

Análisis y evaluación automática de forrajes por espectroscopia (R. I.). Longitudes de onda óptimas

B. GARCÍA CRIADO, L. LEÓN MORÁN y A. GARCÍA CIUDAD

Centro de Edafología y Biología Aplicada de Salamanca (C.S.I.C.)
Apartado 257, Salamanca

RESUMEN

Se estudia la técnica espectroscópica de la reflectancia infrarroja (E.R.I.) para el análisis y evaluación automática de forrajes y alimentos fibrosos. Las curvas espectrales de la reflectancia de forrajes muestran claramente que se trata de curvas compuestas y características de los diversos constituyentes químicos de la hierba.

Estos constituyentes químicos o factores de calidad no se determinan directamente por E.R.I., pero pueden determinarse, previa calibración, mediante ecuaciones de predicción obtenidas a partir de muestras de composición o respuestas animales conocidas. Una vez que el sistema ha sido calibrado puede determinar múltiples factores de calidad en sólo unos minutos.

El estudio de la exactitud y precisión de este sistema de análisis presenta errores standard de estimación relativamente bajos (0,5 y 1%), lo que permite su utilización. Determinadas selecciones de longitudes de onda mejoran sensiblemente los resultados.

INTRODUCCIÓN

Hace tiempo que se viene reconociendo la necesidad de métodos de análisis y evaluación de forrajes de forma rápida, precisa, exacta y barata (1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 13, 15). La razón de esto estriba fundamentalmente en que los métodos convencionales actualmente en uso resultan muy laboriosos y, por tanto lentos y caros.

Conscientes de esta necesidad NORRIS y cols. (8), BARNES (1), SHENK y cols. (10, 11) y GARCÍA CRIADO y cols. (4), han propuesto la utilización de

un sistema espectroscópico de reflectancia, que trabaja en el infrarrojo próximo. Esta técnica ofrece múltiples posibilidades, de ahí su utilización para la estimación de la composición química de pastos, forrajes y alimentos fibrosos y la predicción de respuestas animales que se mantienen de tales sustancias (5, 6, 12, 13, 14).

La citada técnica permite conocer múltiples factores de calidad de gran número de muestras en breves espacios de tiempo, siendo mínima su manipulación y la cantidad de sustancia requerida. Esto supondrá resolver muchos problemas relativos al mejoramiento, selección, genética, calidad y evaluación de las cosechas e incluso balanceo de raciones en función del mercado y valor nutritivo de los alimentos.

El objetivo de este trabajo reside en conocer respuestas del sistema de espectroscopía de reflectancia infrarroja (E.R.I.) en la evaluación y análisis automático de forrajes procedentes de ambientes diversos. En todos los casos se opera según un proceso de optimización de longitudes de onda o reflectancias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han elegido varios tipos de forrajes creciendo en lugares diferentes. Las muestras preparadas para su análisis se secaron y molieron en un molino con luz de malla de 1 mm. siendo analizadas por duplicado por los métodos de laboratorio y una sola vez en el sistema de E.R.I.

Muestras de plantas: Se utilizan muestras de 10 comunidades pratenses creciendo en la provincia de Salamanca. Con éstas se forman tres grupos principales, denominados comunidades (a), (b) y (c), según características comunes de su composición florística. Asimismo, se han utilizado muestras de dos comunidades, (a) y (b), procedentes de la Depresión del Salado (Buenos Aires, Argentina), de 33 cultivares de *Trifolium repens* L., creciendo en los regadíos de la cuenca media del río Tormes, y de especies pratenses (gramíneas, leguminosas e incluso maíz forrajero) de praderas monofitas creciendo en Hurley (Inglaterra).

Método de Laboratorio: Para la determinación de Proteína se utiliza el clásico método de KJELDAHL, realizando la digestión en un bloque digestor "BD-40 Technicon". Las determinaciones de NDF, ADF, Hemicelulosa, Celulosa, Lignina, DNDF y DMD, se realizan según GOERING y VAN SOEST (7), procedimiento del SO_4H_2 al 72 %, con ligeras modificaciones introducidas por GARCÍA CRIADO (3). En cuanto a las determinaciones de DMD, OMD y D-value ("in vitro" e "in vivo") se utilizan los procedimientos seguidos en el G.R.I. -Hurley (2,16), realizándose los análisis en dicho Instituto bajo la dirección del Dr. D. F. OSBOURN.

Método de E.R.I.: Para la calibración de la técnica de E.R.I. propuesta por GARCÍA CRIADO y cols. (4), se utiliza un sistema automático Infra-Alyzer "Technicon D. J.", que trabaja en el infrarrojo cercano a las longitudes de onda de 1.68, 1.94, 2.10, 2.18, 2.23 y 2.31 μm ; los espectros fueron registrados por Technicon Industrial Sistem (Tarrytown, New York) en un sistema "Technicon DISC".

