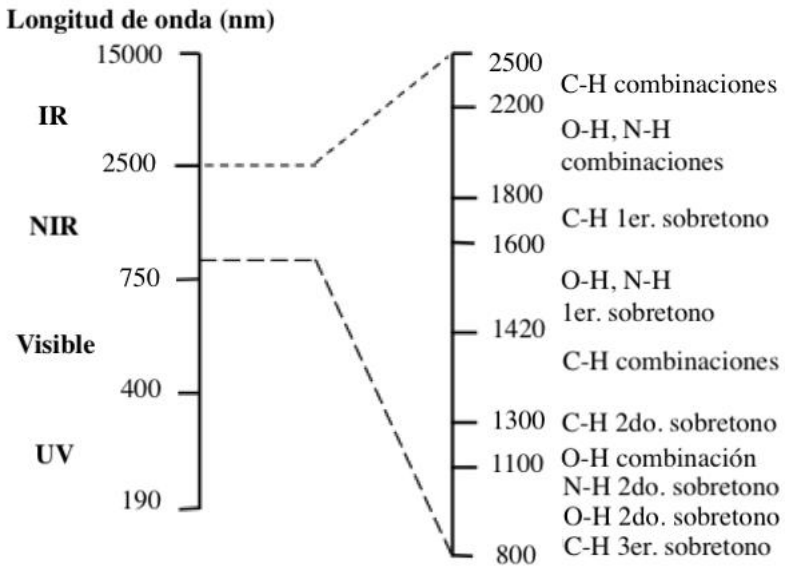


Figura 8. Bandas de absorción en la región NIR

Fuente: adaptado de Osborne (2006).

Las bandas de absorción observadas en materiales vegetales surgen de vibraciones de enlaces C—O, O—H, C—H, y N—H, además de sobretonos y combinaciones de estas vibraciones (Kokaly y Clark 1999, Osborne 2006, Figura 8). Las bandas de absorción asociadas a las proteínas, dadas por los grupos funcionales amidas (enlaces N-H), se encuentran centradas en 2054 y 2172 nm (Kokaly, 2001), y también se encuentran sobretonos en las longitudes de onda de 1020 y 1510 nm (Curran, 1989). Sin embargo, las absorciones de los diferentes constituyentes de las plantas son similares y se superponen, por lo que en general no se puede aislar una única banda y directamente relacionarla a la concentración de un cierto componente (Curran 1989, Murray 1993, Kokaly y Clark 1999).

Los espectros NIR se presentan como gráficos de la absorbancia (bajo la forma de log 1/R, donde R es el valor de reflectancia) para cada longitud de onda captada, y en general tienen la apariencia de líneas suaves, formadas por las bandas superpuestas de los espectros de las sustancias que componen la muestra (Shenk y Westerhaus 1994, Deaville y Flinn 2000, Figura 10). Los cambios en la pendiente confieren la información de estas absorciones, que pueden ser desenmascaradas mediante derivaciones (Murray, 1993), además de minimizar otras alteraciones del espectro, por ejemplo, por el tamaño de partícula, aunque existen otros tipos de correcciones posibles (Shenk y Westerhaus 1994, Deaville y Flinn 2000, Osborne 2006).

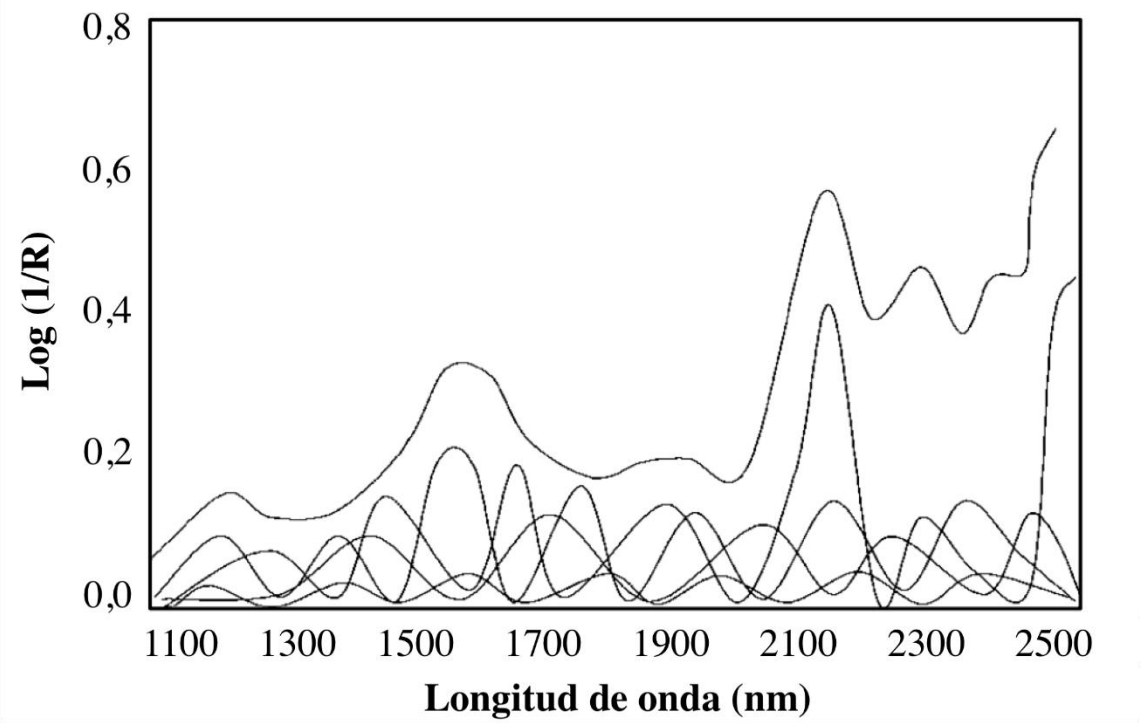


Figura 9. Espectro de una muestra de cereal molido (línea superior) y los picos de absorción que lo constituyen

Fuente: adaptado de Osborne (2006).

La clave para el uso exitoso de la técnica NIRS es la calibración, que es el proceso matemático que relaciona la información espectral con el componente o propiedad de interés (Deaville y Flinn, 2000). El número y tipo de muestras a utilizar es muy importante; debe incluirse todas las fuentes de variación que puedan esperarse en muestras futuras para predicción (Windham et al. 1989, Shenk y Westerhaus 1994). Dado un número limitado de muestras puede resultar más efectivo generar calibraciones más abarcativas, o hasta multiproducto, con buenos resultados (Smith y Flinn 1991, Shenk y Westerhaus 1993).

2.2.2.2 Antecedentes

El primer trabajo publicado en el que se utilizó NIRS para analizar muestras de forrajes fue el de Norris et al. (1976). Desde entonces se ha avanzado en el desarrollo de la tecnología y su uso se ha generalizado (Shenk y Westerhaus 1994, Deaville y Flinn 2000), siendo la estimación de nitrógeno una de las aplicaciones más exitosas (Murray, 1993) con buenos resultados en forrajes (Carvalho da Paz et al., 2019). Sin embargo, no existen antecedentes de trabajos específicos de calibración de la técnica que contemplen muestras de campo natural en su calibración. A nivel nacional se han calibrado modelos para forrajes frescos y secos de gramíneas templadas y leguminosas en condiciones de

cultivo comercial y en el marco del Programa Nacional de Evaluación de Cultivares, además de muestras de ensilajes, henolajes y heno, de suplementos energéticos y proteicos (Cuadro 2). En general estas muestras presentan en promedio contenidos de proteína cruda superiores a los esperados para campo natural, y en todos los casos el método de referencia utilizado es el Kjeldahl.

Cuadro 2. Resumen de antecedentes del uso de NIRS para estimación de PC en forrajes

Autores	Muestras					Espectros		Calibración	
	Material	**n**	**Obs.**	**Media**	**SD**	**Rango Lectura (nm)**	**Derivada**	**n**	**SECV**
Norris et al. (1976)	Varias especies de gramíneas, alfalfa, puras y mezcla, ensilajes, heno.	87	Secas, molidas.	-	-	1400-2100	2	87	1,07
Cozzolino et al. (2001)	Gramíneas (286), leguminosas (127), y mezcla (53).	530	Secas, molidas.	16,3	3,9	400-2500	1	480	0,58
Cozzolino y Labandera (2002a)	Gramíneas (250), leguminosas (150).	400	Frescas, cortadas aprox. 40-50 mm	22,9	4,8	400-2500	-	301	1,81
							1	215	1,98
							2	216	1,95
Cozzolino (2002b)	Raciones, suplementos, granos.	400	Secas	18,7	8,5	400-2500	1	375	1,30
Cozzolino et al. (2003)	Ensilaje de maíz	200	Secas, molidas.	7,9	1,5	400-2500	1	200	0,50
Cozzolino et al. (2006a)	Heno y henolaje de pasturas (puras y mezcla).	90	Secas, molidas.	10,3	3,1	400-2500	2	71	1,54
Cozzolino et al. (2006b)	Ensilaje de planta entera de maíz	90	Frescas.	7,7	3,2	400-2500	2	90	0,65
						500-1100		90	0,77
García y Cozzolino (2006)	Gramíneas y leguminosas, planta entera. Puras y mezcla.	610	Secas, molidas.	16,5	6,1	400-2500	1	610	0,98
	Festuca	200		-	3,8			200	0,50

	Planta entera de trigo	30		-	10,1			30	1,00
	Leguminosas	130		-	3,2			130	0,95
Morón et al. (2007)	Planta entera de trigo	182	Frescas	27,5	9,1	400-750	2	182	4,63
						750-2500			4,13
						400-2500			4,00
		63	Secas, molidas.			400-750		63	1,69
						750-2500			0,75
						400-2500			1,06
Restaino et al. (2009)	Ensilaje de pastura (gramíneas, leguminosas, mezclas).	60	Secas, molidas.	13,9	4,1	400-2500	-	60	2,00

Referencia: donde Obs. es observaciones, SD es desvío estándar de las muestras, Derivada es el orden de derivación de los espectros y SECV es raíz del cuadrado medio del error de la validación cruzada.

2.3. HIPÓTESIS

Considerando las diferencias entre los métodos de cuantificación de la concentración de la proteína cruda de los forrajes, se espera que Dumas cuantifique valores superiores de N que Kjeldahl, y que, por lo tanto, la predicción de modelos calibrados en base a Kjeldahl presenten un sesgo positivo cuando los valores de referencia son en base a N Dumas.

Dado que en la generación de los modelos preexistentes de estimación de proteína cruda utilizando NIRS no están contempladas muestras de forraje de campo natural, el desarrollo de un modelo específico, que contemple toda la variabilidad esperable para este tipo de muestras, resultará en mejores predicciones del contenido de proteína.

Se espera que las bandas identificadas como relevantes a la predicción de la concentración de PC en forrajes de campo natural, correspondan fundamentalmente a sobretonos de las absorciones de enlaces N-H, en torno a 1020 y 1510 nm (Curran, 1989).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

Se hicieron tres tipos de análisis para evaluar las estimaciones de la concentración de proteína cruda (%PC) en campo natural. En primer lugar, se compararon los métodos químicos de Kjeldahl y Dumas. En segundo lugar, se evaluaron los modelos disponibles mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) de los equipos de INIA-Tacuarembó e INIA-La Estanzuela. En tercer lugar, se calibraron y validaron modelos específicos en base a espectros NIR de las muestras, y se compararon las predicciones con las de los otros modelos evaluados. Se trabajó principalmente con el Laboratorio de Análisis Integral del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA-Tacuarembó, y con el Laboratorio de Nutrición Animal de INIA-La Estanzuela.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

El primer grupo ("Simulación") consistió en 115 muestras, compuestas de forraje verde y seco de campo natural, tomadas en dos muestreos (octubre 2017 y enero 2018) en 32 establecimientos ganaderos ubicados en 6 departamentos del norte de Uruguay (Artigas, Cerro Largo, Paysandú, Rivera, Salto, Tacuarembó). La metodología de muestreo fue el hand-plucking (De Vries, 1995), simulando el pastoreo de los animales (30 submuestras en cada muestreo).

El segundo grupo ("Experimento") consistió en 446 muestras de forraje procedentes de un experimento de largo plazo bajo pastoreo instalado en 1996, con los tratamientos: i) campo natural fertilizado con 100 kg de N/ha/año y 40 kg P_2O_5/ha/año; y ii) campo natural sin fertilizar, separadas por componente (verde, seco y tallos). Las muestras corresponden a cosechas de forrajes realizadas en 10 estratos de altura del forraje (0-4 cm en parches de 4 cm de altura promedio; 4-8 y 0-4 cm en parches de 8 cm de altura promedio, 8-12, 4-8 y 0-4 cm en parches de 12 cm de altura promedio, 12-16, 8-12, 4-8 y 0-4 cm en parches de 16 cm de altura promedio), en cuatro momentos: octubre 2017, febrero 2018, octubre 2018 y febrero 2019, en la Unidad Experimental de Glencoe ubicada en el departamento de Paysandú.

El tercer grupo ("Diferimiento") consistió en 206 muestras de forraje (cosechadas a 5 cm de altura) que corresponden a 6 especies de campo natural con distintos periodos de acumulación de forraje a fin de verano (450, 900, 1350, 1800, 2250 °día), creciendo en macetas bajo condiciones no limitantes de agua y nutrientes. Las especies utilizadas fueron: *Bromus auleticus* Trin. ex. Nees, *Nassella neesiana* (Trin. & Rupr.) Backworth, *Andropogon lateralis* Nees, *Coelorachis selloana* (Hack.) A. Camus, *Paspalum dilatatum* Poir., y *Paspalum notatum* Flüggé.

El último grupo (“Predios") consistió en 238 muestras subdivididas en: i) 144 muestras de *Axonopus fissifolius* (Raddi) Kuhlm., *A. lateralis* y *P. notatum* obtenidas en parches de 4, 8, 12 y 16 cm de altura; ii) 42 muestras de los distintos componentes morfológicos de *P. notatum* (restos secos, vaina, rizoma, hoja en expansión, hoja 1, hoja 2, hoja 3); iii) 52 muestras de campo natural “completas” (todo el forraje, sin separar). Todas estas muestras fueron tomadas en dos predios comerciales, contrastantes en el nivel de fósforo en el suelo, ubicados en los departamentos de Artigas y Rivera (bajos y altos niveles de fósforo, respectivamente).

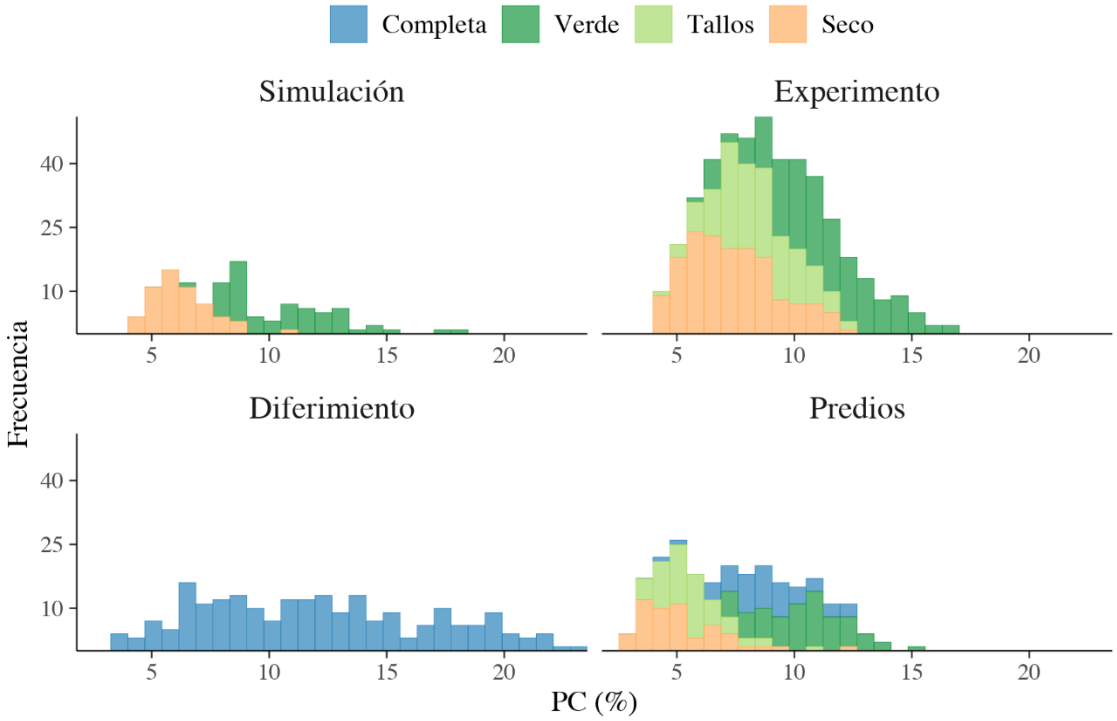


Figura 10. Histogramas de la concentración de proteína cruda en los cuatros grupos de muestras de forraje (como porcentaje de la MS)

Las muestras del grupo de Diferimiento fueron secadas en estufa a 40°C por 72 horas o hasta que alcanzaran un peso constante, mientras que las muestras de los grupos de Simulación, Experimento y Predios fueron secadas a 60°C de 48 hasta 72 horas. Todas fueron molidas con un molino tipo Wiley (Arthur H. Thomas, USA) con malla de 1 mm.

