La tecnología NIRS para la detección y cuantificación de harinas de origen animal en piensos compuestos analizados en forma intacta

D. Pérez-Marín[1], A. Garrido-Varo[1], J. E. Guerrero[1], A. Gómez-Cabrera[1], A. Soldado[2], B. de la Roza[2]

[1]Dpto. Producción Animal, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080. Córdoba
[2] Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de Asturias (SERIDA)

INTRODUCCIÓN

A nivel europeo, la primera prohibición relativa al uso de harina de carne en piensos data de 1994, afectando únicamente a los piensos destinados a rumiantes (CE, 1994). En el año 2000, y como consecuencia de la crisis de la EEB, la CE introduce lo que se denomina "prohibición total de harinas de carne" en piensos destinados a animales de producción, permitiendo su uso exclusivamente en animales de compañía (CE, 2000). Esta normativa que se encuentra aún en vigor, se mantendrá según la CE hasta que existan métodos de análisis para ser implementados en los controles oficiales que permitan la detección de dicho ingrediente en piensos.

El presente trabajo trata de resumir parte de la actividad realizada en marco de dos proyectos de I+D, uno europeo (EU STRATFEED Proyecto nº G6RD-2000-CT-00414) y otro de ámbito nacional (MCYT-INIA Proyecto nº CAL 02-028-C2-2). Dicha actividad ha tenido como principales objetivos el mostrar las posibilidades de la tecnología NIRS para la detección y cuantificación de la presencia de harinas de origen animal en piensos compuestos, analizados en forma intacta, y paralelamente mostrar cómo dos instrumentos NIR ofrecen una reproducibilidad adecuada para tal fin.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material experimental

Como colectivo de calibración se utilizó una librería espectral compuesta por 523 muestras de piensos compuestos comerciales destinados a diferentes especies y con distintas formas de presentación (harina, migajas, pellets, etc.), de los cuales 232 incluían harinas de origen animal en su fórmula, mientras que el resto eran muestras libres de dicho ingrediente.

Para la validación externa de los modelos se utilizó un colectivo muestral constituido por 18 piensos compuestos, 10 de los cuales, destinados a distintos animales de producción, no poseían harina de carne en su formulación, mientras que los 8 restantes correspondían a piensos de animales de compañía y sí contenían dicho ingrediente.

Análisis NIR y de referencia

Las muestras de calibración y validación fueron analizadas espectralmente en forma intacta, es decir en su forma de presentación comercial (pellets, harinas, migajas, etc.) sin molienda previa.

Se utilizó un instrumento monocromador Foss NIRSystems 6500 SY-II (Silver Spring, MD, USA) equipado con módulo de transporte, que trabaja en reflectancia en la región espectral comprendida entre 400 y 2500 nm (cada 2nm). Se empleó como dispositivo portamuestras una cápsula rectangular denominada "natural", que presenta una superficie de irradiación de la muestra de 94 cm^2.

Las muestras de validación fueron analizadas asimismo en un segundo instrumento, idéntico al descrito previamente, localizado en el laboratorio del Serida y estandarizado al equipo 1, perteneciente a la UCO.

Los datos de referencia utilizados correspondieron a los porcentajes de inclusión del ingrediente "harinas de origen animal" utilizados en la formulación de cada pienso, que fueron facilitados por el fabricante.

Tratamiento quimiométrico de los datos

Se utilizó el programa quimiométrico WinISI ver. 1.05 para la obtención y posterior evaluación de los modelos de predicción NIRS (ISI, 2000).

Se evaluaron dos estrategias quimiométricas diferentes. Por un lado, el desarrollo de los modelos cuantitativos NIRS de predicción para realizar el ajuste entre los datos espectrales

NIRS y los valores de porcentaje de inclusión de harina de carne de cada muestra utilizados como referencia, se realizó mediante regresión en mínimos cuadrados modificada (MPLS).
Para la estrategia cualitativa, que persigue la detección de la presencia o ausencia del ingrediente harina de carne en piensos, no su cuantificación, se utilizó asimismo el algoritmo MPLS, si bien los valores de referencia usados fueron variables ficticias, asignándole el valor de 1 a las muestras de piensos libres del ingrediente estudiado y el valor de 2 a los piensos que contenían harinas de origen animal.
Los estadísticos usados para la selección de los mejores modelos de predicción NIRS fueron el coeficiente de determinación (r^2) y el error típico de validación cruzada (ETVC), mientras que para la evaluación de los mismos se utilizaron el error típico de predicción (ETP), el sesgo, las distancias global y vecina de Mahalanobis (GH y NH), así como el porcentaje de muestras correctamente clasificadas (Shenk y Westerhaus, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calibración seleccionada para la cuantificación del porcentaje de inclusión de harinas de origen animal en piensos compuestos presentó un ETVC de 0,80 y un coeficiente de determinación de 0,98. La aplicación de dicho modelo cuantitativo a la predicción del contenido de harina de carne de las muestras del colectivo de validación arrojó los resultados que se muestran en la Tabla 1.