Los datos de E.R.I. se registraron y analizaron como valores de las reflectancias correspondientes a cada una de las longitudes de onda con que opera el sistema. Estos datos, relacionados frente a aquellos procedentes de las determinaciones manuales, se utilizan después para desarrollar las ecuaciones de calibración o estimación para cada grupo de muestras.

La operación de calibración se lleva a cabo mediante análisis de regresión lineal múltiple normal, o paso a paso cuando se seleccionan reflectancias o longitudes de onda. La adición o rechazo de reflectancias se realiza sobre la base de un test de significación del valor que toma la F, el coeficiente de correlación múltiple (R) y el error standard de la estimación (ES). Estos últimos ajustados en función de los grados de libertad obtenidos en cada una de las etapas del proceso estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas I, II, III, IV, V y VI se expone un resumen de los resultados obtenidos en cada calibración del sistema R. I., para los distintos grupos de muestras y parámetros estudiados. En ellas figuran el tipo de muestra utilizada, número de observaciones, desviación standard de todos los valores que toma un parámetro determinado en cada grupo de muestras (DE), coeficiente de correlación múltiple (R), error standard de estimación (ES) y reflectancias que intervienen en la ecuación de calibración o predicción en orden de importancia respecto a la variable dependiente considerada. Cuando aparecen cruces en lugar de reflectancias, indica que se utilizan las 6 reflectancias y no se conoce el orden de importancia de éstas.

La Fig. 1 muestra tres curvas múltiples típicas del espectro de la reflectancia infrarroja de tres muestras distintas de forraje (dos corresponden a comunidades naturales y la otra a trébol blanco). En esta figura se presenta también la localización de las tres primeras longitudes de onda, o sus correspondientes reflectancias, utilizadas en el análisis de regresión para los distintos componentes de la hierba y según orden de importancia.

Según los datos estadísticos de las Tablas indicadas, la técnica de espectroscopía de la reflectancia infrarroja puede usarse en el análisis y evaluación automática de forrajes. En general, la exactitud alcanzada en las diversas determinaciones es bastante buena, especialmente para Proteína, Celulosa, Lignina y ADF. DMD "química" se estima con menor precisión que DMD "in vitro" e "in vivo". No obstante, la bondad del método en todos los casos puede considerarse muy aceptable. Pero la determinación de "D-value" resulta ligeramente mejor que cuando la digestibilidad se expresa de otra forma, no existiendo diferencias apreciables entre aquellas de "in vivo" e "in vitro".

Los errores standard de estimación de cada uno de los parámetros son función de la distribución, variación de valores y clase de muestras que se analicen. Esto condiciona el que cada tipo de calibración exige una determinada selección de longitudes de onda. Pero operando así, se disminuye sensiblemente el error y, por consiguiente, se gana en exactitud y precisión.

RESUMEN DE CALIBRACIONES DEL SISTEMA DE R. I.