3.3 ANÁLISIS DE REFERENCIA

Los valores de PC de referencia se obtuvieron al multiplicar el contenido de N, obtenido mediante el método Dumas en un analizador elemental LECO CHN 628 (United States, Michigan, 2018), por el factor 6,25. Para las muestras del grupo de Simulación,

también se estimó la concentración de N mediante el método Kjeldahl con un destilador FOSS KJELTEC 8200 (FOSS, Hillerød, Dinamarca). Se estimó la relación media entre los valores obtenidos por ambos métodos (N-Kjeldahl/N-Dumas), y también se ajustó un modelo de regresión lineal simple para describir su relación entre las medidas en el rango de valores evaluados. Para evaluar diferencias entre los tipos de muestra y las fechas de muestreo, se generaron modelos de regresión para forraje verde y forraje seco, y para muestras obtenidas en octubre 2017 y en enero 2018; y se realizó una prueba t-student para comprobar la significancia de las diferencias entre los parámetros de los modelos para cada variable (Crawley, 2005).

3.4 NIRS

Se utilizaron dos equipos de espectroscopía en el infrarrojo cercano: FOSS XDS Rapid Content Analyzer XM-1100 Series (FOSS, Höganäs, Suecia) en el Laboratorio de Nutrición Animal de INIA La Estanzuela, y NIR, DA 7250 (Perten Instruments, Hägersten, Suecia) en el Laboratorio de Análisis Integral de INIA Tacuarembó. La principal diferencia entre los dos equipos es el rango del espectro electromagnético que abarcan y su resolución. El equipo FOSS toma un espectro entre 400 a 2500 nm con 2 nm de resolución, mientras que el Perten tiene un rango más acotado que abarca de 950 a 1650 nm con 4,5 nm de resolución. Ambos tienen una precisión de 0,05 nm.

3.5 PREDICCIÓN

En una primera instancia se predijo el contenido de PC mediante los modelos disponibles desarrollados en el equipo FOSS XDS. En INIA La Estanzuela se analizaron los grupos de muestras de Simulación, Experimento y Predios (n=798) y se predijo según los modelos “Gramíneas” y “Forrajeras” previamente allí generadas. En INIA Tacuarembó se analizaron las muestras de Simulación, Experimento y Diferimiento (n = 780) y la predicción de PC fue dada por el modelo para forrajes precargado en el equipo.

El modelo Gramíneas fue desarrollado a partir de muestras de: avena, raigrás, festuca y dactylis; mientras que el modelo Forrajeras: alfalfa, avena, festuca, raigrás anual y perenne, cebada, maíz, sorgo, lotus y trébol, además de mezclas de gramíneas, mezclas de leguminosas, y de gramíneas con leguminosas. Ambos modelos se calibraron con valores de PC en base a análisis de N realizados por el método Kjeldahl y son re-calibrados con nuevas muestras cada año. [1] En este caso se utilizó la versión 2019.

Se graficaron los valores predichos por cada modelo contra los valores de referencia en base al método Dumas y se generó una regresión lineal para evaluar la tendencia. También se calculó el error estándar de predicción (SEP), y el sesgo y error estándar de predicción corregido (SEPc, Murray 1993, Davies y Fearn 2006). Debido al

[1] Purtscher, I. 2020. Com. personal.

amplio rango de valores de PC en las muestras y el nivel de precisión necesario, se decidió además evaluar el error y el sesgo en términos relativos. Se buscó que los modelos predigan con un SEP<1, en términos absolutos, o SEP<0,1 en términos relativos.

$$\text{Error} = L - M$$

$$\text{SEP} = \sqrt{\frac{\sum(L-M)^2}{n}}$$

$$\text{Sesgo} = \frac{\sum(L-M)}{n}$$

$$\text{SEPc} = \sqrt{\frac{\sum(L-M-(\sum\frac{L-M}{n}))^2}{n-1}}$$

$$\text{Error relativo} = \frac{L-M}{L}$$

$$\text{SEP relativo} = \sqrt{\frac{\sum\left(\frac{L-M}{L}\right)^2}{n}}$$

$$\text{Sesgo relativo} = \frac{\sum(\frac{L-M}{L})}{n}$$

$$\text{SEPc relativo} = \sqrt{\frac{\sum(\frac{L-M}{L}-(\sum\frac{L-M}{L*n}))^2}{n-1}}$$

Donde L es el valor de referencia, estimado en el laboratorio; M es el valor predicho por el equipo NIRS y n es el número de muestras.

Para las muestras del grupo Diferimiento que presentaban las mayores diferencias (± 2 desvíos estándar) entre los análisis de Dumas y NIRS (predicción de Perten) se volvió a realizar el análisis Dumas (n=44), mejorando el ajuste entre los valores de referencia y predicción. Con las muestras del grupo de Simulación se realizó lo mismo, pero se tuvo en cuenta las diferencias entre los análisis de Dumas y Kjeldahl (n=11). No se repitió análisis para ninguna muestra de Experimento ni Predios.

3.6 CALIBRACIÓN

Con las muestras de los grupos Simulación, Experimento y Diferimiento se generaron modelos de predicción a partir de los espectros obtenidos con el equipo Perten (Anexo 1). Se realizó una derivación y suavizado mediante el logaritmo de Savitzky y Golay (1964) con los parámetros (2, 2, 13), donde el primer número corresponde al orden de derivación, el segundo al orden polinomial y el tercero al tamaño del segmento a suavizar (Anexo 2). También se hizo una normalización de los espectros mediante SNV (varianza normal estándar, Barnes et al., 1989, Figura 11). Se excluyeron los espectros de tres muestras que se observaban como errores de lectura o claros anómalos (Anexo 3).

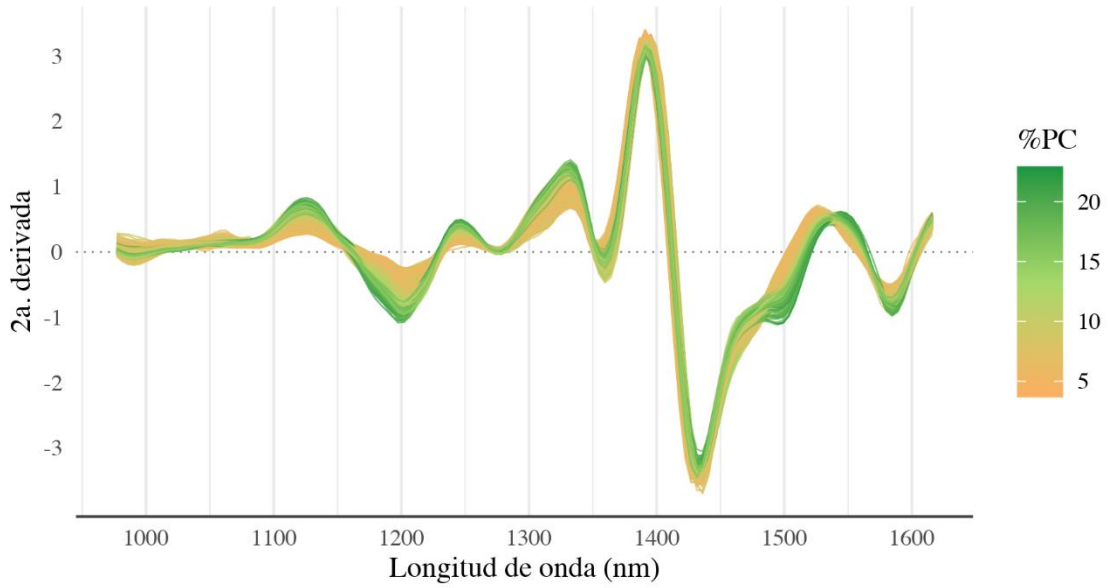


Figura 11. Derivada segunda del log (1/R) y suavizado mediante Savitzky-Golay y normalización por SNV (varianza normal estándar) de las muestras analizadas en el equipo Perten para la calibración de los modelos

En primer lugar, se calibraron modelos según dos criterios para seleccionar las muestras de calibración y validación. Para el primer criterio, 'Aleatorio', se tomó al azar un 75% de las muestras para calibrar y el 25% restante para la validación. Para el segundo, 'Espectral', las muestras para calibrar se eligieron mediante el método CENTER (Shenk y Westerhaus, 1991a) y SELECT (Shenk y Westerhaus, 1991b) que genera una selección representativa de los espectros para calibrar, en base a la distancia de Mahalanobis estandarizada. Se seleccionó en base a los espectros derivados y normalizados para minimizar efectos de partícula. En segundo lugar, se evaluó la capacidad de predicción con muestras totalmente independientes. En este caso dos de los grupos de muestras se usaron para calibrar y el grupo de muestras restante para validar.

Se calculó la media e intervalo de confianza (95%) de la estimación de cada estadístico mediante un muestreo con reemplazo con 1000 iteraciones, y para el modelo Aleatorio se realizó la selección aleatoria de las muestras y calibración 1000 veces (Kawamura et al. 2008, Durante et al. 2014).

Los modelos se generaron mediante una regresión PLS (Shenk y Westerhaus, 1994). Para evitar el sobreajuste se realizó una validación cruzada y se seleccionó el modelo con el menor número de componentes con RMSECV (raíz del cuadrado medio del error de la validación cruzada) dentro de un desvío del valor mínimo (Hastie et al., 2009), excepto el modelo Espectral que se seleccionó por el mínimo. El modelo PLS es el siguiente:

$$Y = \beta X + \varepsilon$$

Donde Y es el vector de predichos de PC (%), β es el vector de coeficientes de regresión, X la matriz con los datos espectrales y ε es el vector de errores. También se realizó una regresión Stepwise para identificar las bandas más relevantes en un modelo lineal (Williams 2001, Durante et al. 2014) con todas las muestras disponibles y con las muestras de calibración de los modelos generados.

Todo el procesamiento de datos se hizo con el software R versión 3.6.1 del año 2019 (R Core Team). Para el procesamiento de los espectros se utilizó el paquete ‘prospectr’ (Stevens et al., 2020) y para la regresión PLS se utilizó el paquete ‘pls’ (Mevik et al., 2020).

4. RESULTADOS

4.1 COMPARACIÓN KJELDAHL-DUMAS

En la mayoría de los casos Dumas recuperó valores más altos de N que Kjeldahl. En promedio, Kjeldahl estimó un 10% menos de concentración de N que Dumas (Figura 12 y Cuadro 3). No existieron diferencias entre las muestras de forraje verde y seco, ni entre fechas de muestro (Anexo 4).

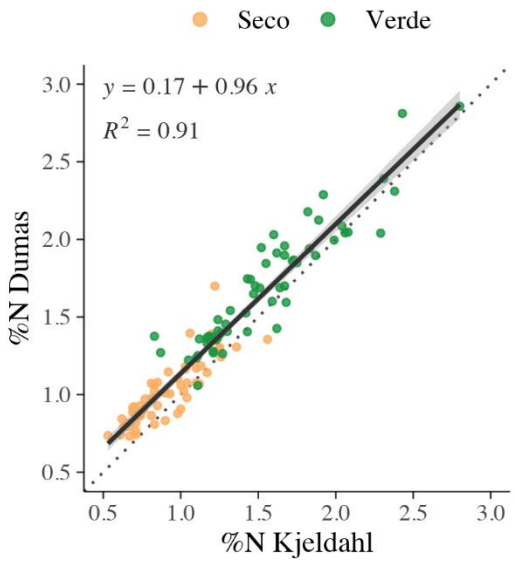


Figura 12. Relación entre la concentración de N determinada por los métodos de Kjeldahl (eje x) y Dumas (eje y)

Cuadro 3. Valores de N por los métodos de Kjeldahl y Dumas, la relación entre ambas medidas

	Mín.	Media	Máx.	CV%
Kjeldahl	0,530	1,230	2,80	37
Dumas	0,732	1,360	2,86	34
Rel. K:D	0,603	0,901	1,15	11

Referencia: donde Mín. es valor mínimo, Máx. es valor máximo, CV% es coeficiente de variación como porcentaje y Rel.
K:D es la relación entre el valor de N Kjeldahl y N Dumas.

4.2 PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE PC CON LOS MODELOS DISPONIBLES

Todos los modelos presentaron un error de predicción de 0,78-2,03% de PC (o 15-36% ER) por encima del objetivo deseado para las muestras de forraje de campo natural (Cuadros 4 y 5). En términos generales, la predicción del modelo Forrajeras presentó el menor error relativo, aunque con el mayor sesgo, tendiendo a sobreestimar la concentración de PC (Cuadro 5). Además, presentó el comportamiento más homogéneo entre componentes del forraje y con los mejores resultados para las muestras completas y de forraje verde (Figuras 14 y 15).

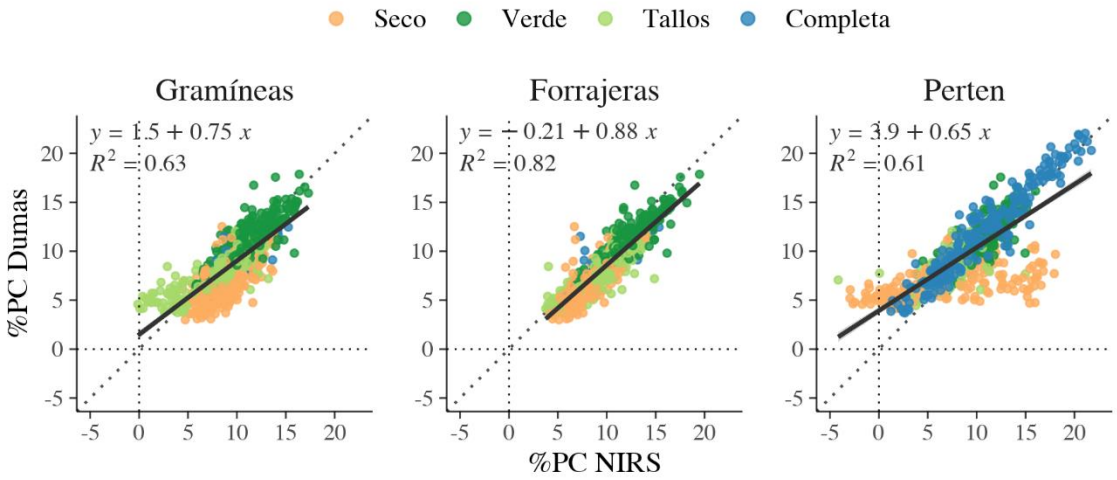


Figura 13. Predicción de los modelos Gramíneas, Forrajeras y el modelo precargado del equipo Perten para forrajes

Cuadro 4. Estadísticos de la predicción de los modelos Gramíneas, Forrajeras y el modelo precargado del equipo Perten para forrajes en términos absolutos

Modelo	**Absoluto**		
	SEP	**Sesgo**	**SEPc**
Gramíneas	1,98 (1,88; 2,09)	-0,8 (-0,93; -0,67)	1,81 (1,71; 1,91)
Forrajeras	1,85 (1,78; 1,94)	-1,4 (-1,48; -1,31)	1,22 (1,12; 1,32)
Perten	2,84 (2,64;3,03)	0,76 (0,56; 0,96)	2,73 (2,5; 2,95)

Referencia: se presenta el valor medio de las 1000 iteraciones, y entre paréntesis los límites inferior e superior del intervalo de confianza (95%).

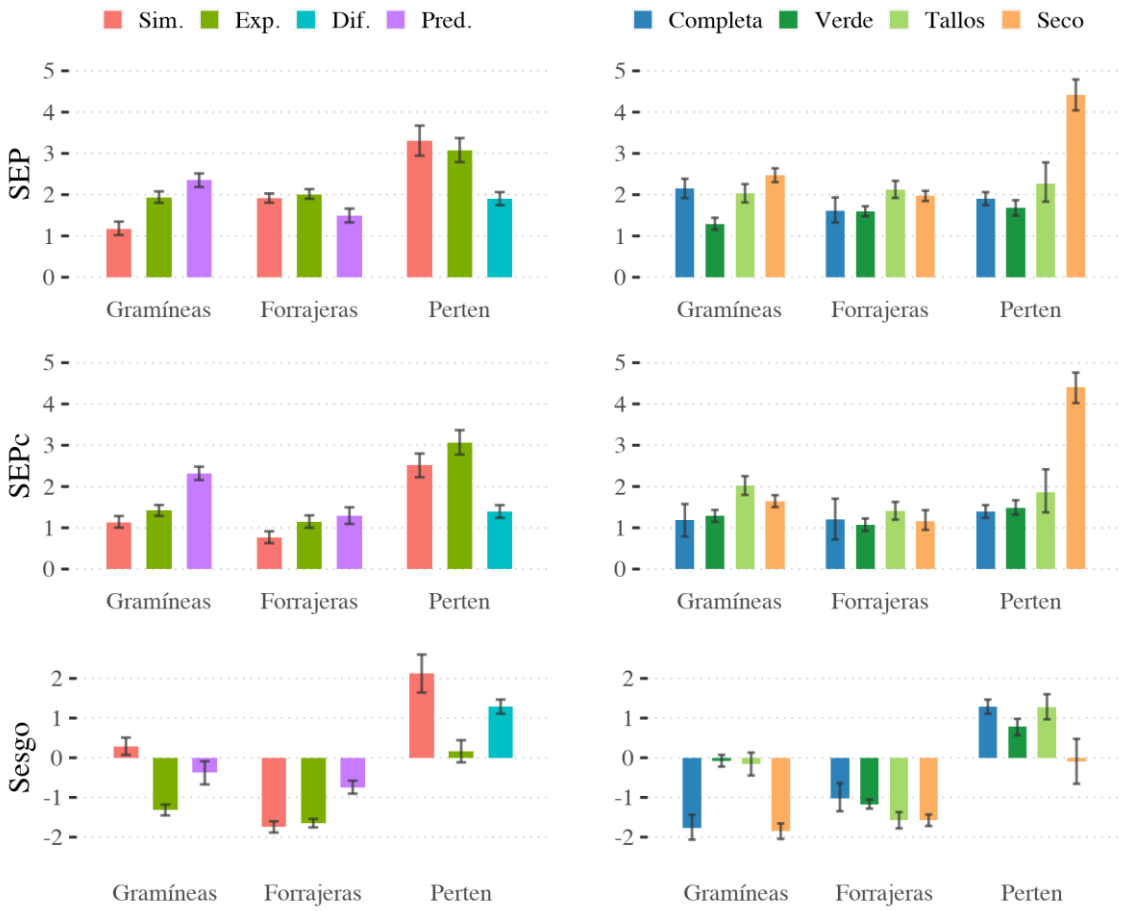
Cuadro 5. Estadísticos de la predicción de los modelos Gramíneas, Forrajeras y el modelo precargado del equipo Perten para forrajes en términos relativos

Modelo	**Relativo**		
	SEP	**Sesgo**	**SEPc**
Gramíneas	0,32 (0,3; 0,35)	-0,12 (-0,15; 0,10)	0,3 (0,27; 0,32)
Forrajeras	0,26 (0,25; 0,28)	-0,19 (-0,2; -0,17)	0,18 (0,17; 0,19)
Perten	0,42 (0,38; 0,46)	0,09 (0,06; 0,11)	0,4 (0,37; 0,45)

Referencia: se presenta el valor medio de las 1000 iteraciones, y entre paréntesis los límites inferior e superior del intervalo de confianza (95%).

