

Determinación directa de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en plantas herbáceas mediante reflectancia de infrarrojos

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

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

RESUMEN

La determinación rápida y precisa de análisis es quizás el principal objetivo de todo laboratorio, sea cual fuere el fin a que esté destinado. La técnica de análisis por reflectancia de rayos infrarrojos proporciona uno de los métodos más simples, rápido, preciso y económico que hasta la fecha se conoce para la cuantificación de determinados parámetros.

En el presente estudio se calibra un aparato de análisis automático de reflectancia de I.R. para la determinación rutinaria de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en plantas herbáceas. Para ello se realiza un análisis estadístico de los resultados correspondientes a cada uno de los parámetros considerados, comparando el análisis automático frente al manual (métodos de KJELDAHL y VAN SOEST).

Se pone de manifiesto que la nueva técnica de análisis resulta muy precisa y exacta; los datos que ella proporciona, de todos los parámetros ensayados, son significativamente idénticos (nivel de probabilidad superior al 99 %) a los obtenidos con los procedimientos de laboratorio, para errores standard e índices de error sistemático muy aceptables. Además, la citada técnica, aparte de no precisar reactivos de ninguna clase, presenta la gran ventaja de poder determinar conjuntamente proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en sólo dos minutos.

INTRODUCCIÓN

Los programas de evaluación de alimentos precisan cada día de mejor, mayor y más rápida información de la composición y calidad de los productos.

A este respecto, en la década 1960-70 se introduce el uso de detergentes (VAN SOEST, 1963a, 1963b, 1964, 1965a, 1965b, 1966; 1967, 1971; 1973; VAN SOEST y cols., 1965, 1967, 1968; GARCÍA, 1975) y la estimación indirecta de la digestibilidad de forrajes, mediante técnicas de laboratorio. Ello supone nada menos que poder evaluar correctamente el valor nutritivo de la hierba, disponiendo simplemente de sólo unos gramos de material y de forma rápida y precisa; se entiende en comparación con las técnicas clásicas (método de WEENDE y otros).

Es innegable, por tanto, el avance que para la nutrición ha supuesto la teoría y técnicas de VAN SOEST. Pero dichas técnicas requieren adiestramiento y cierto tiempo, ya que se precisan bastantes operaciones y todas ellas delicadas; eso se comprende rápidamente, si se tiene en cuenta que el fundamento de dichas técnicas es la gravimetría (un análisis completo mediante los métodos de VAN SOEST precisa: 2 pesadas de la muestra, 2 digestiones de una hora cada una, 2 taradas de crisoles, 1 tratamiento de tres horas con ácido sulfúrico, 5 pesadas de crisoles, 2 secados de ocho horas en estufa a 100° C, 2 calcinaciones a 450° C y 5 enfriamientos en desecador). Según lo expuesto, se comprende que dicho proceso requiere elevado número de horas, reactivos y equipo de laboratorio.

La utilización de la técnica analítica de la reflectancia en el I.R. cercano, aplicada al análisis de forrajes, faculta la posibilidad de determinar en pocos minutos los principales parámetros en la evaluación de alimentos. En la presente comunicación se pretende exponer la aplicación de esta técnica para la determinación de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en muestras de plantas herbáceas y ver qué posibilidades ofrece.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objeto de ver cuáles eran las posibilidades y limitaciones del sistema automático Infra-Alyzer en el análisis de forrajes, se eligieron muestras típicas y representativas de comunidades herbáceas naturales de Ballicares; Majadales, Pastizales de efímeras, Ballicares de siega y Prados semiagostantes, tomadas todas ellas en el control del crecimiento primario. Aunque el número de muestras varía al estudiar cada uno de los parámetros (tablas I-VI), en todos los casos considerados intervienen muestras de las comunidades referidas en mayor o menor proporción.

Las citadas muestras, una vez secadas a 80° C en estufa de aire forzado, se molieron en un micro-molino sistema *culatti* con tamiz de luz de malla 0,7 mm. y se homogeneizaron cuidadosamente por cuarteo; en esta preparación estuvieron siempre en cuenta las recomendaciones y sugerencias hechas por GRAHAM (1975), GRAHAM y COLLINS (1976) y WILLIAMS (1975, 1976).