PARA-METRO	TIPO DE MUESTRA	Núm. de observaciones	DE	R	ES	Reflectancias según su importancia					
						1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a
PROTEINA	Comunidades (a) Salamanca	72	4.09	.972	0.648	x	x	x	x	x	x
	Comunidades (b) Salamanca	39	3.28	.933	1.214	R ₄	R ₃				
	Comunidades (b) Salamanca	39	3.28	.936	1.257	R ₄	R ₃				
	Comunidades (b) Salamanca	29	2.21	.970	0.596	R ₁	R ₃	R ₅	R ₂	R ₁	R ₅
	Cultivares de T. repens	27	3.71	.956	1.137	R ₃	R ₄	R ₄	R ₅		
	Cultivares de T. repens	27	3.71	.961	1.167	R ₃	R ₄	R ₆	R ₁	R ₅	R ₂
	Cultivares de T. repens	25	3.61	.984	0.694	R ₃	R ₄				
	Comunidades (a) Salamanca	54	7.80	.976	1.121	x	x	x	x	x	x
	Comunidades (b) Salamanca	39	6.47	.687	5.041	R ₄	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₂
	Comunidades (b) Salamanca	39	6.47	.749	4.669	R ₄	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₂
ND 71	Comunidades (b) Salamanca	19	6.30	.902	1.954	x	x	x	x	x	x
	Comunidades (b) Salamanca	30	6.37	.863	3.527	R ₁	R ₂	R ₈	R ₄	R ₅	R ₁
	Comunidades (c) Salamanca	40	7.47	.833	4.423	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₅	R ₁
	Comunidades (a) Salamanca	40	7.47	.839	4.415	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₅	R ₁
	Comunidades (a) Argentina	30	6.25	.959	1.903	R ₃	R ₅	R ₁	R ₄	R ₆	R ₃
	Comunidades (a) Argentina	30	6.25	.960	1.969	R ₃	R ₅	R ₁	R ₄	R ₆	R ₃
	Comunidades (b) Argentina	23	7.38	.976	1.769	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₄	R ₂
	Comunidades (b) Argentina	23	7.38	.979	1.755	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₄	R ₂
	Cultivares de T. repens	43	4.59	.790	2.995	R ₅	R ₃	R ₄	R ₁	R ₃	R ₆
	Cultivares de T. repens	43	4.59	.794	3.013	R ₅	R ₃	R ₄	R ₁	R ₃	R ₆
CELULOSA	Cultivares de T. repens	22	4.30	.972	0.709	x	x	x	x	x	x
	Cultivares de T. repens	30	4.00	.907	1.840	R ₁	R ₂	R ₄	R ₅		
	Comunidades (c) Salamanca	40	4.52	.907	1.988	R ₆	R ₃	R ₂	R ₁	R ₅	R ₄
	Comunidades (c) Salamanca	40	4.52	.917	1.962	R ₆	R ₃	R ₂	R ₁	R ₅	R ₄
	Comunidades (a) Argentina	30	2.93	.919	1.273	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₂	R ₄
	Comunidades (a) Argentina	30	2.93	.928	1.229	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₂	R ₄
	Comunidades (b) Argentina	23	4.50	.969	1.296	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₂	R ₄
	Cultivares de T. repens	43	2.86	.723	2.050	R ₃	R ₄	R ₂	R ₁	R ₅	R ₆
	Cultivares de T. repens	43	2.86	.743	2.069	R ₃	R ₄	R ₂	R ₁	R ₅	R ₆

RESUMEN DE CALIBRACIONES DEL SISTEMA DE R. I.

PARA-METRO	TIPO DE MUESTRA	Núm. de observaciones	DE	R	ES	Reflectancias según su importancia									
						1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a				
ADP	Comunidades (a) Salamanca	64	4.39	.972	0.750	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Comunidades (b) Salamanca	39	3.38	.596	2.874	R ₃	R ₄	R ₂	R ₁	R ₁	R ₆	R ₅			
	Comunidades (b) Salamanca	39	3.38	.600	2.950	R ₃	R ₄	R ₂	R ₁	R ₁	R ₆	R ₅			
	Comunidades (b) Salamanca	27	2.48	.930	1.010	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₄					
	Comunidades (c) Salamanca	40	6.16	.935	2.311	R ₁	R ₂	R ₂	R ₁	R ₁	R ₄	R ₆			
	Comunidades (c) Salamanca	40	6.16	.936	2.366	R ₅	R ₃	R ₂	R ₁	R ₁	R ₄	R ₆			
	Comunidades (a) Argentina	30	3.51	.951	1.193	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		
	Comunidades (a) Argentina	30	3.51	.953	1.197	R ₆	R ₅	R ₃	R ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		
	Comunidades (b) Argentina	23	4.64	.963	1.413	R ₆	R ₅	R ₃	R ₂	R ₂	R ₄	R ₆			
	Comunidades (b) Argentina	23	4.64	.967	1.395	R ₆	R ₅	R ₃	R ₂	R ₂	R ₄	R ₆			
	Cultivares de T. repens	43	3.28	.781	2.129	R ₃	R ₄	R ₆	R ₅	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁		
	Cultivares de T. repens	43	3.28	.781	2.213	R ₃	R ₄	R ₆	R ₅	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁		
	Cultivares de T. repens	23	2.81	.926	1.138	R ₃	R ₄	R ₆	R ₅	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁		
	HEMICELULOSA	Comunidades (c) Salamanca	40	12.39	.922	5.064	R ₄	R ₆	R ₃	R ₂	R ₃	R ₅	R ₁		
Comunidades (c) Salamanca		40	12.39	.923	5.190	R ₄	R ₆	R ₃	R ₂	R ₃	R ₅	R ₁			
Comunidades (a) Argentina		30	3.26	.881	1.656	R ₃	R ₁	R ₅	R ₂	R ₂	R ₆	R ₄			
Comunidades (a) Argentina		30	3.26	.885	1.704	R ₃	R ₁	R ₅	R ₂	R ₂	R ₆	R ₄			
Comunidades (b) Argentina		23	3.39	.890	1.623	R ₃	R ₅	R ₁	R ₂	R ₂	R ₆	R ₄			
Comunidades (b) Argentina		23	3.39	.914	1.611	R ₃	R ₅	R ₁	R ₂	R ₂	R ₆	R ₄			
Comunidades (b) Argentina		43	11.17	.439	10.546	R ₅	R ₄	R ₂	R ₁	R ₁	R ₆	R ₃			
Cultivares de T. repens		43	11.17	.443	10.814	R ₅	R ₄	R ₂	R ₁	R ₁	R ₆	R ₃			
DNDF		Comunidades (a) Salamanca	42	6.14	.955	1.302	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		Comunidades (c) Salamanca	40	9.40	.608	7.875	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₄	R ₅	R ₁		
	Comunidades (c) Salamanca	40	9.40	.638	7.866	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₄	R ₅	R ₁			
	Comunidades (a) Argentina	30	3.70	.736	2.754	R ₆	R ₅	R ₃	R ₄	R ₄	R ₂	R ₁			
	Comunidades (a) Argentina	30	3.70	.744	2.778	R ₆	R ₅	R ₃	R ₄	R ₄	R ₂	R ₁			
	Cultivares de T. repens	43	2.24	.502	2.009	R ₂	R ₄	R ₅	R ₄	R ₄	R ₅	R ₂	R ₃		
Cultivares de T. repens	43	2.24	.512	2.076	R ₃	R ₄	R ₅	R ₄	R ₄	R ₅	R ₂	R ₃			