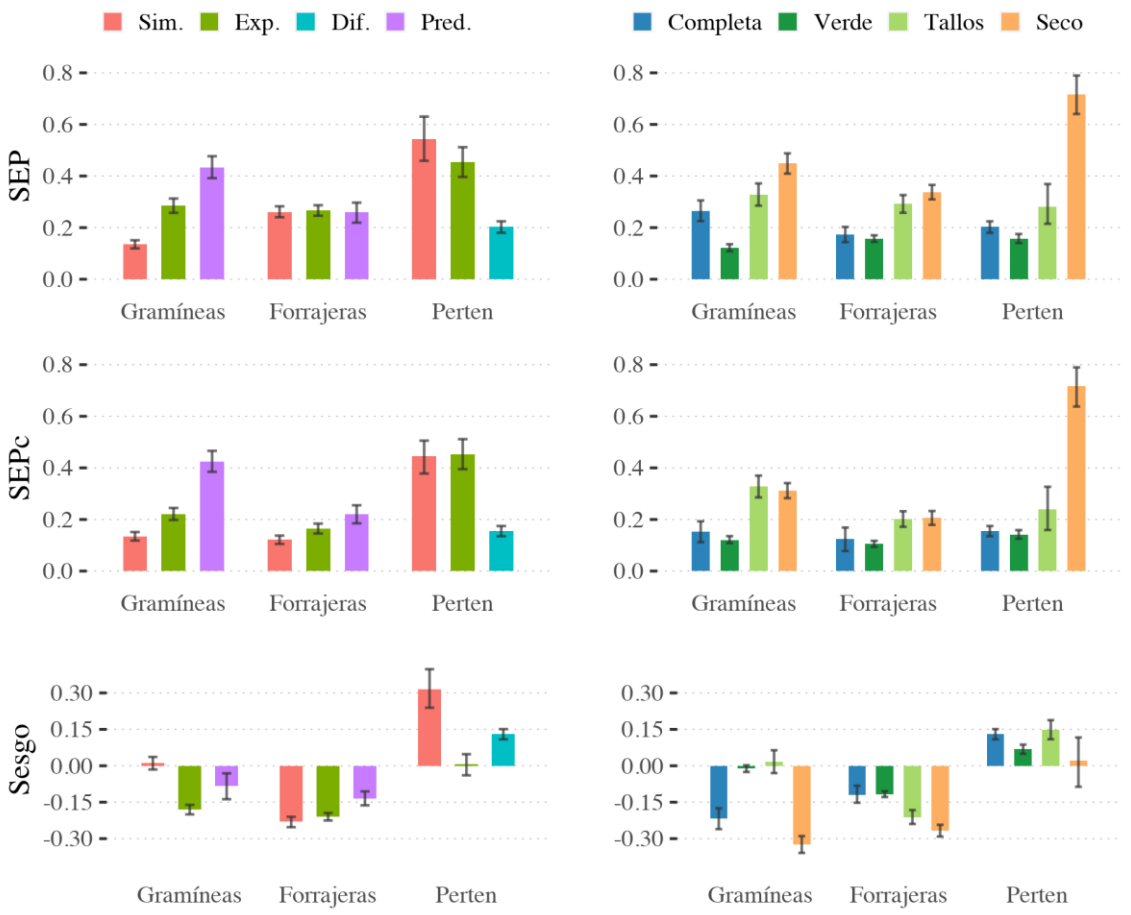
La predicción del modelo Gramíneas produjo resultados intermedios. Presentó adecuados resultados (menor SEP) para las muestras del grupo de Simulación y en particular para las muestras de forraje verde (Figuras 14 y 15). Al igual que el modelo Forrajeras, sobreestimó los valores de PC (sesgo < 0). El sesgo está dado principalmente por las muestras completas y de forraje seco (Figuras 14 y 15).

El modelo para forrajes del equipo Perten tuvo la peor predicción (mayor SEP) en términos generales (Cuadros 4 y 5), y fue la única que devolvió valores negativos (Figura 13). Se destaca el alto error de predicción para las muestras de forraje seco, pero valores comparables a los otros modelos para el resto de los componentes (Figuras 13, 14 y 15). A diferencia de los modelos Gramíneas y Forrajeras, tendió a subestimar el contenido de PC (sesgo>0, Cuadros 4 y 5, Figuras 14 y 15).



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza (95%).

Figura 14. Error y sesgo de las predicciones de los modelos disponibles por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza (95%).

Figura 15. Error y sesgo relativos de las predicciones de los modelos disponibles por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra

4.3 CALIBRACIÓN

Los nuevos modelos calibrados con las muestras de forraje de campo natural presentaron errores de predicción inferiores que los modelos preexistentes evaluados (Gramíneas, Forrajeras y Perten, Cuadros 4 - 7), y presentaron un sesgo muy bajo. Dentro de éstos, el modelo “Aleatorio” tuvo una mejor predicción que el modelo “Espectral”.

Cuadro 6. Estadísticos de la predicción de los modelos calibrados en términos absolutos

Modelo	**Absoluto**		
	SEP	**Sesgo**	**SEPc**
Aleatorio	1,18 (1,02; 1,33)	-0,002 (-0,21; 0,19)	1,17 (1,01; 1,33)
Espectral	1,42 (1,34; 1,51)	-0,002 (-0,22; -0,11)	1,42 (1,33; 1,51)

Referencia: se presenta el valor medio de las 1000 iteraciones, y entre paréntesis los límites inferior e superior del intervalo de confianza (95%).

Cuadro 7. Estadísticos de la predicción de los modelos calibrados en términos relativos

Modelo	**Relativo**		
	SEP	**Sesgo**	**SEPc**
Aleatorio	0,13 (0,11; 0,15)	-0,02 (-0,04; 0,00)	0,13 (0,11; 0,15)
Espectral	0,17 (0,16; 0,19)	-0,04 (-0,05; -0,03)	0,17 (0,16; 0,18)

Referencia: se presenta el valor medio de las 1000 iteraciones, y entre paréntesis los límites inferior e superior del intervalo de confianza (95%).

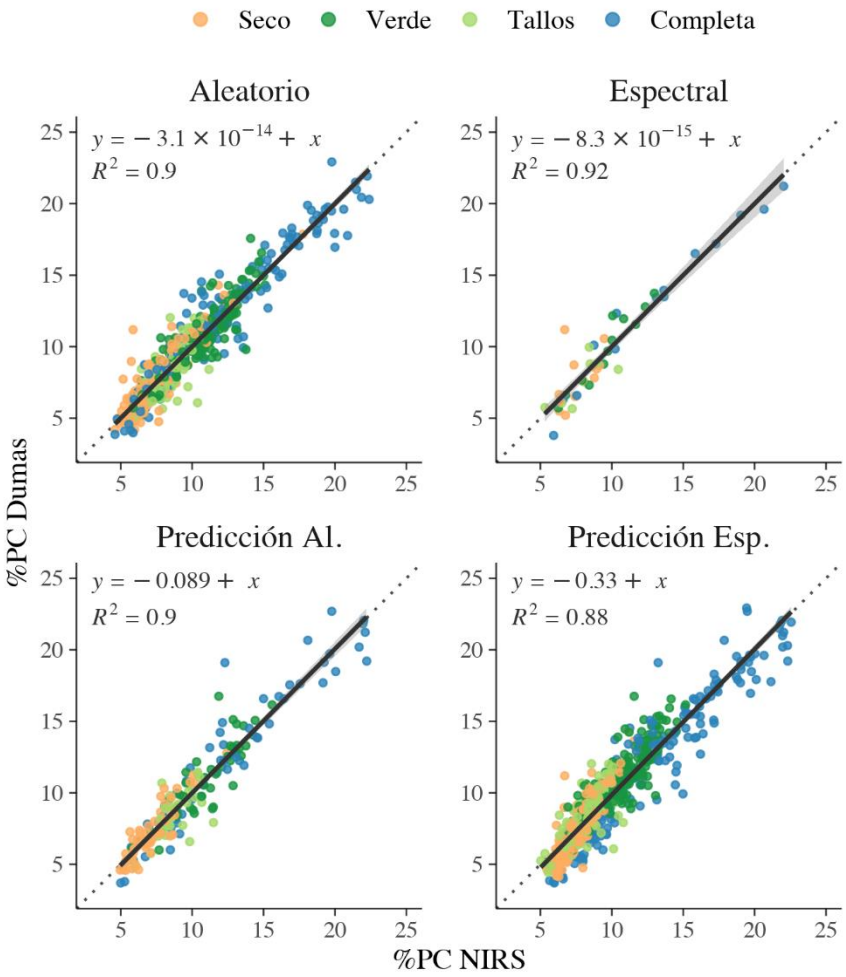
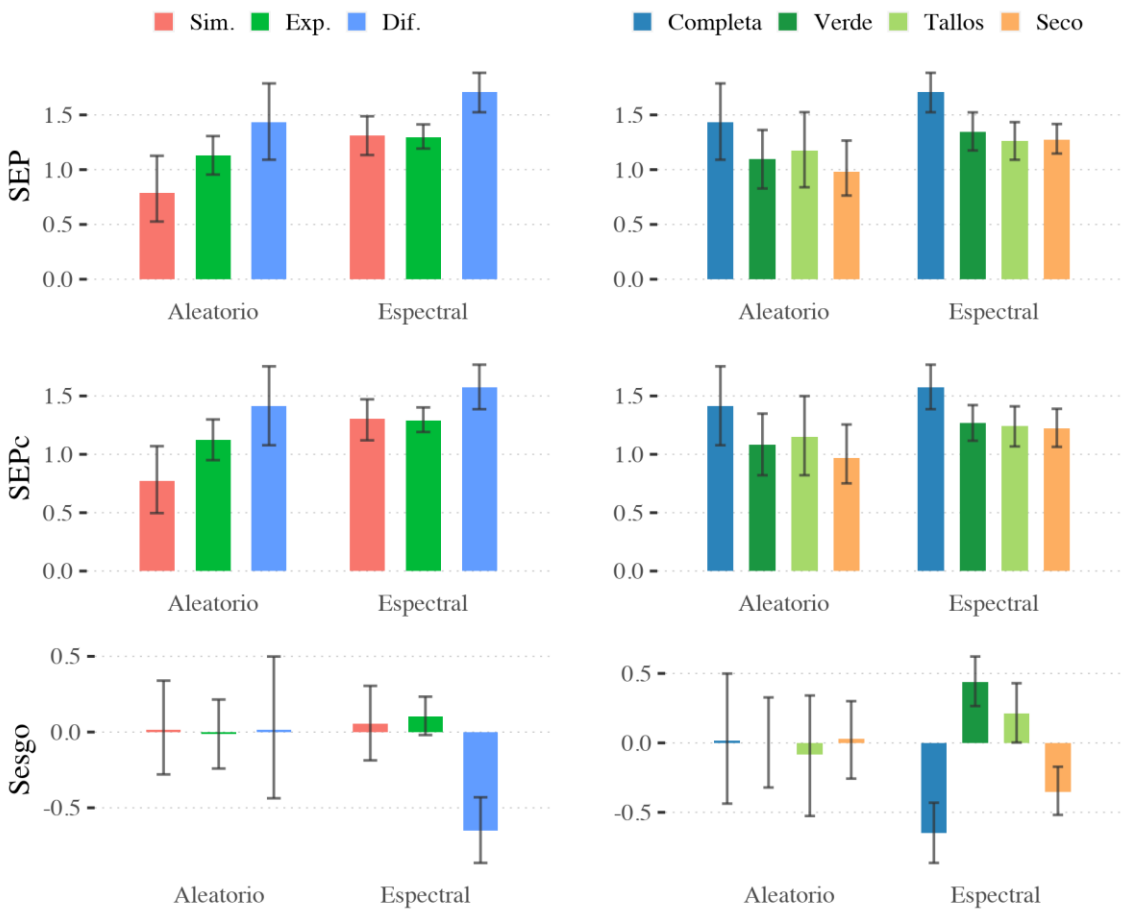


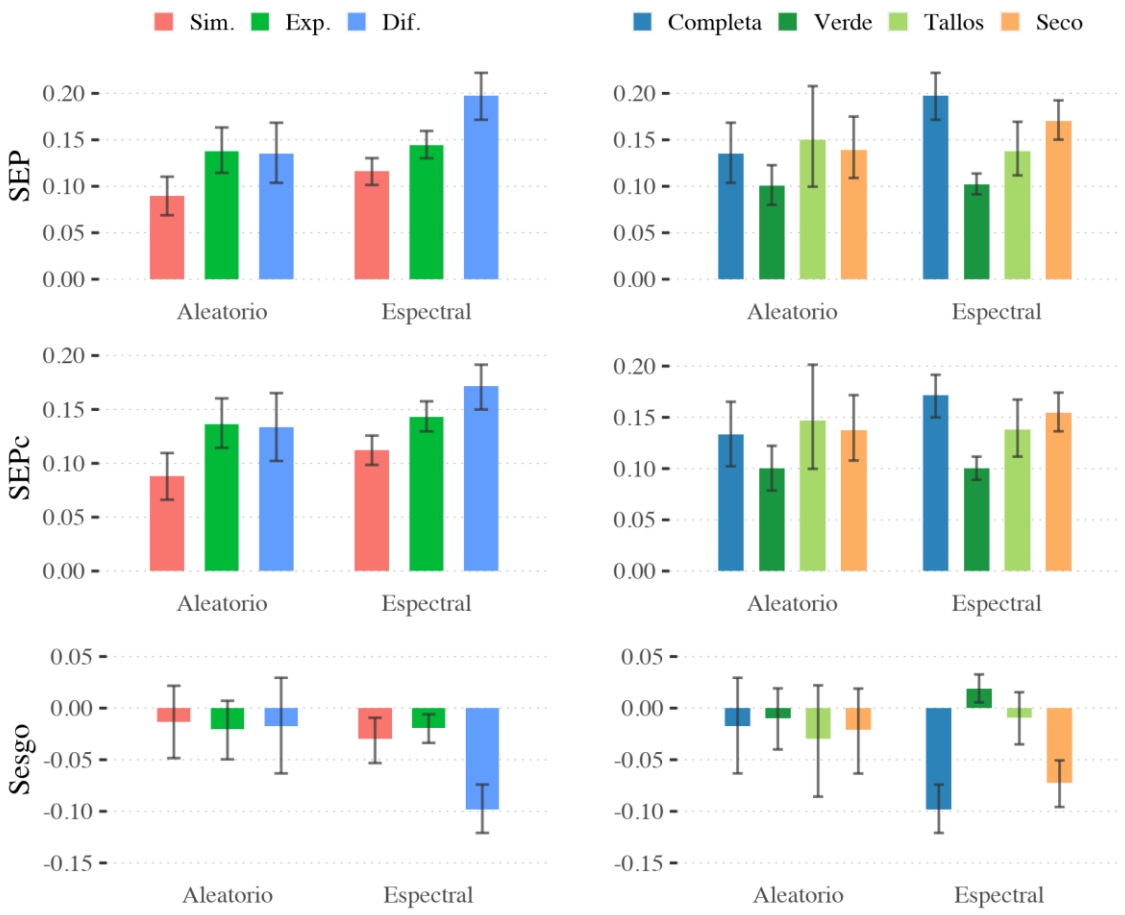
Figura 16. Ajuste de la calibración con validación cruzada (sup.) y predicción (inf.) de los modelos generados

Contrastando con los modelos evaluados en la sección anterior, los modelos calibrados presentaron un comportamiento más homogéneo entre componentes, sobre todo el modelo Aleatorio. Para el modelo Espectral llama la atención el reducido número de muestras seleccionadas para la calibración (n=47, Figura 16). Las mejores predicciones (menor SEP) fueron para las muestras de forraje verde cuando se observa en valores relativos (Figura 18), aunque no tanto en valores absolutos (Figura 17). El mayor error se vio para las muestras completas (Diferimiento), mientras que para los otros componentes fue similar (Figura 17). El grupo de muestras de Simulación presentó el menor error relativo (Figura 18). Tendió a subestimar el contenido de PC en muestras de forraje verde y tallos (sesgo > 0), y a sobreestimar para muestras de forraje seco y completas (sesgo < 0, Figuras 17 y 18).



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza (95%).