Las determinaciones analíticas se realizaron químicamente (por duplicado) y una sola vez con el sistema automático Infra-Alyzer de Technicon D.J., que trabaja por reflectancia en el infrarrojo cercano a las longitudes de onda de 1.68, 1.94, 2.10, 2.18, 2.23 y 2.31 μm .; esta última técnica fue puesta a punto previamente.

Las técnicas químicas utilizadas son aquellas que normalmente se siguen en nuestro laboratorio de análisis. Con estas técnicas, puestas a punto y estudiadas por nosotros (GARCÍA, 1975), se determina.

Proteína (N x 6.25), siguiendo el método Kjeldahl utilizando un bloque digestor Technicon BD-40 y realizando la valoración en el Bouat-Afora.

Fibra neutro-detergente (NDF), fibra ácido-detergente (ADF), lignina, pared celular digestible (DNDF) y digestibilidad de la sustancia seca (DMD), siguiendo los procedimientos propuestos por VAN SOEST (1963a, 1963b, 1965a, 1965b), VAN SOEST y WINE (1967) y GOERING y VAN SOEST (1970), ligeramente modificados por nosotros (GARCÍA, 1975), ya que las digestiones para obtener NDF y ADF se hicieron en un bloque digestor Technicon BD-40; para la lignina se siguió el procedimiento del ácido sulfúrico al 72 % propuesto por VAN SOEST (1963b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizados los análisis químicos de las muestras de forraje por duplicado se procedió a un análisis estadístico de los resultados obtenidos para cada parámetro. Con ello se rechazan aquellas muestras cuyas diferencias de valores entre las dos determinaciones excedan de 20 veces la desviación standard de los duplicados; un estudio sobre este tema aplicado al Infra-Alyzer ha sido realizado por CALANDRA (1976).

La pareja de valores no rechazados de cada uno de los parámetros se utiliza como valores definitivos de referencia, previamente hallada la media. Estos valores se encuentran expresados, respectivamente, en las tablas I (método de análisis, KJELDAHL), II, III, IV, V y VI (método de análisis, VAN SOEST) para proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD.

En las citadas tablas figuran también los resultados del análisis automático (método de análisis, R.I.). Estos valores son los que se han utilizado en el calibrado del aparato y son los que vamos a comparar frente a las determinaciones manuales. Sin embargo, conviene destacar que dichos datos proceden de la estimación mediante la ecuación (I):

$$(I) \quad \% \text{ de un parámetro} = K_1 \log_1 + K_2 \log_2 + K_3 \log_3 + K_4 \log_4 + K_5 \log_5 + K_6 \log_6 + K_7.$$

Esta ecuación es el resultado de la combinación entre aspectos ópticos y estadísticos, donde $K_1, K_2, K_3, K_4, K_5, K_6$ y K_7 son los coeficientes de regresión, y $\log_1, \log_2, \log_3, \log_4, \log_5, \log_6$, los logaritmos de las reflectancias leídas a las seis longitudes de onda con que opera el aparato. El valor actual de cada parámetro y muestra se registra en el soporte magnético de un ordenador de mesa Helwlett Packard 9815A que trabaja en simultáneo con el aparato.

Con el fin de conocer la significación estadística de los resultados obtenidos para cada parámetro en particular, en las tablas I-VI se expresan también las diferencias entre las observaciones obtenidas en el laboratorio y con el aparato. Asimismo, se incluyen las medias correspondientes, los límites extremos, varianzas, desviaciones típicas (individual y conjunta), t de Student (experimental y teórica procedente de tablas estadísticas), error standard, coeficiente de correlación múltiple e índice de error sistemático.

Las diferencias observadas entre valores de las determinaciones obtenidas con los métodos de análisis utilizados, R.I. frente al de KJELDAHL o al de VAN SOEST, son muy pequeñas. En la determinación de lignina (tabla IV) aparecen las menores diferencias (media = $\pm 0,27$) y error standard, lo cual