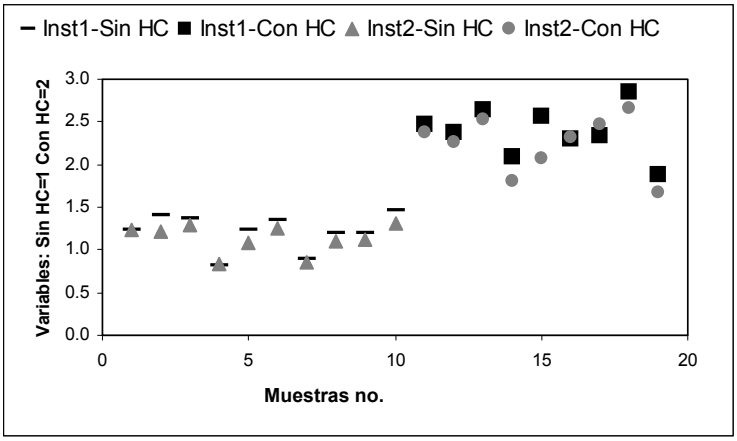
Tabla 1. Predicción del % de harinas de origen animal en las muestras de piensos que constituyen en colectivo de validación (N=18), en los instrumentos 1 y 2.

		Instrumento 1		Instrumento 2	
Código	**Referencia**	**PredichoNIR**	**GH**	**PredichoNIR**	**GH**
13484	0	-0,19	1,059	-0,20	1,018
13485	0	-0,08	1,909	-0,24	1,885
13486	0	**1,32**	0,97	**1,57**	1,063
13487	0	-0,60	1,067	-0,88	1,098
13574	0	-0,09	1,389	-0,77	1,520
13581	0	**2,36**	1,849	**2,10**	2,173
13583	0	-1,42	0,913	-1,76	1,125
13584	0	-0,49	1,238	-0,40	1,096
13585	0	-0,29	1,238	-0,46	1,492
13586	0	**0,80**	1,003	**0,21**	1,362
13489	26,70	27,19	2,601	23,59	1,899
13490	27,40	28,35	4,231*	24,86	3,592*
13493	27,70	29,31	2,575	26,47	2,046
13580	27,8	22,37	2,719	19,78	3,371*
13578	29,4	23,64	1,674	22,34	1,449
13573	30,20	17,34	1,565	17,64	1,537
13488	32,1	30,67	3,881*	30,47	3,039*
13492	33,40	32,57	5,304*	29,79	3,994*
13571	34,95	28,53	5,073*	25,70	5,031*
	ETP	1,03		1,09	
	Sesgo	-0,18		0,08	

Se puede apreciar, en primer lugar, que ambos instrumentos producen resultados similares, lo que indica que el proceso de estandarización fue adecuado.
Asimismo, se observa, que se obtienen tres falsos positivos, es decir, muestras libres del ingrediente harina de carne para las que el modelo predice un porcentaje de inclusión que oscila entre 0,21 y 2,36% dependiendo de la muestra y el instrumento en el que se analizan, por lo que el porcentaje total de muestras correctamente clasificadas para ambos instrumentos se situaría en el 83,3%.
Con respecto, al modelo cualitativo seleccionado para la discriminación entre muestras libres y con presencia de harina de carne (ETVC=0,19 y r^2=0,86), los resultados correspondientes al colectivo de validación (n=18), que aparecen representados en la Figura

1, indican que en ambos instrumentos se obtienen un 100% de muestras correctamente clasificadas. Es decir, las tres muestras que con las calibraciones cuantitativas aparecían como falsos positivos, son adecuadamente identificadas en la clase ausencia con los modelos cualitativos, por lo que parece que esta estrategia es de mayor precisión.
Resultados similares obtienen Fernández et al. (2002) y Pérez-Marín et al. (2004) en el desarrollo de modelos quimiométricos, asimismo cualitativos y cuantitativos, para la detección de harina de carne en piensos compuestos analizados tanto en forma molida como intacta, si bien en dichos trabajos no se evalúan dichos modelos sobre nuevos colectivos de muestras reales, es decir no se realiza una validación externa de los mismos, ni asimismo se evalúa la reproducibilidad de los resultados en dos instrumentos diferentes.

Figura 1. Resultados de la clasificación de las muestras del colectivo de validación en base a su contenido en harinas de origen animal, en los instrumentos 1 y 2.



En conclusión, la tecnología NIRS permite disponer de una herramienta rápida y no-destructiva para la detección y cuantificación de harina de carne en piensos compuestos analizados en su forma de presentación original, presentando asimismo una adecuada reproducibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CE. 1994. Commission Decision 94/381/EC of 27 June 1994 concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mammalian derived protein. OJ L 172, 07/07/1994 p.0023 (1994).

CE. 2000. Commission Decision 2000/766/EC of 4 December 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopaties and the feeding of animal protein. OJ L 306, 07/12/2000 p.0032 (2000).

Fernández M., Martínez A. Modroño S. y De la Roza B. 2002. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference, pp. 307-311.

ISI. 2000. The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations, and networking. Manual, FOSS NIRSystems/TECATOR. Infrasoft International, LLC, Sylver Spring MD, USA.

Pérez-Marín, D., Garrido, A Guerrero Ginel, J.E., Gómez Cabrera, A. (2004b). Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for the mandatory labelling of compound feedingstuffs: chemical composition and open declaration. Animal Feed Science & Technology, vol. 116, iss. 3-4, pp. 333-349.

Shenk J.S. y Westerhaus M.O. 1996. Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Davies, A.M.C. y Williams, P.C. (eds). NIR Publications. Chichester. UK. Pp. 198-202.