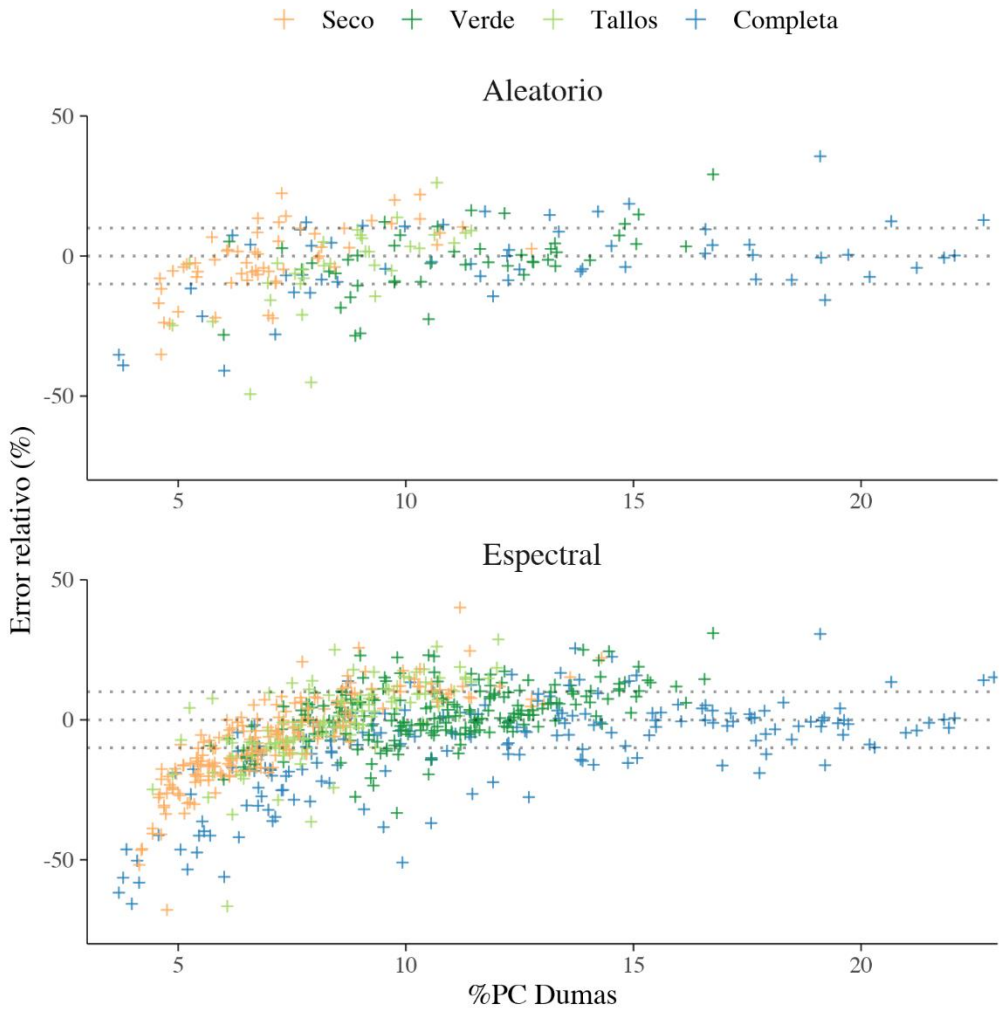
Figura 17. Error y sesgo de las predicciones de los modelos calibrados por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza (95%).

Figura 18. Error y sesgo relativos de las predicciones de los modelos calibrados por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra

A bajas concentraciones de proteína cruda el error relativo de la predicción fue mayor para ambos modelos, con una tendencia a sobreestimar los valores más bajos (menores a la media, aproximadamente <10% PC, Figura 19). Este comportamiento fue más visible en el modelo Espectral.



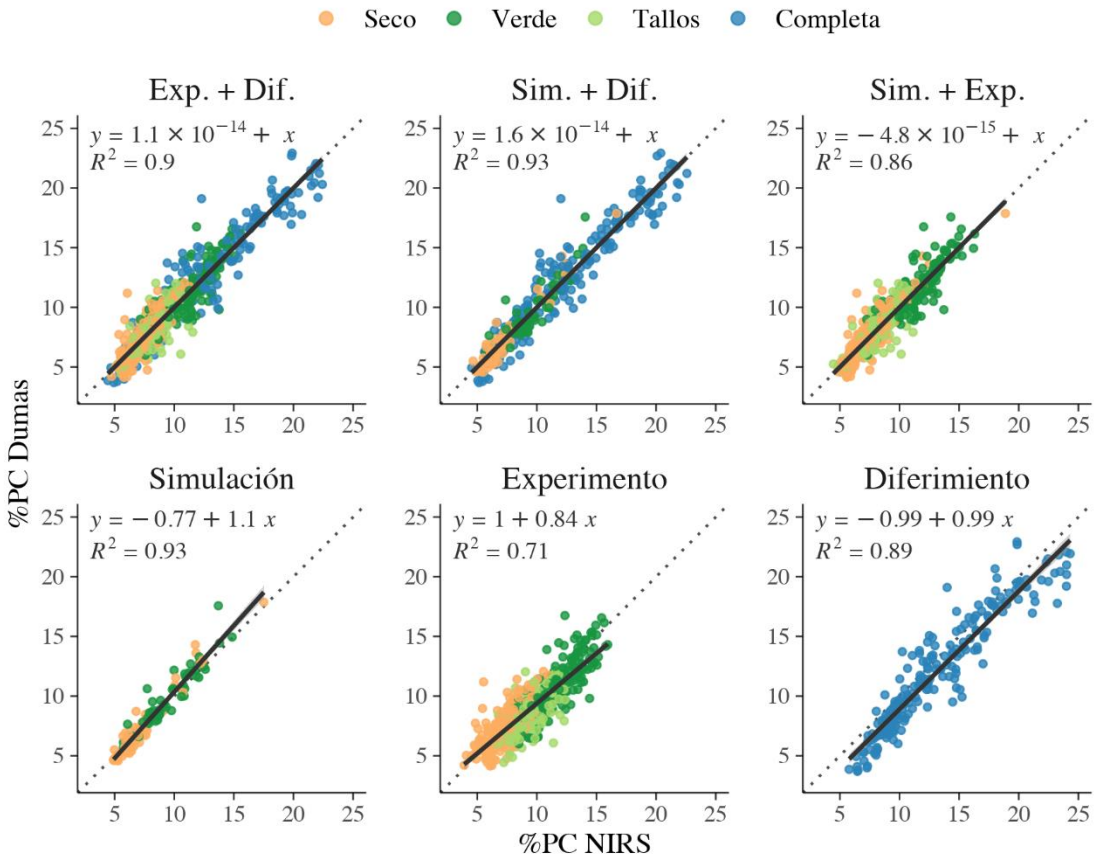
Referencia: las líneas punteadas marcan el rango aceptable (±10% ER) y cero.

Figura 19. Error relativo de predicción, como porcentaje, en función del valor de PC de referencia

4.3.1 Validación independiente

El modelo validado con las muestras del grupo de Simulación presentó los mejores resultados de todos los modelos evaluados (Figura 20), siendo el único con un SEP dentro de los criterios definidos (<1 absoluto y <0,1 relativo, Cuadros 8 y 9). El modelo validado con las muestras del grupo Diferimiento resultó en el mayor error de predicción en términos absolutos (Cuadro 8), pero no difirió significativamente del validado con el grupo de Experimento en términos relativos (Cuadro 9). Además, fue el que presentó el mayor sesgo (Cuadros 8 y 9). El modelo validado con las muestras de

Experimento presentó un menor SEP para las muestras de forraje seco y con un leve sesgo positivo, en términos absolutos (Figura 21). En términos relativos, se destaca un mayor error para muestras de tallos, y un comportamiento similar para muestras de forraje verde y seco (Figura 22).



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Validación cruzada (sup.) y predicción (inf.) con los distintos grupos de muestras

Figura 20. Relación entre el contenido de proteína cruda estimado por Dumas y predicho por los modelos basados en NIRS

Cuadro 8. Estadísticos de la predicción de los modelos con validación independiente en términos absolutos

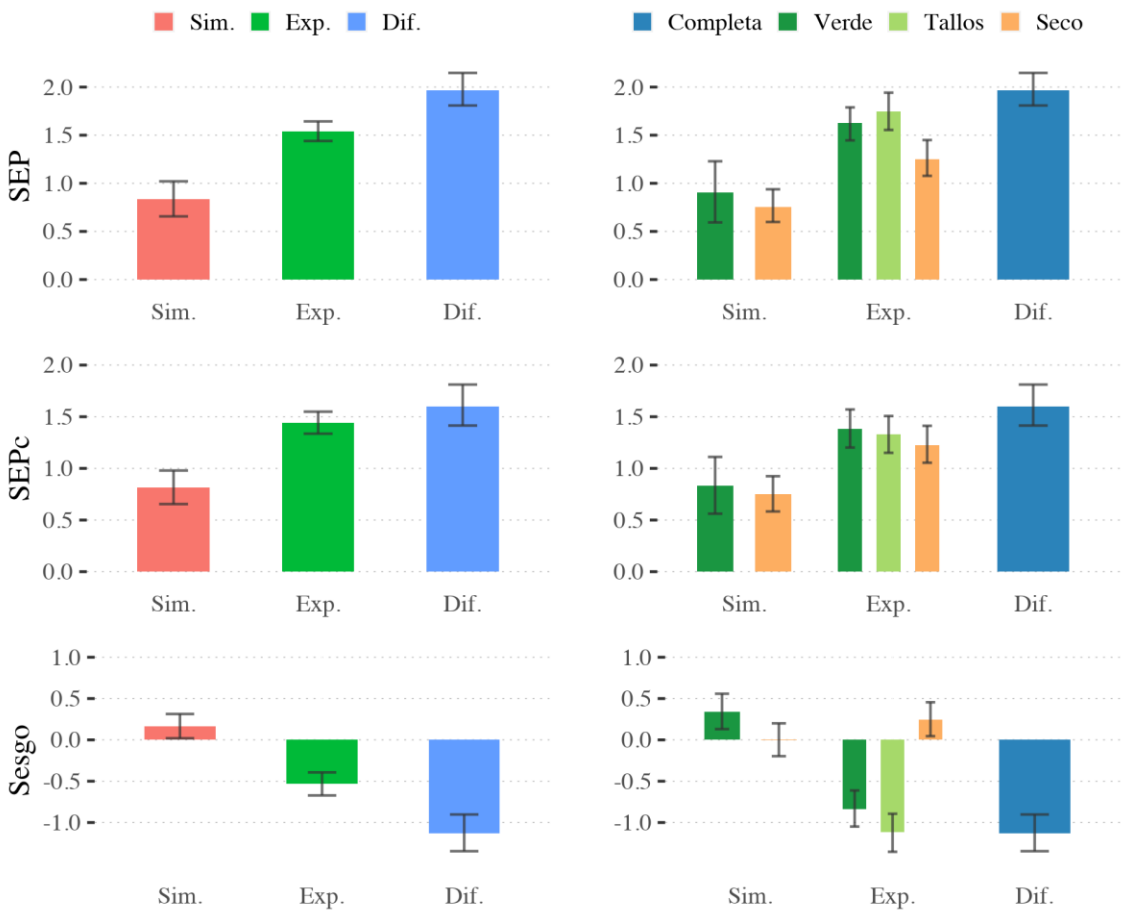
Modelo	**Absoluto**		
	SEP	**Sesgo**	**SEPc**
Simulación	0,83 (0,65; 1,04)	0,16 (0,02; 0,31)	0,82 (0,02; 0,31)
Experimento	1,54 (1,43; 1,65)	-0,54 (-0,68; 0,40)	1,44 (1,33; 1,56)
Diferimiento	1,95 (1,80; 2,13)	-1,12 (-1,34; -0,90)	1,59 (-1,34; 1,78)

Referencia: se presenta el valor medio de las 1000 iteraciones, y entre paréntesis los límites inferior e superior del intervalo de confianza (95%).

Cuadro 9. Estadísticos de la predicción de los modelos con validación independiente en términos relativos

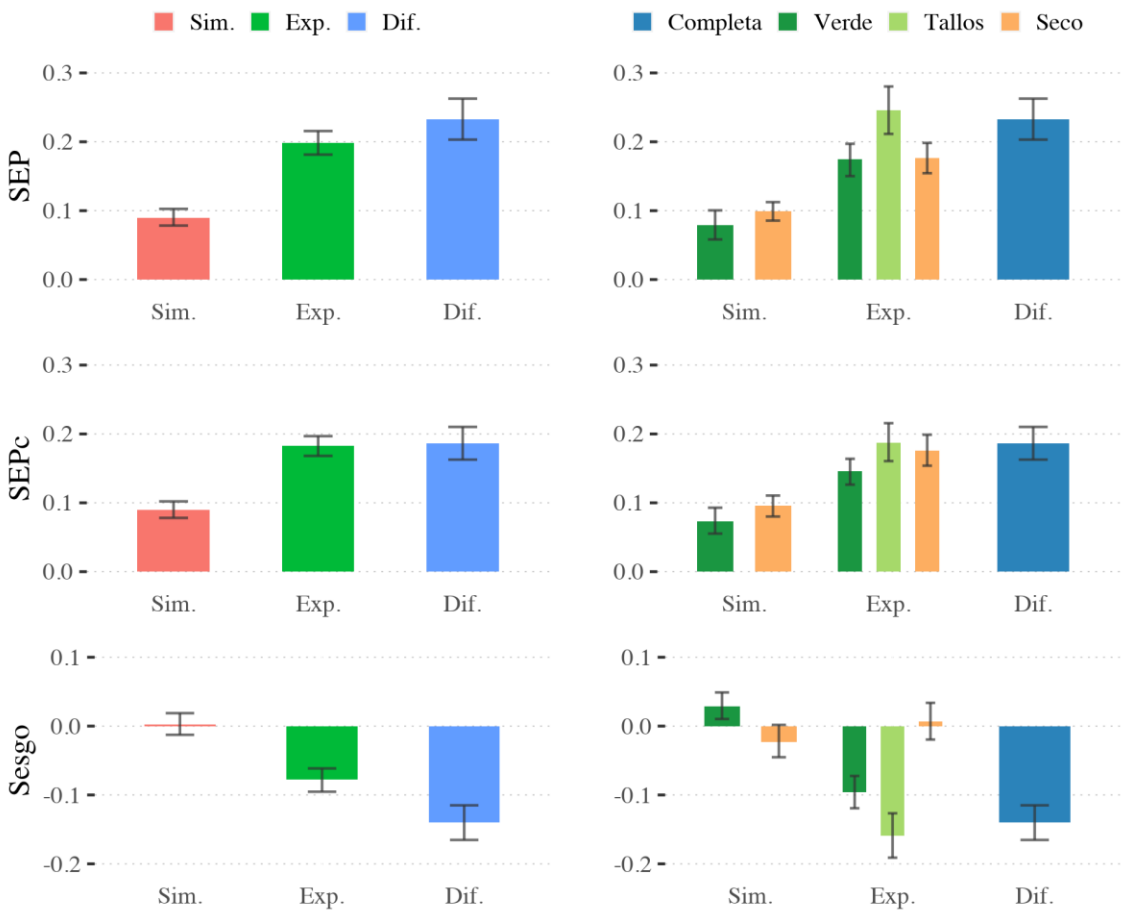
Modelo	**Relativo**		
	SEP	**Sesgo**	**SEPc**
Simulación	0,09 (0,08; 0,10)	0,002 (-0,01; 0,02)	0,09 (0,08; 0,10)
Experimento	0,20 (0,18; 0,22)	-0,08 (-0,10; -0,06)	0,18 (0,17; 0,20)
Diferimiento	0,23 (0,20; 0,26)	-0,14 (-0,17; -0,12)	0,19 (0,16; 0,21)

Referencia: se presenta el valor medio de las 1000 iteraciones, y entre paréntesis los límites inferior e superior del intervalo de confianza (95%).



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza (95%).

Figura 21. Error y sesgo de las predicciones de los modelos calibrados independientes por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra



Referencia: donde Sim. es Simulación, Exp. es Experimento, Dif. es Diferimiento y Pred. es Predios. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza (95%).

Figura 22. Error y sesgo relativos de las predicciones de los modelos calibrados independientes por grupo (izq.) y tipo (der.) de muestra

4.3.2 Selección de bandas

La selección de bandas relevantes mediante regresión Stepwise identificó un máximo de 19 bandas para todas las muestras, un mínimo de 4 para el modelo Espectral y 18 bandas para el modelo Aleatorio (Figura 23). En todos los casos se seleccionó la banda de 1517 nm como la de mayor relevancia (Cuadro 10). Otras bandas relevantes fueron 1602,5 y 1251,5 nm.