TABLA 3.

RESUMEN DE CALIBRACIONES DEL SISTEMA DE R. I.

PARA- METRO	TIPO DE MUESTRA	Núm. de observa- ciones	DE	R	ES	Reflectancias según su importancia						
						1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	
LIGNINA	Comunidades (a) Salamanca	63	1.06	.900	0.335	x	x	x	x	x	x	
	Comunidades (b) Salamanca	39	1.38	.408	1.296	R ₆	R ₆	x	x	x	x	
	Comunidades (b) Salamanca	39	1.38	.494	1.309	R ₂	R ₆	R ₈	R ₄	R ₅	R ₁	
	Comunidades (b) Salamanca	24	0.95	.921	0.311	x	x	x	x	x	x	
	Comunidades (b) Salamanca	23	0.92	.844	0.555	R ₂	R ₈	R ₄	R ₆			
	Comunidades (c) Salamanca	40	7.03	.988	1.126	R ₅	R ₁	R ₄	R ₆	R ₂	R ₃	
	Comunidades (c) Salamanca	40	7.03	.989	1.147	R ₅	R ₁	R ₄	R ₆	R ₂	R ₃	
	Comunidades (a) Argentina	30	0.77	.893	0.373	R ₅	R ₄	R ₁	R ₃	R ₂	R ₃	
	Comunidades (a) Argentina	30	0.77	.895	0.386	R ₅	R ₄	R ₁	R ₂	R ₆	R ₃	
	Comunidades (a) Argentina	23	0.71	.936	0.285	R ₁	R ₂	R ₄	R ₅			
	Comunidades (b) Argentina	23	0.95	.739	0.688	R ₃	R ₆	R ₅	R ₄	R ₁	R ₃	
	Comunidades (b) Argentina	23	0.95	.747	0.740	R ₃	R ₆	R ₅	R ₄	R ₃	R ₆	
	Cultivares de T. repens	43	1.32	.755	0.925	R ₅	R ₃	R ₁	R ₄	R ₃	R ₆	
	Cultivares de T. repens	43	1.32	.768	0.916	R ₅	R ₃	R ₁	R ₄	R ₃	R ₆	
	Cultivares de T. repens	27	0.776	.897	0.381	R ₁	R ₃	R ₄	R ₅	x	x	
	Cultivares de T. repens	19	0.75	.941	0.250	x	x	x	x	x	x	
	DMD	Comunidades (a) Salamanca	42	3.06	.864	1.131	x	x	x	x	x	x
		Comunidades (b) Salamanca	39	5.87	.329	5.779	R ₂	R ₆	R ₁	x	x	x
		Comunidades (b) Salamanca	39	5.87	.383	5.913	R ₂	R ₆	R ₁	R ₅	R ₄	R ₃
Comunidades (b) Salamanca		20	5.65	.720	1.794	R ₁	R ₃	R ₅	R ₄	R ₆		
Comunidades (c) Salamanca		40	7.31	.732	5.115	R ₅	R ₃	R ₄	R ₆	R ₂	R ₁	
Comunidades (c) Salamanca		40	7.31	.743	5.318	R ₅	R ₃	R ₄	R ₆	R ₂	R ₁	
Comunidades (a) Argentina		30	4.15	.903	2.008	R ₃	R ₁	R ₅	R ₄	R ₃	R ₆	
Cultivares de T. repens		43	4.58	.769	3.116	R ₅	R ₃	R ₁	R ₄	R ₃	R ₆	
Cultivares de T. repens		43	4.58	.774	3.127	R ₅	R ₃	R ₁	R ₄	R ₃	R ₆	
Cultivares de T. repens		19	4.46	.960	0.852	x	x	x	x	x	x	

TABLA 4.