TABLA NUM. I

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO KJELDAHL Y LA TECNICA DE R.I. EN LA DETERMINACION DE PROTEINA

Muestra número	Método de análisis		Diferencias
	R.I.	Kjeldahl	
1	17,64	18,41	— 0,77
2	18,53	18,78	— 0,25
3	13,97	13,62	0,35
4	7,81	7,94	— 0,13
5	7,97	7,93	0,04
6	18,29	18,36	— 0,07
7	18,51	17,99	0,52
8	13,63	12,92	0,71
9	9,82	9,39	0,43
10	19,83	20,14	— 0,31
11	11,01	11,19	— 0,18
12	16,12	16,02	0,10
13	12,29	12,18	0,11
14	8,11	9,19	— 1,08
15	6,89	7,26	— 0,37
16	13,01	13,43	— 0,42
17	14,44	14,41	0,03
18	14,50	14,53	— 0,03
19	11,06	12,30	— 1,24
20	10,66	9,35	1,31
21	7,42	7,00	0,42
22	12,16	12,18	— 0,02
23	13,90	13,54	0,36
24	13,22	11,99	1,23
25	11,47	11,57	— 0,10
26	6,04	7,33	— 1,29
27	15,19	16,40	— 1,21
28	13,98	13,15	0,83
29	17,13	16,05	1,08
30	13,06	13,06	0,00
31	9,68	10,60	— 0,92
32	14,37	13,03	1,34
33	16,92	15,64	1,28
34	17,02	17,51	— 0,49
35	13,31	13,71	— 0,40
36	9,01	9,78	— 0,77
37	15,84	16,14	— 0,30
38	12,88	13,29	— 0,41
39	9,22	8,43	0,79
40	6,52	6,09	0,43
41	6,41	6,21	0,20
42	17,54	18,16	— 0,62
43	13,68	14,12	— 0,44
44	14,06	14,47	— 0,41
45	11,83	11,36	— 0,47
46	18,35	18,92	— 0,57
47	16,87	16,87	0,00
48	17,70	17,16	0,54
49	16,77	16,23	0,54
50	15,97	15,41	0,56

TABLA NUM. I (Continuación)

Muestra número	Método de análisis		Diferencias
	R.I.	Kjeldahl	
51	14,05	13,24	0,81
52	11,11	11,48	— 0,37
53	17,23	17,77	— 0,54
54	13,16	12,82	0,34
55	13,61	13,12	0,49
56	10,85	10,34	0,51
57	9,78	10,08	— 0,30
58	21,43	21,32	0,11
59	19,86	19,91	— 0,05
60	19,58	19,21	0,37
61	21,04	21,90	— 0,86
62	19,66	20,26	— 0,60
63	13,81	14,17	— 0,36
64	13,97	14,29	— 0,32
65	14,30	14,76	— 0,46
66	13,18	13,24	— 0,06
67	12,59	11,83	0,76
68	11,19	10,54	0,65
69	16,99	16,75	0,24
70	17,49	17,80	— 0,31
71	17,74	17,92	— 0,18
72	16,33	17,10	— 0,77
Medias	13,90	13,90	± 0,50
V. extremos	6,04-21,43	6,09-21,90	— 1,29-1,34
Varianza	14,42	16,80	
Desviación típica	3,80	4,09	

Desviación típica conjunta = 3,95.

$t_{exp} = 0,0004$; $t_{tecr} = 2,60$ (prob. 99 %).

Error standard = 0,648.

Coefficiente de correlación múltiple: $R = 0,972$ (Ecuación [I]).

Índice de error sistemático: — 0,013.

es lógico, puesto que dicha entidad presenta la menor magnitud de sus valores y los límites extremos más estrechos; por tanto, también aquí se dan las menores varianzas y desviaciones típicas.

Las mayores diferencias y errores standard aparecen para DMD y DNDF, como consecuencia de su mayor magnitud (medias de las observaciones registradas 65,66 y 27,58 %, respectivamente) y la acumulación de errores arrastrados desde las otras determinaciones; ambos parámetros se estiman en función de los contenidos de NDF, ADF y lignina. Pese a todo esto, los datos suministrados por el autoanализador son muy concordantes con los determinados químicamente, ya que las medias de las citadas diferencias no pasan de ± 1,01.

TABLA NUM. 2

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO DE VAN SOEST Y LA TECNICA DE R.I.
EN LA DETERMINACION DE N.D.F.