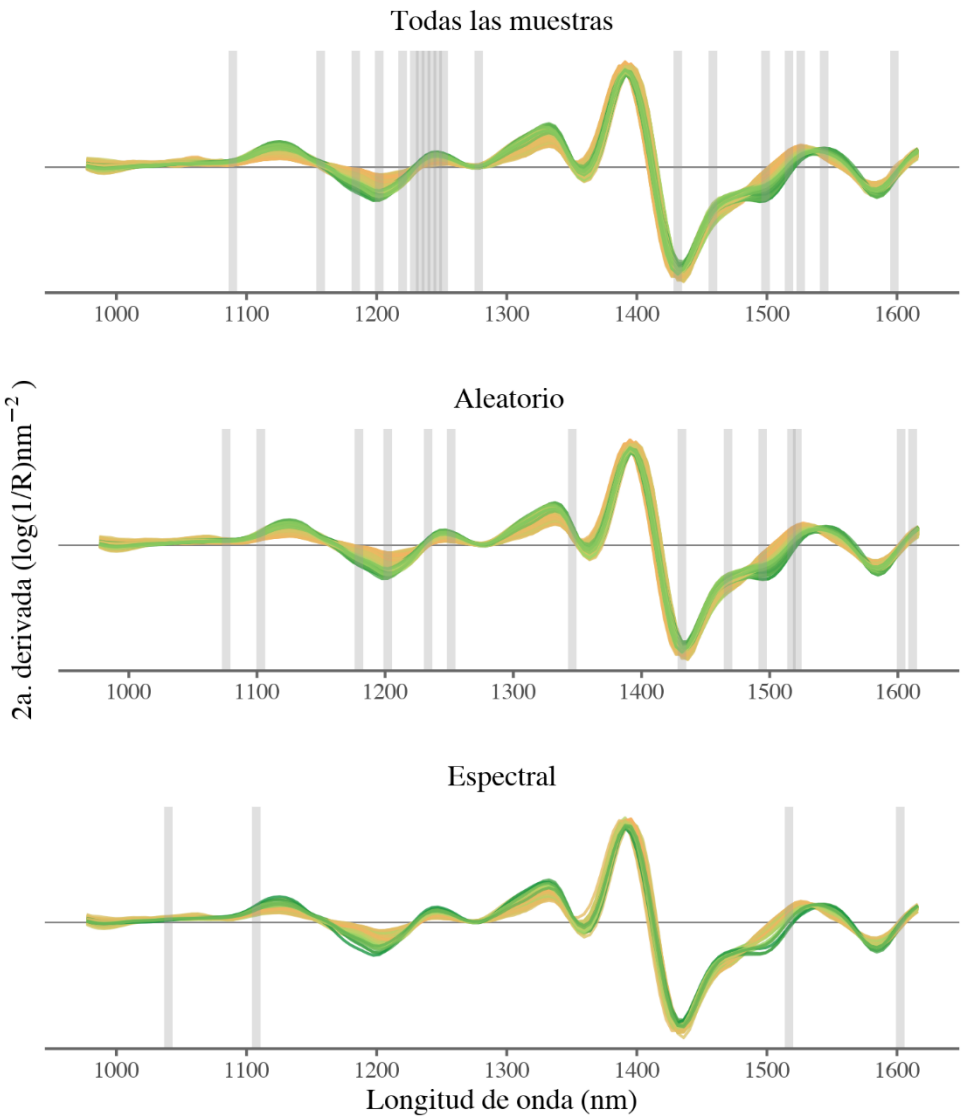


Figura 23. Bandas seleccionadas mediante regresión Stepwise considerando todas las muestras disponibles y para los modelos generados

Cuadro 10. Bandas en nm relevantes seleccionadas por todas las muestras disponibles y los modelos generados

	Todas	**Aleatoria**	**Espectral**
1	1517	1517	1517
2	1229	1251,5	1602,5
3	1251,5	1202	1040
4	1526	1526	1107,5
5	1202	1584,5	
6	1233,5	1233,5	
7	1184	1170,5	
8	1431,5	1530,5	
9	1278,5	1499	
10	1499	1395,5	
11	1458,5	1328	
12	1238	1346	
13	1157	1314,5	
14	1089,5	1368,5	
15	1242,5	1449,5	
16	1598	1035,5	
17	1544	1616	
18	1220	1611,5	
19	1247		

5. DISCUSIÓN

5.1 KJELDAHL-DUMAS

Dado que la relación promedio entre N-Kjeldahl y N-Dumas fue de 0,90, de acuerdo con Simonne et al. (1997), no habría problemas prácticos en utilizar Dumas para estimar proteína cruda en muestras de forraje de campo natural. De todas formas, sí se encontraron diferencias entre ambas medidas, por lo que llama a la atención que las predicciones de los modelos Gramíneas y Forrajeras, que fueron calibrados en base a N estimado por Kjeldahl, tiendan a sobrestimar los valores de PC (sesgo<0) cuando se utilizó Dumas para los valores de referencia. Si se considerara en base a Kjeldahl, los modelos resultan aún más inexactos con un mayor sesgo, aumentando el SEP. Este comportamiento podría estar asociado a que las muestras utilizadas para calibrar los modelos de Gramineas y Forrajeras seguramente presentaron valores más altos de PC. También debe tenerse en cuenta que solo se compararon las técnicas con las muestras de Simulación que, a diferencia de los otros grupos, fueron tomadas mediante la técnica de “hand-plucking”.

5.2 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS PREEXISTENTES

La mejor predicción lograda con el modelo de Forrajeras que con el de Gramíneas puede relacionarse a que, al ser calibrado con una mayor variedad de forrajes es más robusto. Esto también se ve reflejado en el comportamiento más homogéneo en la predicción de los distintos componentes. Sin embargo, aproximadamente 34% del SEP de Forrajeras (0,5%PC) está dado por un sesgo negativo. La buena predicción de Gramíneas para muestras de forraje verde podría asociarse a que el tipo de muestra evaluado sea similar a las utilizadas en su calibración.

No se encontró información precisa sobre las muestras de calibración del modelo de Perten, pero normalmente los modelos precargados en los equipos son “universales", abarcando un alto número de muestras de varios tipos (Williams, 2001). En vista de los resultados obtenidos, podría pensarse que no se usaron muestras de forrajes que sean similares a forraje seco de campo natural para calibrarlo, ni tampoco con alta proporción de tallos e inflorescencias.

5.3 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS CALIBRADOS

Todos los nuevos modelos generados para la predicción de PC con muestras de forraje de campo natural fueron considerablemente más precisos y exactos (menor SEP y sesgo) que los preexistentes para forrajes. En comparación al modelo Aleatorio, el modelo Espectral presentó mayor error de predicción, que puede estar asociado al reducido número de muestras seleccionadas para la calibración (n=47). Es probable que no haya logrado contemplar toda la variación en el total de las muestras. Esto puede suceder debido

a que, cuando dos muestras presentan espectros que son similares a lo largo del rango de longitudes de onda medidos, el método selecciona solo una de ellas para la calibración. Williams (2001) señala ciertas consideraciones de por qué las muestras seleccionadas no siempre resultan en las mejores calibraciones, dentro de las que se destaca:

1. Las variaciones en las bandas espectrales pueden estar afectadas por factores no relacionados a la composición química de la muestra, pero que influyen en la selección de las muestras (como el tamaño de partícula).

2. Las diferencias entre espectros de composición muy diferentes pueden ser muy sutiles, y muestras que son eliminadas del grupo de calibración por poseer espectros muy similares pueden ser de composición bien diferente.

3. Puede existir interferencia de otros constituyentes que afecten la selección.

Aunque para el modelo Espectral se realizó la selección a partir de los espectros derivados, suavizados y normalizados para minimizar el efecto de partícula, debe tenerse en cuenta que los algoritmos no logran una remoción perfecta de estos efectos (Shenk y Westerhaus, 1994). De todas formas, la selección de muestras por características espectrales puede resultar muy útil para minimizar costos al realizarse menos análisis químicos (solo de las muestras para calibrar, Williams 2001, Shetty et al., 2012). Debe mencionarse que existen otros algoritmos que realizan este tipo de selección que no fueron evaluados en el trabajo (Shetty et al. 2012, Stevens et al. 2020).

Los métodos de referencia (Kjeldahl y Dumas) tienen un error de estimación que puede estar limitando los resultados de las calibraciones NIRS (Murray, 1993). En este caso solo se volvió a repetir el análisis Dumas en algunas muestras (n=55), evidenciando error en los valores de referencia. De realizarse nuevos análisis y corregir estos valores seguramente se obtendrían mejores calibraciones y predicciones.

Debe tenerse en cuenta que también existe un error asociado a la lectura óptica del equipo NIRS; aunque en general es inferior al error de los métodos de referencia (Murray 1993, Williams 2001), al no hacerse al menos un duplicado de las lecturas no puede estimarse para estos equipos y muestras. Un factor que puede influir en este aspecto es la molienda de las muestras; cuanto más fina el error de predicción con NIRS tiende a ser menor (Norris et al., 1976). Además, para componentes más fibrosos, como restos secos y tallos, la molienda no es uniforme y pueden quedar fragmentos más largos (Williams, 2001). Según Williams (2001), hasta un 60-70% del error de predicción puede estar relacionado al procedimiento de preparación de las muestras.

Los errores mencionados pueden afectar la representatividad de las muestras seleccionadas para la calibración del modelo Espectral, además de asociar valores de PC inexactos a los espectros de esas muestras. En general podría esperarse que las

calibraciones de muestras seleccionadas con este tipo de algoritmos resultasen en mejores predicciones que con selecciones completamente aleatorias (Shetty et al., 2012).

Dentro de los modelos calibrados, el que resultó en las mejores predicciones, y el único que cumple con el criterio establecido (SEP<1), fue el modelo validado únicamente con las muestras de Simulación. El mejor desempeño de este modelo puede deberse a que fue calibrado con un gran número de muestras (n=652) y contemplando una gran variabilidad de regiones y en diferentes momentos climáticos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que solo evaluó muestras de forraje verde y seco, por lo que no se sabe cómo puede desempeñarse con muestras completas o de tallos, ni de muestras fertilizadas. Otro aspecto a mencionar es que, debido a la metodología de toma de las muestras (hand-plucking), lo más probable es que haya poca contaminación con suelo o mantillo, pero también poca inclusión de estructuras de tallos y vainas que tienden a presentar mayor error de predicción en los modelos. Este grupo de muestras obtuvo mejores predicciones para varios de los modelos (Figuras 14, 15, 17 y 18) que los otros grupos de muestras, y hasta incluso dentro de los criterios definidos (modelo Aleatorio, Figuras 17 y 18).

El mayor error reportado se dio cuando se validó con las muestras del experimento de Diferimiento. Es muy probable que esto sea explicado en que este grupo presenta un rango más amplio de valores de PC que las muestras utilizadas para calibrar, alcanzando valores más altos. Además, comprende muestras completas únicamente, que no fueron contempladas en la calibración ya que las muestras de Simulación y Experimento están divididas en componentes (forraje verde, forraje seco, y tallos).

Al ver las diferencias entre las predicciones de los modelos Gramíneas y Forrajeras, y entre los modelos con validación independiente, puede verse la relevancia de la composición de las muestras de calibración y de validación en el error de predicción. También puede observarse una mayor variación en el SEP del modelo Aleatorio (en la amplitud del intervalo de confianza), ya que una desventaja de la selección completamente aleatoria, es que existe la posibilidad de perder alguna fuente de variación en las muestras de calibración (Shetty et al., 2012).

5.4 BANDAS

De acuerdo con lo esperado, la principal banda de absorción seleccionada, 1517 nm (Cuadro 10, Figura 23), corresponde al primer sobretono de la absorción de enlaces N-H de grupos amida (Curran, 1989). En esta zona (aproximadamente 1500-1530 nm, según Workman y Weyer, 2008) se ve un claro orden de las muestras según la concentración de PC (Figura 11). Sin embargo, no aparecen como muy relevantes bandas cercanas a 980-1020 nm, que corresponde al segundo sobretono para ese enlace (Curran 1989, Workman y Weyer 2008). Esto puede deberse en parte a una señal más débil, y que

puede existir superposición e interferencia de otras bandas de absorción (Curran 1989, Kokaly 2001), o que esté muy correlacionada con la banda ya seleccionada.

Además, la porción del espectro con longitudes de onda menores a 1100 nm no presenta importantes variaciones y ya no se ve un orden de las muestras según el contenido de PC como en el resto del espectro (Figura 11). Puede estar generándose una interferencia por la presencia de ceras, que tienen absorción en torno a 1040 nm (Elvidge, 1990) y pueden acumularse como respuesta al estrés hídrico (Akıncı y Lösel, 2012). También puede haber interferencia de sílice (bajo la forma $Si(OH)_4$), que según Smis et al. (2014), presenta una importante banda centrada en 1050 nm. Es más acumulado por gramíneas que otras familias, existiendo además variación entre especies y partes de la planta (Jones y Handreck 1967, McNaughton et al. 1985, Hodson et al. 2005, De Melo et al. 2010). Debe tenerse en cuenta que normalmente la relación señal/ruido es menor en los extremos del rango que mide el equipo (Durante et al., 2014).

Las absorciones relacionadas a enlaces N-H puede variar en función de a qué grupo funcional pertenece, a que otros átomos está asociado y la matriz donde se encuentra (Workman y Weyer, 2008). Además, a mayor concentración pueden ampliar la porción del espectro que abarcan y moverse a mayores longitudes de onda (Kokaly 2001, Workman y Weyer 2008). Las bandas de 1602,5 y 1611 nm también estarían relacionadas a este tipo de enlaces (Workman y Weyer, 2008).

Otras bandas relevantes son aquellas asociadas a enlaces C-H de componentes de la fracción fibra, como celulosa, hemicelulosa y lignina, entorno a 1200 nm y 1450 nm (Curran 1989, Elvidge 1990, Cuadro 10, Figura 23). La concentración de estas sustancias estaría correlacionada con el contenido de PC, asociado a las proporciones de “componente estructural” y “componente metabólico” que explican en parte el efecto de dilución (Lemaire y Bélanger, 2020).

5.5 CONSIDERACIONES PRÁCTICAS Y SUGERENCIAS

De acuerdo con lo discutido en esta sección, existen puntos a mejorar en la metodología que pueden estar afectando la calidad de las calibraciones, que si se corrigen podría disminuirse el error de predicción de los modelos. En primer lugar, se debe estandarizar el procesamiento y presentación de las muestras, asegurando un correcto secado de las mismas e incluso, realizar una molienda más fina. En relación a este punto, realizar las lecturas NIRS inmediatamente luego del secado previo a realizar otros análisis y “gastar” parte de la muestra, y pasar las muestras más de una vez para estimar el error de lectura del equipo. En segundo lugar, realizar más de una vez el análisis químico para obtener un valor de referencias más certero, cuando el tamaño de la muestra así lo permita, y también estimar el error del análisis.

Puede ser útil estandarizar la metodología de muestreo de forraje a campo mediante un protocolo que incorpore la técnica “hand-plucking”. Las muestras que fueron tomadas mediante esta metodología (grupo Simulación) presentaron consistentemente mejores predicciones, tanto para forraje verde como para forraje seco, comprendiendo 32 establecimientos del norte de Uruguay en dos períodos con situaciones climáticas contrastantes. Una ventaja que presenta este tipo de muestreo es que la composición de las muestras es más representativa de lo que cosecha el animal en comparación al forraje disponible. Para muestras que no fueran tomadas mediante este método debería evitarse muestras de forraje seco.

Una de las mayores limitantes prácticas para la implementación de los modelos generados es que todos presentan un mayor error relativo para los valores más bajos (<10% PC), tendiendo a sobreestimar (Figura 19 y Anexos 6 - 9). Es probable que situaciones que presenten limitaciones para la producción animal no sean identificadas y que por lo tanto no puedan tomarse las decisiones de manejo necesarias (como fertilización, suplementación, asignación de categorías, etc.).

Debe tenerse en cuenta que las muestras completas que forman parte de los modelos corresponden únicamente al grupo de Diferimiento. Dadas las condiciones de crecimiento del experimento y que los tratamientos fueron monoespecíficos, muchas de estas muestras pueden diferir bastante de una muestra de campo natural “a campo”, ya sea por alta concentración de PC (resultado de la fertilización) así como por la alta acumulación de restos secos en los periodos de diferimiento más prolongados (más similar a muestras de forraje seco de otros grupos). En vista del mayor error reportado para forraje seco, podría esperarse que la relación verde/seco tenga un efecto sobre el error de predicción en muestras completas, el cual sería interesante poder evaluar.

Considerando lo reportado por Smith y Flinn (1991), Shenk y Westerhaus (1993) y el buen comportamiento del modelo de Forrajeras para los distintos tipos de muestras, puede ser una buena opción recalibrar este modelo incluyendo las muestras de forraje de campo natural y luego evaluar si mejora la predicción (sin afectar la predicción para los otros tipos de muestras). O por el contrario, generar modelos aún más específicos para cada tipo de muestra o componente del forraje. Además, probablemente puedan generarse mejores predicciones con el equipo FOSS, ya que éste presenta una mayor resolución y rango de lectura, pudiendo medir bandas de absorción de enlaces N-H más fuertes en 2054 y 2172 nm, además de la clorofila en la porción visible (Kokaly, 2001). Sería interesante comparar modelos calibrados con las mismas muestras en los diferentes equipos. También evaluar qué bandas son las más relevantes para Gramíneas y Forrajeras, y ver las diferencias y similitudes entre ellos y con los modelos para muestras de forraje de campo natural.

Otra posible aplicación de NIRS es como complemento a otros análisis. Por ejemplo, como se hizo en este trabajo, para seleccionar muestras para reanalizar según el

desvío de la predicción, bajando costos y el tiempo requerido para obtener valores más exactos. Además, se aprovecha una de las ventajas de NIRS: la versatilidad de acumular las lecturas para nuevas calibraciones a futuro y combinar con otros tipos de muestras.

6. CONCLUSIONES

Se comprobó que para muestras de forraje de campo natural Dumas cuantifica valores superiores de N que Kjeldahl. Sin embargo, esta diferencia no es lo suficientemente grande como para impedir su uso para estimar la concentración de PC. Además, debido a que están altamente relacionados, podrían estimarse valores de uno en base a valores del otro, mediante un modelo intercalibrado.

Se logró realizar adecuadas predicciones del contenido de PC de forrajes de campo natural utilizando NIRS. Los mejores resultados de los modelos específicos sugieren que las muestras de forraje de campo natural tienen una relación diferente entre su concentración de PC y sus características espectrales que los forrajes utilizados para calibrar los otros modelos evaluados.