RESUMEN DE CALIBRACIONES DEL SISTEMA DE R. I.

PARA-METRO	TIPO DE MUESTRA	Núm. de observaciones	DE	R	ES	Reflectancias según su importancia						
						1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	
DMD "in vivo"	Especies pratenses-Ingl.	82	6.40	.845	3.511	R ₃	R ₉	R ₄	R ₁	R ₆	R ₅	
	Especies pratenses-Ingl.	82	6.40	.845	3.551	R ₃	R ₂	R ₄	R ₁	R ₆	R ₅	
	Especies pratenses-Ingl.	56	6.47	.933	1.673							
	Especies de Gram.—Ingl.	47	6.02	.913	2.812	R ₃	R ₂	R ₄	R ₅	R ₆	R ₁	
	Especies de Gram.—Ingl.	36	5.79	.954	1.244	x	x	x	x	x	x	
	Especies de Legum.—Ingl.	24	6.39	.967	1.845	R ₃	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	R ₃	
	Especies de Legum.—Ingl.	24	6.39	.967	1.888	R ₃	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	R ₃	
	Especies de Legum.—Ingl.	18	5.75	.959	1.158	x	x	x	x	x	x	
	Maíz-forrajero-Ingl.	10	3.12	.932	1.387	R ₄	R ₆	R ₅	R ₃			
	Maíz-forrajero-Ingl.	10	3.12	.932	1.518	R ₄	R ₆	R ₅	R ₃			
	Maíz-forrajero-Ingl.	8	3.52	.995	0.253	x	x	x	x	x	x	
	OMD "in vivo"	Especies pratenses-Ingl.	82	6.81	.847	3.717	R ₃	R ₂	R ₄	R ₁	R ₆	R ₅
		Especies pratenses-Ingl.	82	6.81	.847	3.765	R ₃	R ₂	R ₄	R ₁	R ₆	R ₅
		Especies pratenses-Ingl.	37	5.00	.913	1.455	x	x	x	x	x	x
		Especies de Gram.—Ingl.	47	6.02	.926	2.830	R ₃	R ₂	R ₄	R ₆	R ₁	R ₅
Especies de Gram.—Ingl.		36	6.31	.953	1.363	x	x	x	x	x	x	
Especies de Legum.—Ingl.		24	6.80	.962	2.091	R ₃	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	R ₂	
Especies de Legum.—Ingl.		24	6.80	.962	2.151	R ₃	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	R ₂	
Especies de Legum.—Ingl.		18	6.13	.942	1.474	x	x	x	x	x	x	
Maíz-forrajero-Ingl.		10	3.03	.868	1.709	R ₁	R ₆	R ₅	R ₃			
Maíz-forrajero-Ingl.		10	3.03	.885	1.892	R ₁	R ₆	R ₅	R ₃			
Maíz-forrajero-Ingl.		8	3.44	.984	0.439	x	x	x	x	x	x	

RESUMEN DE CALIBRACIONES DEL SISTEMA DE R. I.