Las mayores limitantes de predicción de los modelos generados están dadas para las muestras con las menores concentraciones de PC, en particular muestras con alta proporción de forraje seco y de tallos.

7. RESUMEN

Se evaluó el uso de la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) para la estimación de la concentración de proteína cruda (PC) en muestras de forraje de campo natural. El objetivo del trabajo fue evaluar si esta tecnología es lo suficientemente precisa para remplazar los métodos convencionales para la cuantificación de N para PC (Kjeldahl y Dumas). NIRS ha sido implementada de forma exitosa para predecir el contenido de PC en otros forrajes, sin embargo, no existe conocimiento sobre cómo se comportaría frente a muestras de forraje de campo natural. Se evaluaron 3 modelos disponibles para predecir PC en forrajes a partir de NIRS y se compararon con nuevos modelos específicos generados con muestras de forraje de campo natural. La evaluación se basó principalmente en el error estándar de predicción (SEP) de los modelos (expresado como %PC y error relativo) a nivel general y para los distintos tipos de muestra (forraje verde, forraje seco, tallos y vainas, y muestras completas). La mejor predicción de los modelos disponibles fue con "Forrajeras", con SEP=1,85 (26% de error relativo), mientras que para el mejor modelo específico ("Aleatorio") SEP=1,18 (13% de error relativo). Los nuevos modelos pueden contribuir a realizar análisis de PC del forraje de campo natural, más rápidos y de menor costo, facilitando la toma de decisiones de manejo de campo natural.

Palabras clave: Proteína cruda; NIRS; Forraje; Campo natural; Espectroscopía; Nitrógeno.

8. SUMMARY

Near infrared spectroscopy (NIRS) was evaluated to estimate the crude protein (CP) concentration in native grasslands forage samples. The aim of this study was to evaluate whether this technology is precise enough to replace the conventional methods for CP quantification (Kjeldahl and Dumas). NIRS has been implemented successfully for CP prediction in other kinds of forages, however, there is no knowledge of how it performs for native grasslands forage samples. The available models were tested for NIRS CP prediction in forages and compared to specific models generated from native grasslands forage samples. The evaluation was based mainly on the models' standard error of prediction (SEP) (both in terms of %CP and relative error) at the general level and for the different sample types (green leaves, stems, sheaths, dead forage, and whole samples). The best prediction of the available models was "Forrajeras", with SEP=1,85 (26% relative error), while for the best specific model ("Aleatorio", random selected) SEP=1,18 (13% relative error). Good predictions would mean that faster, cheaper analyses could be made, facilitating precise management decisions.

Keywords: Crude protein; NIRS; Forage; Natural field; Spectroscopy; Nitrogen.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akıncı, Ş.; Lösel, D. M. 2012. Plant water-stress response mechanisms. In: Rahman, I. M.; Hasegawa, H. eds. Water stress. Rijeka, InTech. pp.15-42.

2. Allegri, M. 1979. Mejoramientos de pasturas. In: Jornada Ganadera de Suelos Arenosos (2ª., 1979, Tacuarembó). Memorias. Tacuarembó, CIAAB. pp. 8-10.

3. Alomar, D.; Fuchslocher, R. 1998. Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. Agro Sur. 26(1):88-104.

4. AOAC (Association of Official Agricultural Chemists, US). 1984. Official Methods of Analysis: Kjeldahl method (2.062). 14th. ed. Washington, D. C. 114 p.

5. _____. 2005. Official Methods of Analysis: Dumas method (990.03). 15th. ed. Washington, D. C. 26 p.

6. Arnold, G. W. 1964. Some principles in the investigation of selective grazing. Australian Society of Animal Production. 5:258-27.

7. Ayala, W.; Carriquiry, E.; Carámbula, M. 1993. Caracterización y estrategias de utilización de pasturas naturales en la región Este. In: Jornada de Campo Natural (1993, Treinta y Tres). Campo natural: estrategia invernal, manejo y suplementación. Montevideo, INIA. pp. 1-28 (Actividades de Difusión no. 49).

8. _____.; Bermúdez, R. 2005. Estrategias de manejo en campos naturales sobre suelos de lomadas en la región Este. In: Seminario de Actualización Técnica en Manejo de Campo Natural (2005, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 41-50 (Serie Técnica no. 151).

9. Baeza, S.; Paruelo, J. M. 2020. Land use/land cover change (2000–2014) in the Rio de la Plata grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. (en línea). Remote Sensing. 12(3):381. Consultado oct. 2020. Disponible en https://doi.org/10.3390/rs12030381

10. Ballaré, C. L.; Scopel, A. L.; Sanchez, R. A. 1997. Foraging for light/ photosensory ecology and agricultural implications. Plant, Cell & Environment. 20(6):820-825.

11. Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S.; Lister, S. J. 1989. Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. Applied Spectroscopy. 43(5):772–777.

12. Bermúdez, R.; Ayala, W. 2005. Producción de forraje de un campo natural de la zona de lomadas del Este. In: Seminario de Actualización Técnica en Manejo de Campo Natural (2005, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 33-39 (Serie Técnica no. 151).

13. Berretta, E. J.; Formoso, D.; Carbajal, C. M.; Fernández, J.; Gabachutto, I. R. 1990. Producción y calidad de diferentes especies forrajeras nativas en condiciones de campo. In: Seminario Nacional de Campo Natural (2°., 1990, Tacuarembó). Trabajos presentados. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 49-62.

14. _____. 1996. Campo natural: valor nutritivo y manejo. In: Risso, D.; Berretta, E.; Morón, A. eds. Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. pp. 113 - 125 (Serie Técnica no. 80).

15. Blaxter, K. L.; Wilson, R. S. 1962. The voluntary intake of roughages by steers. Animal Science. 4(3):351-358.

16. Bolton, J. K.; Brown, R. H. 1980. Photosynthesis of grass species differing in carbon dioxide fixation pathways: V. Response of *Panicum maximum*, *Panicum milioides*, and tall fescue (*Festuca arundinacea*) to nitrogen nutrition. Plant Physiology. 66(1):97-100.

17. Caloin, M.; Yu, O. 1984. Analysis of the time course of change in nitrogen content in *Dactylis glomerata* L. using a model of plant growth. Annals of Botany. 54(1):69-76.

18. Carámbula, M. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. Montevideo, INIA. 49 p. (Serie Técnica no. 19).

19. Carvalho da Paz, C.; Maciel, A. G.; do Rêgo, A. C. 2019. Use of near infrared spectroscopy for the evaluation of forage for ruminants. Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences. 62:1-8.

20. Chacon, E.; Stobbs, T. 1976. Influence of progressive defoliation of a grass sward on the eating behaviour of cattle. Australian Journal of Agricultural Research. 27(5):709-727.

21. Cherney, D. J. R.; Mertens, D. R. 1998. Modelling grass utilization for dairy cows. In: Cherney, J. H.; Cherney, D. J. R. eds. Grass for Dairy Cattle. Wallingford, Oxon, UK, CAB International. pp. 351-371.

22. _____. 2000. Characterization of Forages by Chemical Analysis. In: Givens, D. I.; Owen, E.; Axford, R. F. E.; Omendi, H. M. eds. Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford, CABI. pp. 281 - 300.

23. Cozzolino, D.; Acosta, Y.; García, J. 2001. Application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. (en línea). In: International Grasslands Congress (19th., 2001, San Pablo, Brasil). Proceedings. Piracicaba, Brasil, FEALQ. s.p. Consultado sept. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Cozzolino/publication/268263671_APPLICATION_OF_NEAR_INFRARED_REFLECTANCE_SPECTROSCOPY_NIRS_TO_FORAGE_EVALUATION_IN_URUGUAY/links/54c2f21c0cf2911c7a4a6785.pdf

24. _____.; Labandera, M. 2002a. Determination of dry matter and crude protein contents of undried forages by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82(4):380-384.

25. _____. 2002b. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. Agrociencia (Uruguay). 6(2):25-32.

26. _____.; Fassio, A.; Fernández, E. 2003. Investigación-uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. Agricultura Técnica (Chile). 63(4):387-393.

27. _____.; Fernández, E.; Restaino, E. A.; La Manna, A. 2006a. Determinación de la composición química de heno mediante la espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS). Revista Argentina de Producción Animal. 26(1):203-209.

28. _____.; _____.; _____.; _____.; Fassio, A. 2006b. Measurement of chemical composition in wet whole maize silage by visible and near infrared reflectance spectroscopy. Animal Feed Science and Technology. 129(3-4):329-336.

29. Crampton, E. W.; Donefer, E.; Lloyd, L. E. 1960. A nutritive value index for forages. Journal of Animal Science. 19(2):538-544.

30. _____.; Harris, L. E. 1974. Nutrición animal aplicada. 2ª. ed. Zaragoza, Acribia. 756 p.

31. Crawley, M. J. 2005. An introduction using R. London, Wiley. 327 p.

32. Crosland, A. R.; Zhao, F. J.; McGrath, S. P. 2001. Inter-laboratory comparison of sulphur and nitrogen analysis in plants and soils. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 32(5-6):685-695.

33. CSIRO (Commonwealth Industrial and Scientific Research Organization, AU). 2007. Nutrient requirements of domesticated ruminants. Melbourne. 270 p.

34. Curran, P. J. 1989. Remote sensing of foliar chemistry. Remote Sensing of Environment. 30(3):271-278.

35. Davies, A. M. C.; Fearn, T. 2006. Back to basics: calibration statistics. Spectroscopy Europe. 18(2):31-32.

36. Deaville, E. R.; Flinn, P. C. 2000. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. In: Givens, D. I.; Owen, E.; Axford, R. F. E.; Omedi, H. M. eds. Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford, CABI. pp. 301-320.

37. De Melo, S. P.; Monteiro, F. A.; De Bona, F. D. 2010. Silicon distribution and accumulation in shoot tissue of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*. Plant and Soil. 336(1-2):241-249.

38. Dengler, N. G.; Dengler, R. E.; Donnelly, P. M.; Hattersley, P. W. 1994. Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationships. Annals of Botany. 73(3):241-255.

39. De Souza, P. J. 1985. Producción y calidad de pasturas naturales en el Uruguay. Revisión de literatura. In: Seminario Nacional de Campo Natural (1°., 1985, Melo). Trabajos presentados. s.n.t. p. 12.

40. De Vries, M. W. 1995. Estimating forage intake and quality in grazing cattle: a reconsideration of the hand-plucking method. Journal of Range Management. 48(4):370-375.

41. Durante, M.; Oesterheld, M.; Piñeiro, G.; Vassallo, M. M. 2014. Estimating forage quantity and quality under different stress and senescent biomass conditions via spectral reflectance. International Journal of Remote Sensing. 35(9):2963-2981.

42. Duru, M.; Lemaire, G.; Cruz, P. 1997. Grasslands. In: Lemaire, G. ed. Diagnosis of the nitrogen status in crops. Berlin, Springer. pp. 59-72.

43. Etheridge, R. D.; Pesti, G. M.; Foster, E. H. 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. Animal Feed Science and Technology. 73(1-2):21-28.

44. Fisher, D. S.; Burns, J. C.; Moore, J. E. 1995. The nutritive evaluation of forage. In: Barnes, R. F.; Miller, D. A.; Nelson, C. J. eds. Forages. Ames, Iowa, Iowa State University Press. v. 1, pp. 105-115.

45. _____. 2002. A Review of a Few Key Factors Regulating Voluntary Feed Intake in Ruminants 1. Crop Science. 42(5):1651-1655.

46. Formoso, F.; Allegri, M. 1983a. Producción de forraje, digestibilidad y proteína de gramíneas subtropicales en suelos arenosos y rastrojos de arroz en la región Noreste de Uruguay. Investigaciones Agronómicas. 4:38-45.

47. _____.;_____. 1983b. Producción de pasturas en suelos del área Caraguatá-Las Toscas. In: Jornada Agrícola-Ganadera de Caraguatá (1983, Tacuarembó). Memorias. Tacuarembó, CIAAB. pp. 43-62.

48. _____. 2005. La investigación en utilización de pasturas naturales sobre cristalino desarrollada por el Secretariado Uruguayo de la Lana. In: Seminario de Actualización de Técnica de Manejo de Campo Natural (2005, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 51-59 (Serie Técnica no. 151).

49. García, J.; Cozzolino, D. 2006. Use of near infrared reflectance (nir) spectroscopy to predict chemical composition of forages in broad-based calibration models. Agricultura Técnica. 66(1):41-47.

50. Greenwood, D. J.; Lemaire, G.; Gosse, G.; Cruz, P.; Draycott, A.; Neeteson, J. J. 1990. Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass. Annals of Botany. 66(4):425-436.

51. Hastie, T.; Tibshirani, R.; Friedman, J. 2009. The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction. 2nd. ed. Berlín, Springer. 745 p.

52. Heitschmidt, R. K.; Gordon, R. A.; Bluntzer, J. S. 1982. Short duration grazing at the Texas Experimental Range: effects on forage quality. Journal of Range Management. 35(3):372-374.

53. Hendricksen, R.; Minson, D. J. 1980. The feed intake and grazing behaviour of cattle grazing a crop of Lablab purpureus cv. Rongai. The Journal of Agricultural Science. 95(3):547-554.

54. Hennberg, W.; Stohmann, F. 1859. Uber das Erhaltungsfutter volljahrigen Rindviehs. Journal der Landwirtschaft. (3):485-551.

55. Hennessy, D.W. 1983. Improved production from grazing cattle when given protein. South African Journal of Animal Science. 13(1):9-11.

56. Hodson, M. J.; White, P. J.; Mead, A.; Broadley, M. R. 2005. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. Annals of Botany. 96(6):1027-1046.

57. Illius, A. W.; Allen, M. S. 1994. Assessing forage quality using integrated models of intake and digestion by ruminants. In: National Conference on Forage Quality, Evaluation, and Utilization (1994, Lincoln, Nebraska, US). Proceedings. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America. pp. 869-890.

58. Jones, L. H. P.; Handreck, K. A. 1967. Silica in soils, plants, and animals. Advances in Agronomy. 19(2):107-149.

59. Kawamura, K.; Watanabe, N.; Sakanoue, S.; Inoue, Y. 2008. Estimating forage biomass and quality in a mixed sown pasture based on partial least squares regression with waveband selection. Grassland Science. 54(3):131-145.

60. Kokaly, R. F.; Clark, R. N. 1999. Spectroscopic determination of leaf biochemistry using band-depth analysis of absorption features and stepwise multiple linear regression. Remote Sensing of Environment. 67(3):267-287.

61. _____. 2001. Investigating a physical basis for spectroscopic estimates of leaf nitrogen concentration. Remote Sensing of Environment. 75(2):153-161.

62. Lee, G. J.; Hennessy, D. W.; Williamson, P. J.; Nolan, J. V.; Kempton, T. J.; Leng, R. A. 1985. Responses to protein meal supplements by lactating beef cattle given a low-quality pasture. Australian Journal of Agricultural Research. 36(5):729-741.

63. Lemaire, G.; Denoix, A. 1987. Croissance estivale en matière sèche de peuplements de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) et de dactyle (*Dactylis glomerata* L.) dans l'Ouest de la France. II. Interaction entre les niveaux d'alimentation hydrique et de nutrition azotée. Agronomie. 7(6):381-389.

64. _____.; Gastal, F. 1997. N uptake and distribution in plant canopies. In: Lemaire, G. ed. Diagnosis of the nitrogen status in crops. Berlin, Springer. pp. 3-43.

65. _____.; Bélanger, G. 2020. Allometries in plants as drivers of forage nutritive value: a review. Agriculture. 10(1):1-17.

66. Li, Y. S.; Redmann, R. E.; Van Kessel, C. 1992. Nitrogen budget and 15 N translocation in a perennial wheatgrass. Functional Ecology. 6(2):221-225.

67. McNaughton, S. J.; Tarrants, J. L.; McNaughton, M. M.; Davis, R. D. 1985. Silica as a defense against herbivory and a growth promotor in African grasses. Ecology. 66(2):528-535.

68. Madeira, W.; Jaurena, M.; Díaz, S.; Lattanzi, F.; Giorello, D.; Cardozo, G. 2018. Evidencias de co-limitación nitrógeno-fósforo en la producción de forraje de un campo natural en Uruguay. (en línea). In: Congreso Nacional de Manejo de Pastizales Naturales (8º.), Congreso Internacional de Manejo de Pastizales Naturales (4º., 2018, Tacuarembó). Resúmenes. Montevideo, INIA. pp. 136-137. Consultado nov. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/323074591_Evidencias_de_co-limitacion_nitrogeno-fosforo_en_la_produccion_de_forraje_de_un_campo_natural_en_Uruguay

69. Mertens, D. R. 1994. Regulation of forage intake. In: National Conference on Forage Quality, Evaluation, and Utilization (1994, Lincoln, Nebraska, US). Proceedings. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America. pp. 450 - 493.

70. Mevik, B. H.; Wehrens, R.; Liland, K. H.; Mevik, M. B. H.; Hiemstra, P. 2020. PLS: Partial Least Squares and Principal Component Regression. (en línea). Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 24 p. Consultado oct. 2020. Disponible en https://cran.r-project.org/web/packages/pls/index.html

71. Mieres, J.; Assandri, L.; Cúneo, M. 2004. Tablas de valor nutritivo de alimentos. In: Mieres, J. ed. Guía para la alimentación de rumiantes. Montevideo, INIA. pp. 13-68 (Serie Técnica no. 142).

72. Minson, D. J.; Milford, R. 1967. The voluntary intake and digestibility of diets containing different proportions of legume and mature pangola grass (*Digitaria decumbens*). Australian Journal of Experimental Agriculture. 7(29):546-551

73. _____. 1990. Forages in Ruminant Nutrition. New York, Academic Press. 483 p.

74. Montossi, F.; Berretta, E. J.; Pigurina, G.; Santamarina, I.; Bemhaja, M.; San Julián, R.; Risso, D. F.; Mieres, J. 2000. Estudio de la selectividad de ovinos y vacunos en diferentes comunidades vegetales de la región de basalto. In: Seminario de Actualización en Tecnologías para Basalto (2000, Tacuarembó). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 257 - 285 (Serie Técnica no. 102).

75. Morón, A.; García, A.; Sawchik, J.; Cozzolino, D. 2007. Preliminary study on the use of near-infrared reflectance spectroscopy to assess nitrogen content of undried wheat plants. Journal of the Science of Food and Agriculture. 87(1):147-152.

76. Mott, G. O. 1973. Evaluating forage production. In: Hughes, H. D.; Heath, M. E.; Metcalfe, D. S. eds. Forages: the Science of Grassland Agriculture. 2nd. ed. Ames, Iowa, Iowa State University. pp. 108-118.

77. Müller, J. 2017. ¿Dumas o Kjeldahl para el análisis de referencia?: comparación y consideraciones para el análisis del nitrógeno/las proteínas de los alimentos y el pienso. (en línea). Barcelona, FOSS. 5 p. Consultado 11 mar. 2020. Disponible en https://www.fossanalytics.com/-/media/files/documents/papers/laboratories-segment/the-dumas-method-for-nitrogenprotein-analysis_es.pdf

78. Murray, I. 1993. Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: Davies, A.; Baker, R. D.; Grant, S. A.; Laidlaw, A. S. eds. Sward measurement handbook. Hurley, UK, The British Grassland Society. pp. 285-312.

79. Norris, K. H.; Barnes, R. F.; Moore, J. E.; Shenk, J. S. 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. Journal of Animal Science. 43(4):889-897.

80. Oertli, J. J. 1966. Use of optical spectroscopic N 15-analyses to trace a specific nitrogen application in tobacco plants. Plant and Soil. 25(1):49-64.

81. Olmos, F. 1992. Aportes para el manejo de campo natural: efecto de la carga animal y el período de descanso en la producción y evolución de un campo natural de Caraguatá (Tacuarembó). Montevideo, INIA. 40 p. (Serie Técnica no. 20).

82. Osborne, B. G. 2006. Near-infrared spectroscopy in food analysis. In: Meyer, R. A. ed. Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. London, Wiley. pp. 1-14

83. Piaggio, L.; Prates, E. R.; Rinaldi, C.; Soca, P. 1995. Diet quality and diet selection of steers grazing in a rotational system at four levels of forage allowance on a rangeland. Annales de Zootechnie. 44(1):119-119.

84. Pigurina, G.; Acosta, Y.; Bassewitz, H.; Methol, M.; Mieres, J. 1991. Guía para la alimentación de rumiantes. Montevideo, INIA. 56 p. (Serie Técnica no. 5).

85. Poppi, D. P.; Hughes, T. P.; L'huillier, P. J. 1987. Intake of pasture by grazing ruminants. In: Nicol, A. M. ed. Livestock feeding on pasture. Hamilton, New Zealand Society of Animal Production. pp. 55-64 (Occasional Symposium no. 10)

86. _____.; McLennan, S. R. 1995. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. Journal of Animal Science. 73(1):278-290.

87. _____.; _____.; Bediye, S.; De Vega, A.; Zorrilla-Rios, J. 1997. Forage quality: strategies for increasing nutritive value of forages. In: International Grassland Congress (18th., 1997, Winnipeg y Saskatoon, Canada). Proceedings. Calgary, Alberta, Association Management Center. pp. 307-322.

88. Reid, J. T. 1961. Problems of feed evaluation related to feeding of dairy cows. Journal of Dairy Science. 44(11):2122-2133.

89. Restaino, E. A.; Fernández, E. G.; La Manna, A.; Cozzolino, D. 2009. Prediction of the nutritive value of pasture silage by near infrared spectroscopy (NIRS). Chilean Journal of Agricultural Research. 69(4):560-566.

90. Reussi Calvo, N. I.; Echeverría, H. E.; Rozas, H. S. 2008. Comparación de métodos de determinación de nitrógeno y azufre en planta: implicancia en el diagnóstico de azufre en trigo. Ciencia del Suelo. 26(2):161-167.

91. Risso, D. F.; Berretta, E. J. 1996. Mejoramiento de campos en suelos sobre cristalino. In: Risso, D.; Berretta, E.; Morón, A. eds. Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. pp. 193 - 211 (Serie Técnica no. 80).

92. Rovira, J. 2008. Manejo nutritivo de los rodeos de cría en pastoreo. Montevideo, Hemisferio Sur. 336 p.

93. Saldanha, S. 2005. Manejo del pastoreo en campos naturales sobre suelos medios de basalto y suelos arenosos de cretácico. In: Seminario de Actualización Técnica en Manejo de Campo Natural (2005, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 75-84 (Serie Técnica no. 151).

94. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. Analytical Chemistry. 36(8):1627-1639.

95. Schmitter, B. M.; Rihs, T. 1989. Evaluation of a macrocombustion method for total nitrogen determination in feedstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 37(4):992-994.

96. Shenk, J. S.; Westerhaus, M. O. 1991a. Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. Crop Science. 31(2):469-474.

97. _____.; _____. 1991b. Populations structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. Crop Science. 31(6):1548-1555.

98. _____.; _____. 1993. Near infrared reflectance analysis with single and multiproduct calibrations. Crop Science. 33(3):582-584.

99. _____.; _____. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: Fahey, G. C. ed. Forage quality, evaluation, and utilization. New York, McGraw-Hill. pp. 406-449.

100. Shetty, N.; Rinnan, Å.; Gislum, R. 2012. Selection of representative calibration sample sets for near-infrared reflectance spectroscopy to predict nitrogen concentration in grasses. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 111(1):59-65.

101. Simeone, A.; Beretta, V. 2002. Destete precoz en ganado de carne. Montevideo, Hemiferio Sur. 118 p.

102. Simonne, A. H.; Simonne, E. H.; Eitenmiller, R. R.; Mills, H. A.; Cresman III, C. P. 1997. Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? Journal of the Science of Food and Agriculture. 73(1):39-45.

103. Simonne, E. H.; McCrimmon, J. N.; Scoggins-Mantero, H. L.; Mills, H. A.; Cresman III, C. P. 1995. Adjustments of sufficiency ranges of selected ornamentals and turfgrasses for assessing nitrogen status with Dumas-N data. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 26(13-14):2243-2251.

104. Simpson, R. J.; Lambers, H.; Dalling, M. J. 1982. Translocation of nitrogen in a vegetative wheat plant (*Triticum aestivum*). Physiologia Plantarum. 56(1):11-17.

105. Smis, A.; Ancin Murguzur, F. J.; Struyf, E.; Soininen, E. M.; Herranz Jusdado, J. G.; Meire, P.; Bråthen, K. A. 2014. Determination of plant silicon content with near infrared reflectance spectroscopy. Frontiers in Plant Science. 5(496):1-9.

106. Smith, K. F.; Flinn, P. C. 1991. Monitoring the performance of a broad-based calibration for measuring the nutritive value of two independent populations of pasture using near infrared reflectance (NIR) spectroscopy. Australian Journal of Experimental Agriculture. 31(2):205-210.

107. Sollenberger, L. E.; Cherney, D. J. R. 1995. Evaluating forage production and quality. In: Barnes, R. F.; Nelson, C. J.; Miller D. eds. Forages. 5th. ed. Ames, Iowa, Iowa State University. v. 2, pp. 97-110.

108. Stevens, A.; Ramirez-Lopez, L.; Hans, G. 2020. Prospectr: Miscellaneous Functions for Processing and Sample Selection of Spectroscopic Data. (en línea). Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 35 p. Consultado oct. 2020. Disponible en https://cran.r-project.org/web/packages/prospectr/index.html

109. Vallentine, J. F. 1990. Grazing management. San Diego, California, Academic Press. 533 p.

110. Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74(10):3583-3597.

111. _____. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. (en línea). 2nd. ed. Ithaca, NY, Cornell University. 476 p. Consultado may. 2020. Disponible en https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/nutricao/livros/NUTRICAO%20DE%20RUMINANTES.pdf

112. Williams, P. C. 2001. Implementation of near infrared technology. In: Williams, P. C.; Norris, K. H. eds. Near infrared technology in the agricultural and food industries. St. Paul, Minnesota, USA, American Association of Cereal Chemists. pp. 145-171.

113. Willoughby, W. M. 1958. A relationship between pasture availability and animal production. Australia Society of Animal Production. 2:42-45.

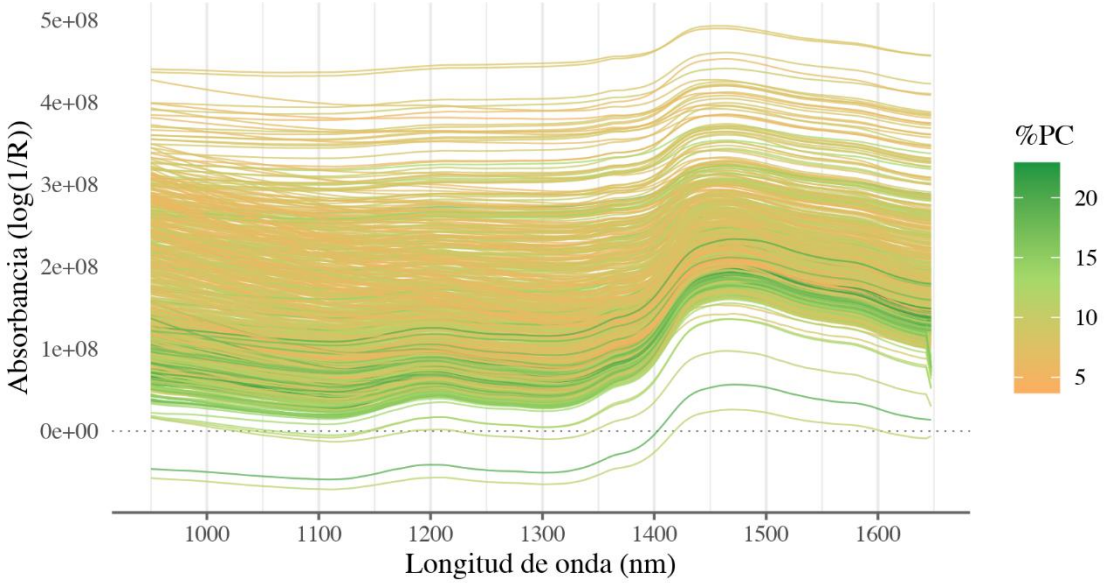
114. Wilson, J. R.; Minson, D. J. 1980. Prospects for improving the digestibility and intake of tropical grasses. Tropical Grasslands. 14(3):253-259.

115. Windham, W. R.; Mertens, D. R.; Barton, F. E. 1989. Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation. In: Marten, G. C.; Shenk, J. S.; Barton, F. E. eds. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality. Springfield, United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. pp. 96-103.

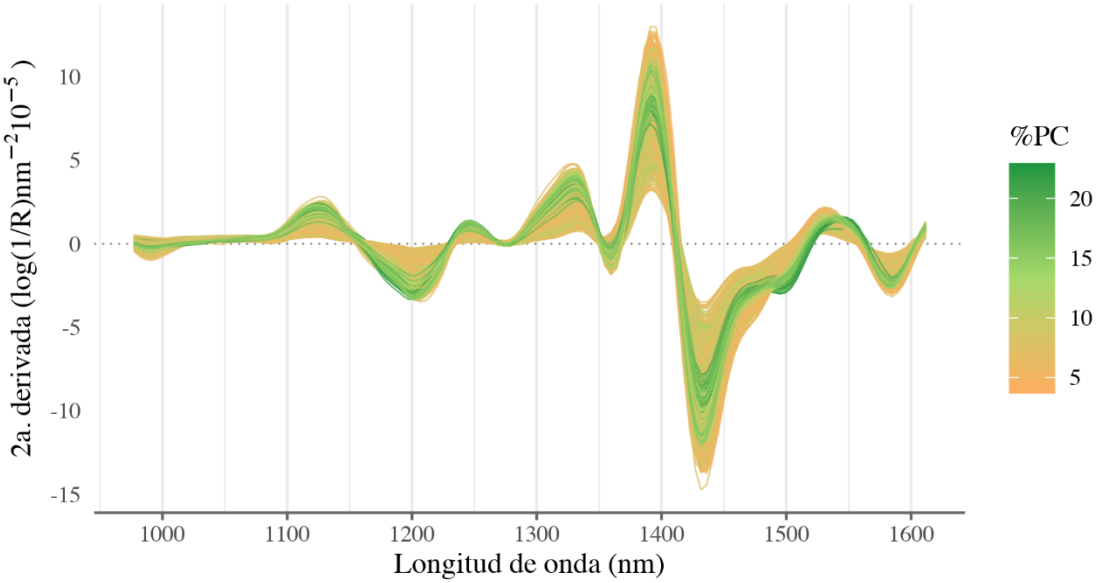
116. Workman, J.; Weyer, L. 2008. Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy. Boca Ratón, FL, CRC. 332 p.

10. ANEXOS

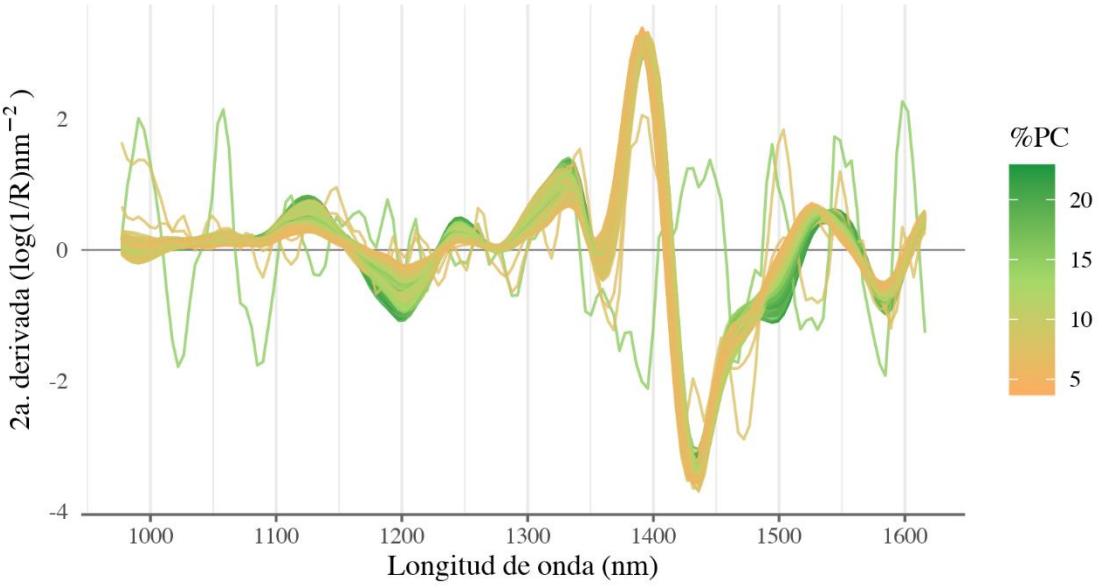
Anexo 1. Log (1/R) de las muestras analizadas en el equipo Perten para la generación de los modelos



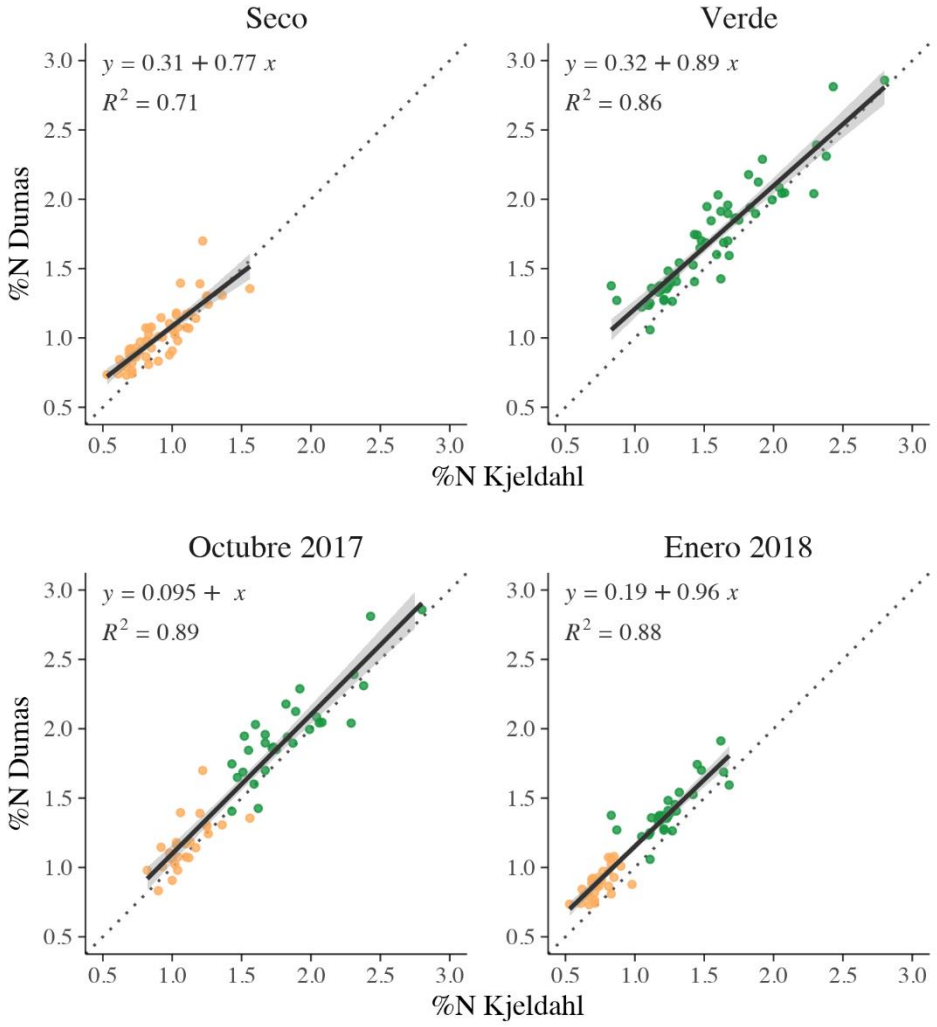
Anexo 2. Derivada segunda del log (1/R) y suavizado mediante Savitzky-Golay del total de las muestras analizadas en el equipo Perten para la generación de los modelos