PARA-METRO	TIPO DE MUESTRA	Núm. de observaciones	DE	R	ES	Reflectancias según su importancia						
						1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a	
D-value "in vivo"	Especies pratenses-Ingl.	82	5.87	.850	3.173	R ₃	R ₂	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	
	Especies pratenses-Ingl.	82	5.87	.850	3.214	R ₃	R ₂	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	
	Especies pratenses-Ingl.	58	5.62	.908	1.703	X	X	X	X	X	X	
	Especies de Gram.—Ingl.	47	6.02	.904	2.488	R ₃	R ₂	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	
	Especies de Gram.—Ingl.	36	4.92	.917	1.417	X	X	X	X	X	X	
	Especies de Legum.—Ingl.	24	5.32	.959	1.695	R ₃	R ₂	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	
	Especies de Legum.—Ingl.	24	5.32	.969	1.540	R ₃	R ₂	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	
	Especies de Legum.—Ingl.	18	4.52	.963	0.869	X	X	X	X	X	X	
	Maíz-forrajero-Ingl.	10	3.27	.925	1.409	R ₄	R ₆	R ₅	R ₃	X	X	
	Maíz-forrajero-Ingl.	10	3.27	.927	1.650	R ₄	R ₆	R ₅	R ₃	X	X	
	Maíz-forrajero-Ingl.	8	3.50	.979	0.416	X	X	X	X	X	X	
	DMD "in vitro"	Comunidades (c) Salamanca	40	11.50	.976	2.655	R ₅	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₁
		Comunidades (c) Salamanca	40	11.50	.976	2.708	R ₅	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₁
		Comunidades (c) Salamanca	19	5.29	.964	1.011	X	X	X	X	X	X
Especies pratenses-Ingl.		46	6.54	.917	2.810	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
Especies de Gram.—Ingl.		27	7.18	.995	1.824	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₅	R ₆	
Especies de Legum.—Ingl.		9	5.87	.893	1.917	X	X	X	X	X	X	
Maíz-forrajero-Ingl.		10	2.99	.987	0.341	X	X	X	X	X	X	
Maíz-forrajero-Ingl.		10	2.99	.955	0.630	R ₄	R ₅	R ₆	X	X	X	
OMD "in vitro"		Comunidades (c) Salamanca	40	7.13	.915	3.033	R ₆	R ₃	R ₂	R ₅	R ₄	R ₁
		Comunidades (c) Salamanca	40	7.13	.916	3.114	R ₆	R ₃	R ₂	R ₅	R ₄	R ₁
	Especies pratenses-Ingl.	46	7.03	.904	3.130	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
	Especies de Gram.—Ingl.	27	7.33	.974	1.894	R ₃	R ₂	R ₅	R ₄	R ₁	R ₆	
	Especies de Legum.—Ingl.	9	6.11	.896	1.971	X	X	X	X	X	X	
	Especies de Legum.—Ingl.	9	6.11	.906	1.871	R ₂	R ₃	R ₅	R ₄	R ₁	R ₆	
	Maíz-forrajero-Ingl.	10	2.85	.986	0.334	X	X	X	X	X	X	

TABLA 6.

RESUMEN DE CALIBRACIONES DEL SISTEMA DE R. I.

PARA-METRO	TIPO DE MUESTRA	Núm. de observaciones	DE	R	ES	Reflectancias según su importancia					
						1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a
"in vitro"	Comunidades (c) Salamanca	40	6.46	.930	2.543	R ₆	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	
	Comunidades (c) Salamanca	40	6.46	.930	2.581	R ₅	R ₃	R ₂	R ₆	R ₄	R ₁
	Comunidades (c) Salamanca	13	5.01	.993	0.415	x	x	x	x	x	x
D-value	Especies pratenses-Ing.	46	5.92	.884	2.971	R ₆	R ₃	R ₃	R ₅	R ₁	R ₄
	Especies de Gram.—Ing.	27	5.36	.959	1.763	R ₃	R ₂	R ₅	R ₄	R ₁	R ₆