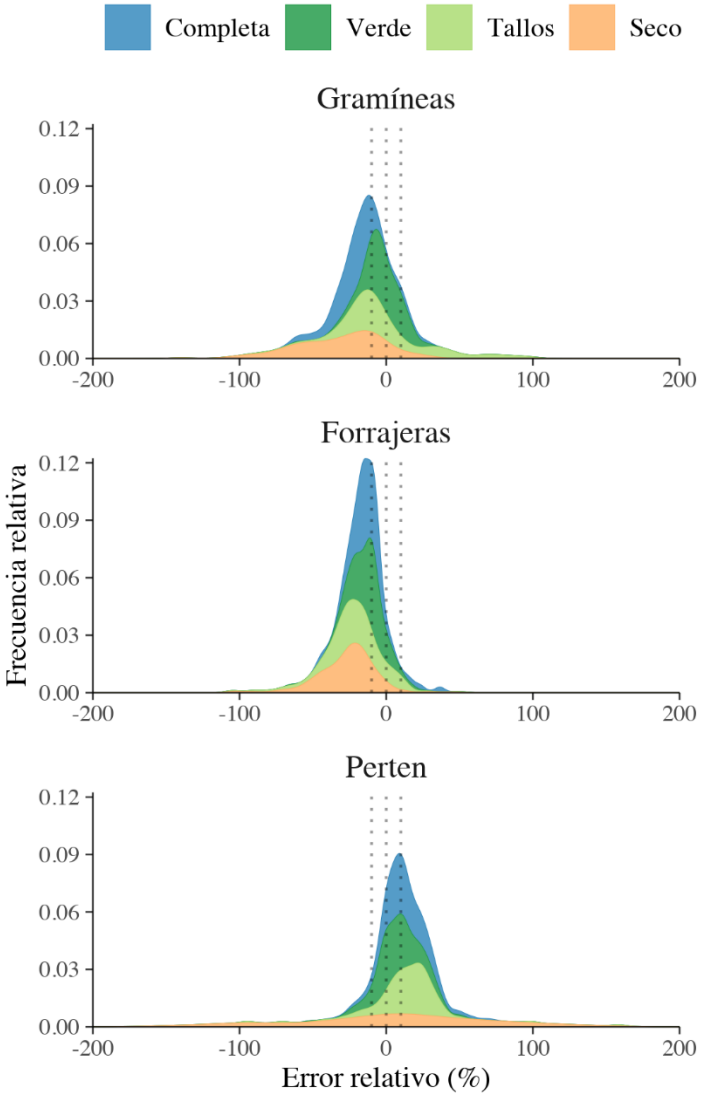
Anexo 3. Derivada segunda del log (1/R) y suavizado mediante Savitzky-Golay y normalización por SNV (varianza normal estándar) del total de las muestras analizadas en el equipo Perten



Anexo 4. Relación entre la concentración de N determinada por los métodos de Kjeldahl (eje x) y Dumas (eje y) para componente (seco y verde) y fecha de muestreo (octubre 2017 y enero 2018) del grupo Simulación

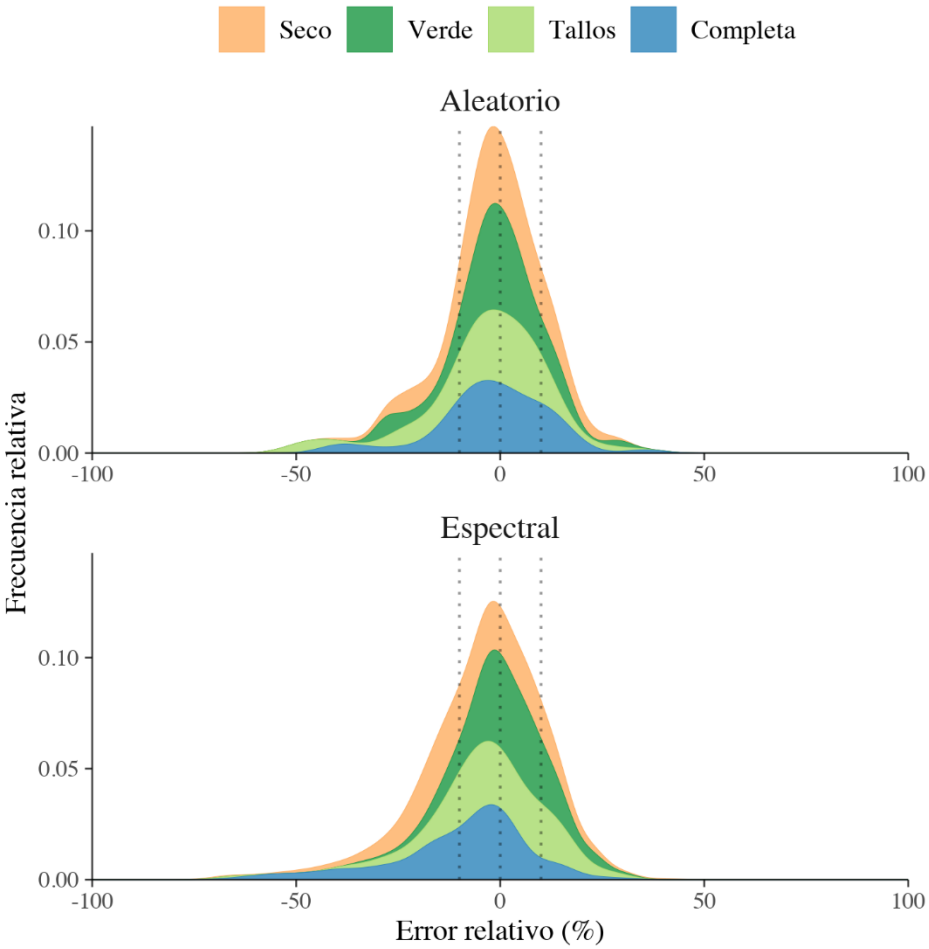


Anexo 5. Distribución de las muestras en función del error relativo para los modelos preexistentes



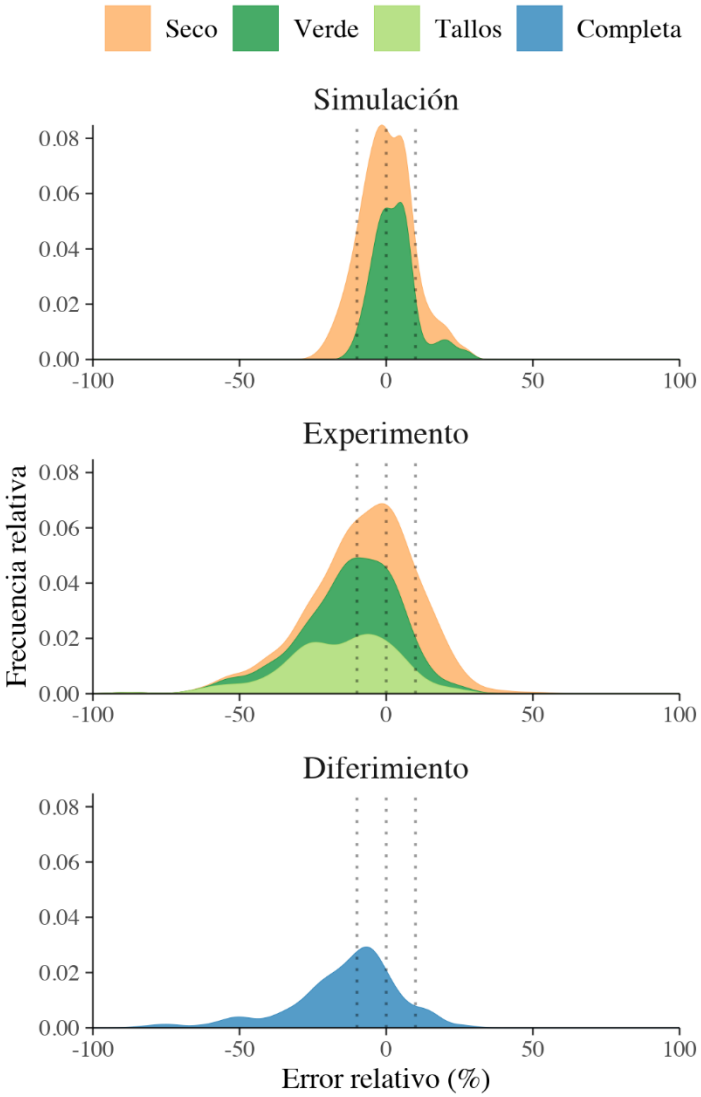
Referencia: las líneas punteadas marcan el rango aceptable (±10%ER) y cero.

Anexo 6. Distribución de las muestras en función del error relativo para los modelos generados



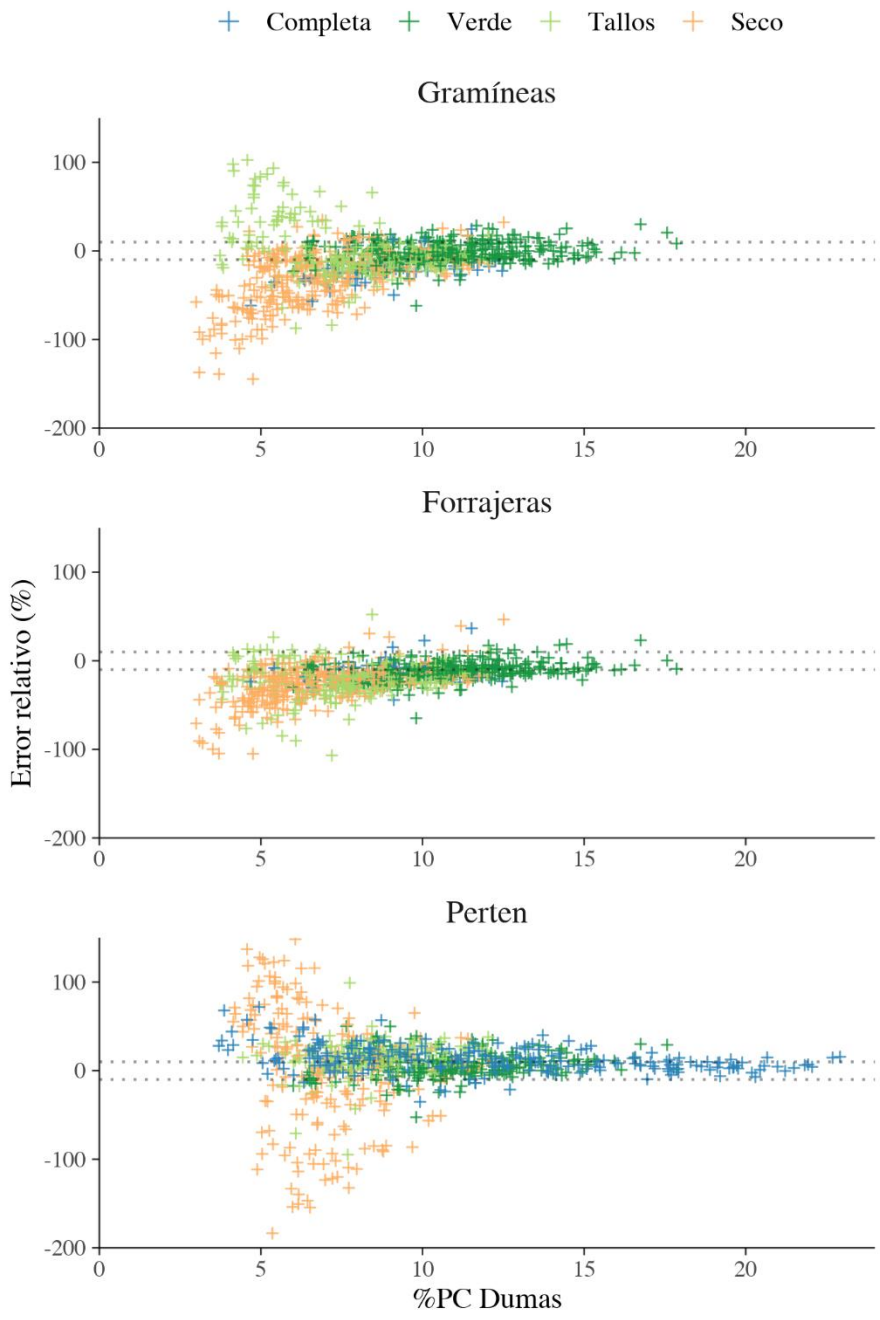
Referencia: las líneas punteadas marcan el rango aceptable (±10%ER) y cero.

Anexo 7. Distribución de las muestras en función del error relativo para los modelos de variantes independientes



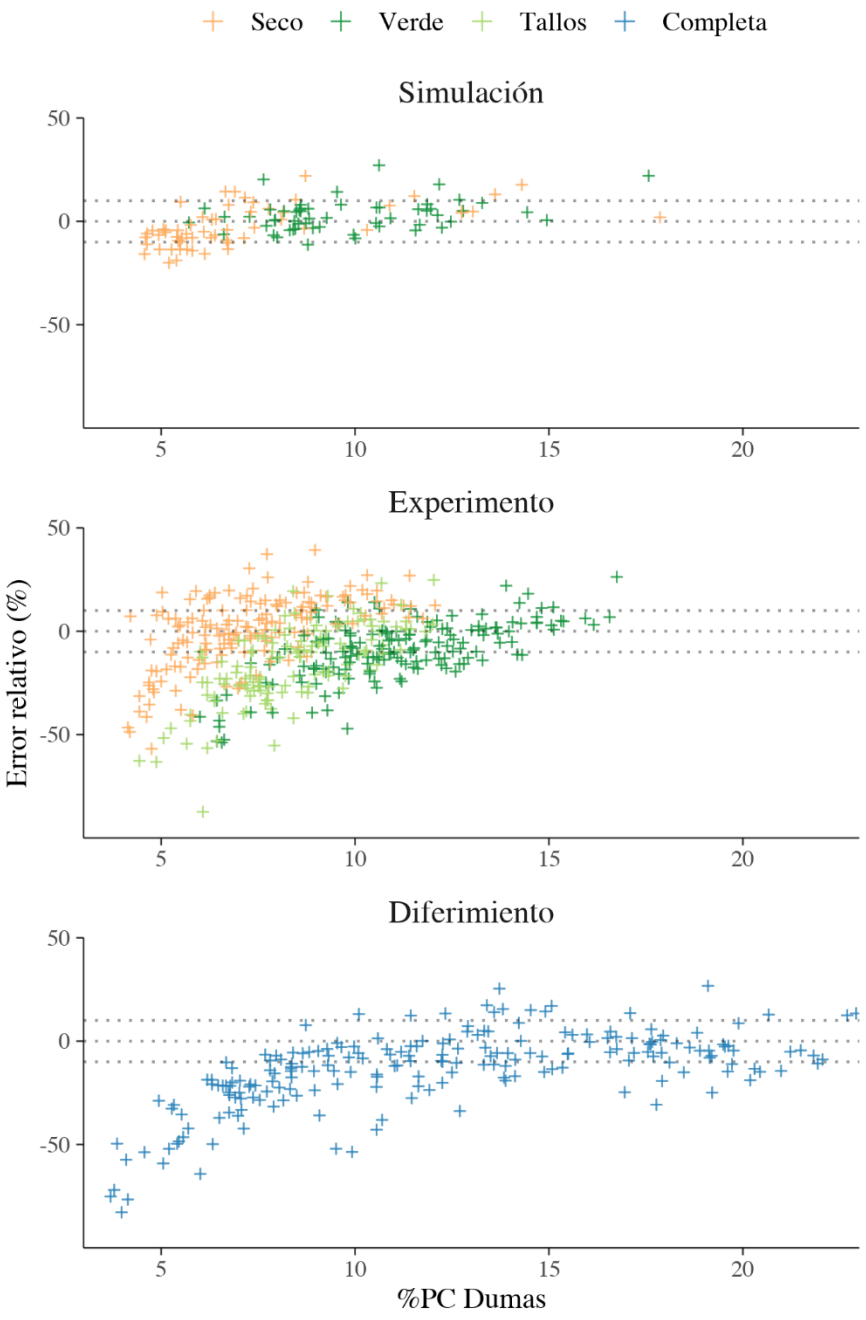
Referencia: las líneas punteadas marcan el rango aceptable (±10%ER) y cero.

Anexo 8. Error relativo de predicción, como porcentaje, en función del valor de PC de referencia para los modelos preexistentes



Referencia: las líneas punteadas marcan el rango aceptable (±10%ER) y cero.

Anexo 9. Error relativo de predicción, como porcentaje, en función del valor de PC de referencia para variantes independientes



Referencia: las líneas continuas marcan el rango aceptable (±10%ER) y cero.