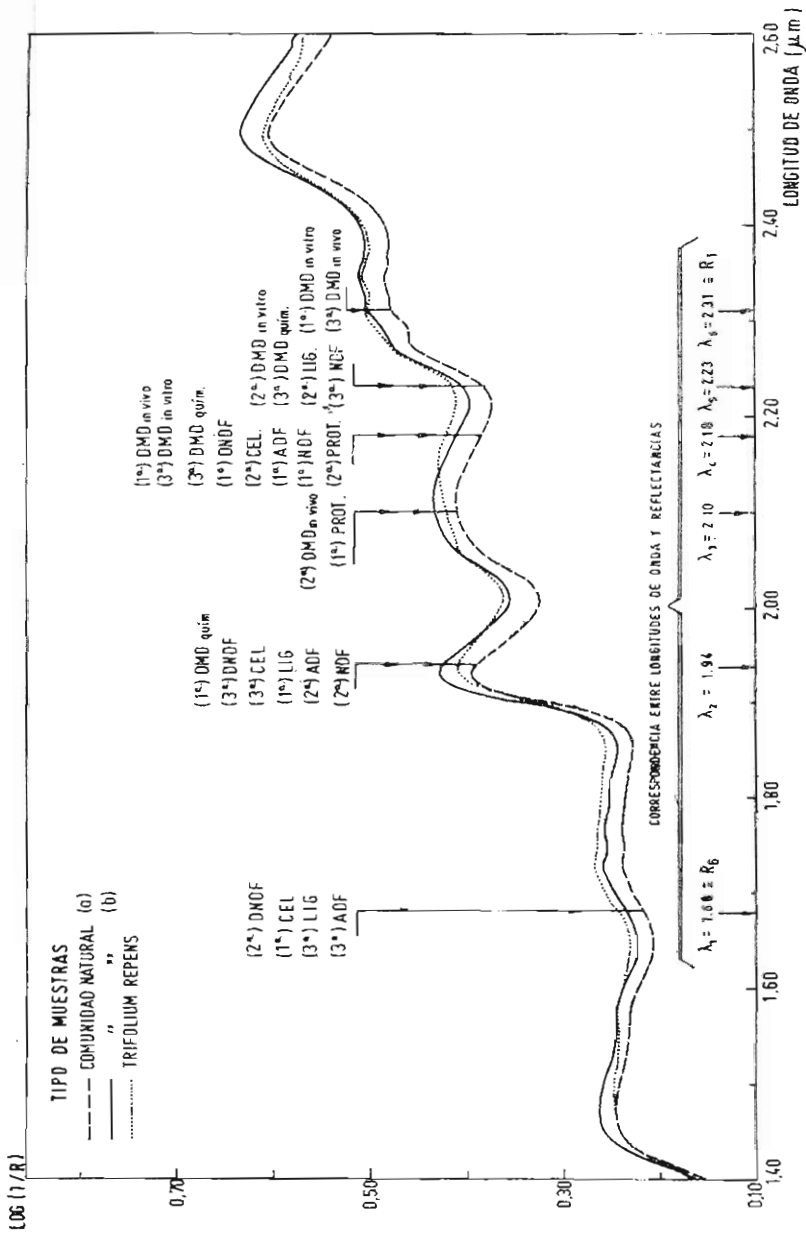


FIG. 1.—Espectro de la reflectancia infrarroja de muestras de forrajes. Localización de las tres primeras longitudes de onda usadas en el análisis de regresión para cada componente.

Para cada parámetro existen reflectancias o longitudes de onda específicas que pueden variar ligeramente de unos grupos a otros de muestras vegetales. En el caso de NDF y Celulosa (Tabla I) la selección de reflectancias aporta poca mejora, aunque los grados de libertad se reduzcan sensiblemente. Esto posiblemente se deba a que las longitudes de onda fijas del sistema no sean las más apropiadas para determinar dichos componentes.

En general, se puede afirmar que los errores de estimación aquí obtenidos son muy semejantes a los encontrados por NORRIS y cols. (8), SHENK y cols. (10, 11, 12, 14) y GARCÍA CRIADO y cols. (4). Sin embargo, las calibraciones con respuestas animales (DMD, OMD y D-value "in vivo"), así como con respuestas de análisis "in vitro" (Tablas IV, V y VI) resultan mejores que aquellas encontradas por SHENK y NORRIS. Por otro lado, dichas calibraciones pueden mejorarse sensiblemente operando con reflectancias más específicas (en nuestro caso ello representa una limitación, ya que el sistema trabaja sólo a seis longitudes de onda fija) y con grupos de muestras más homogéneos.

En todas las Tablas se puede apreciar claramente las dos mejoras señaladas, especialmente la última. Esto es lógico ya que al utilizar muestras cada vez más uniformes, se simplifica el número de compuestos en las muestras y las vibraciones moleculares de éstas resultan más específicas, proporcionando relaciones más estrechas entre señales ópticas y concentraciones.

La selección de reflectancias óptimas se resume en la Fig. 1. Dicha selección procede de las Tablas antes citadas y en la figura se localizan para los parámetros estudiados. Así, se puede ver que la R_3 ó $\lambda_4 = 2.18 \mu\text{m}$ resulta ser la reflectancia principal para NDF, ADF, DNDF y DMD "in vivo", siendo secundaria para Proteína, DMD "química" y DMD "in vitro".

Otra longitud de onda muy destacada en E.R.I. es la de $1.94 \mu\text{m}$, siendo característica de Lignina, DMD "química" y también de NDF, ADF, Celulosa y DNDF. R_1 es típica de Proteína, R_1 de DMD "in vitro" y R_6 de Celulosa. Así pues, se puede afirmar que la localización de longitudes de onda en la Fig. 1 difiere sensiblemente, para determinados parámetros, de aquella que encontraron NORRIS y cols. (8).

CONCLUSIONES

Los resultados ponen de manifiesto claramente que una vez calibrado el aparato de R.I., éste puede utilizarse para el análisis y evaluación automática de forrajes con errores medios de estimación del orden de 1.0 para Proteína, 2-3 para NDF, 1.8 para Celulosa y ADF, 2-4 para DNDF y DMD "química" y de 1-3 para DMD, OMD y D-value "in vitro" e "in vivo".

Toda buena calibración de un sistema de E.R.I. requiere:

a) Disponer de muestras patrón de composición conocida lo suficientemente representativas de un conjunto y con una distribución lineal de frecuencias homogénea.

- b) Un estudio de las curvas espectrales de la reflectancia para muestras típicas y de la localización de reflectancias o longitudes de onda más apropiadas.
- c) Una selección de reflectancias mediante análisis de regresión múltiple paso a paso.
- d) Obtener las ecuaciones de calibración o estimación que mayor bondad ofrezcan en la predicción de los diversos parámetros.

Reconocimiento: Los autores agradecen la colaboración técnica prestada por J. Bustos y M.^a Gómez Gutiérrez.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BARNES, R. F. 1973: Laboratory methods of evaluating feeding value of herbage; Ch. 32, Vol. 3, pp. 179-214. In: G. W. Butler and R. W. Bailey Ceds. Chemistry and Biochemistry of Herbages. Academic Press, New York.
- (2) COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX. 1961: Research Techniques in use at the G.R.I., Hurley, Bull. 45 (Members of the Institute staffe).
- (3) GARCÍA CRIADO, B. 1974: Fraccionamiento químico de alimentos forrajeros y su evaluación por métodos de laboratorio. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- (4) GARCÍA CRIADO, B., LEÓN MORÁN, L. y GARCÍA CIUDAD, A. 1977: Determinación directa de proteína, NDF, ADF, Lignina, DNDF, DMD en plantas herbáceas mediante reflectancia de infrarrojos. XVII Reunión Científica, S.E.E.P. Córdoba.
- (5) GARCÍA CRIADO, B., ESCUDERO BERIAN, A., PUERTO MARTÍN, A. y GÓMEZ GUTIÉRREZ, J. M. 1978: A study of the heterogeneity of herbaceous communities by means of their floristic compositions and feeding value. 7th General Meet., Europ. Grassld Fed., Gent-Belgica.
- (6) GARCÍA CRIADO, B. y GARCÍA CRIADO, L. 1978: Influencia de la madurez y frecuencia de corte sobre la producción y calidad de cultivares de *Trifolium repens*. XVIII Reunión Científica, S.E.E.P., Santander.
- (7) GOERING, H. K. and VAN SOEST, P. J. 1970: Forage Fiber analysis. Agric. Handb. 379, U. S. Dep. Agric.
- (8) NORRIS, K. H., BARNES, R. F., MOORE, R. F. and SHENK, J. S. (1976): Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. J. Anim. Sci., 43: 889-897.
- (9) RAYMOND, W. F. 1969: The nutritive value of forage crops. Adv. Agron. 21, 1.
- (10) SHENK, J. S., MASON, W. N., RJUSTUS, M. L., NORRIS, K. H. and BARNES, R. F. 1976: Application of infrared reflectance analysis to feedstuff evaluation. First Int. Symp. on Feed Comp. Anim. Requir. and Comput of Diets. Utah state Univ., Logan, Utah.
- (11) SHENK, J. S. and HOOVER, M. R. 1976: Infrared Reflectance spectro-computer desing and application. 7th Technicon Int. Congress, New York.
- (12) SHENK, J. S., NORRIS, K. H., BARNES, R. F. and FISSEL, G. W. 1977a: Forage and feedstuff analysis with infrared reflectance. XIII Int. Grassld. Congress, Leipzig - DDR, 454-464.
- (13) SHENK, J. S. 1977: The role of plant breeding in improving the nutritive value of forages. J. Dairy Sci., 62, 2, 300-305.
- (14) SHENK, J. S. and BARNES, R. F. 1977b: Current status of infrared reference. 34th Southern Pasture and Forage Crop Improv. Conf., Auburn-Alabama.
- (15) SULLIVAN, J. T. 1969: Chemical composition of forage with reference to the needs of the grazing animal. U.S. Dep. Agric. ARS, 34-107, 1.
- (16) TILLEY, J. M. A. and TERRY, R. A. 1968: Procedure for the in vitro digestion of herbage samples. The G.R.I., Hurley (Trabajo no publicado).

AUTOMATIC ANALYSIS AND EVALUATION OF FORAGE BY INFRARED REFLECTANTE
SPECTROSCOPY. OPTIMIZATION OF WAVELENGTHS

SUMMARY

Infrared reflectance spectroscopy (I.R.S.) technique is studied for automatic evaluation and analysis of forage and fibrous food. Spectral curves of the forage reflectance clearly show that they are compound curves and characteristics of the various chemical constituents of grass.

Such chemical constituents or quality factors are not directly determined by I.R.S. but they can be so, after calibration, through prediction equations obtained from composition samples or known animal responses. Once the system has been calibrated may determine multiple quality factors in just a few minutes.

The study of this analysis system exactness and accuracy presents relatively low stimulation standard errors (between 0.5 and 4 %) thus allowing for its utilization. Results are perceptibly improved by especial selections of wavelengths.