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		Diferencias
	R.I.	Van Soest	
1	57,91	58,52	-0,61
2	53,27	53,35	-0,08
3	58,57	57,95	0,62
4	45,85	47,74	-1,89
5	48,65	49,60	-0,95
6	56,40	55,78	0,62
7	47,96	46,83	1,13
8	47,98	49,87	-1,89
9	43,21	43,47	-0,26
10	51,31	49,53	1,78
11	55,87	55,18	0,69
12	61,95	60,65	1,30
13	46,00	44,00	2,00
14	47,76	46,25	1,51
15	38,48	40,17	-1,69
16	43,03	43,17	-0,14
17	41,02	39,92	1,10
18	38,95	39,25	-0,30
19	39,92	41,47	-1,55
20	41,62	39,78	1,84
21	42,92	42,60	0,32
22	40,97	41,90	-0,93
23	49,14	49,00	0,14
24	46,47	44,95	1,52
25	49,50	49,97	-0,47
26	52,92	51,57	1,35
27	50,95	49,32	1,63
28	56,76	57,57	-0,81
29	63,43	64,98	-1,55
30	66,30	67,32	-1,02
31	45,11	44,82	0,29
32	55,48	54,65	0,83
33	57,67	56,66	1,01
34	61,52	63,13	-1,61
35	66,90	67,37	-0,47
36	52,41	52,12	0,29
37	52,26	52,45	-0,19
38	54,30	55,68	-1,38
39	45,59	46,70	-1,11
40	48,89	48,62	0,27
41	61,64	59,77	1,87
42	52,09	53,55	-1,46
43	61,13	61,05	0,08
44	44,64	44,62	0,02
45	57,85	59,45	-1,60
46	42,62	42,65	-0,03
47	54,89	56,50	-1,61
48	60,18	59,53	0,65
49	47,15	45,77	1,38
50	50,77	51,48	-0,71

TABLA NUM. 2 (Continuación)

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
51	61,07	59,67	1,40
52	67,90	67,87	0,03
53	52,62	53,70	- 1,08
54	60,32	60,58	- 0,26
Medias	51,85	51,85	± 0,95
V. extremos	38,48-67,90	39,25-67,37	- 1,89-1,87
Varianza	59,62	60,92	
Desviación típica	7,72	7,80	

Desviación típica conjunta = 7,76.

$t_{exp} = 0,0002$; $t_{teor} = 2,63$ (prob. 99 %).

Error standard = 1,211.

Coficiente correlación múltiple: $R = 0,976$ (Ecuación [II]).

Indice de error sistemático: - 0,095.

TABLA NUM. 3

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO DE VAN SOEST Y LA TECNICA DE R.I.
EN LA DETERMINACION DE A.D.F.

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
1	23,36	23,42	- 0,06
2	25,36	24,68	0,68
3	35,86	36,02	- 0,16
4	20,73	20,70	0,03
5	31,41	31,35	0,06
6	26,36	27,30	- 0,94
7	30,48	31,00	- 0,52
8	34,72	34,73	- 0,01
9	34,98	34,33	0,65
10	31,56	32,00	- 0,44
11	34,44	33,95	0,49
12	30,01	30,55	- 0,54
13	35,79	35,80	- 0,01
14	26,87	26,22	0,65
15	27,27	26,73	0,54
16	28,31	28,05	0,26
17	24,98	24,90	0,08
18	33,97	33,10	0,87
19	37,33	36,52	0,81
20	27,31	28,00	- 0,69
21	27,12	26,17	0,95

TABLA NUM. 3 (Continuación)

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
22	34,14	34,05	0,09
23	30,44	30,59	-0,15
24	26,85	25,70	1,15
25	23,19	23,07	0,12
26	24,59	25,38	-0,79
27	25,76	26,43	-0,67
28	26,49	26,72	-0,23
29	24,81	25,47	-0,66
30	32,03	32,20	-0,17
31	27,35	27,65	-0,30
32	28,35	27,15	1,20
33	33,79	33,03	0,79
34	28,50	28,85	-0,35
35	29,66	29,45	0,21
36	26,38	26,67	-0,29
37	28,23	28,20	0,03
38	29,96	29,40	0,56
39	30,94	31,95	-1,01
40	37,60	38,17	-0,57
41	26,83	25,57	1,26
42	37,14	37,23	-0,09
43	37,98	37,28	0,70
44	29,06	29,55	-0,49
45	28,29	29,03	-0,74
46	25,41	25,00	0,41
47	35,23	34,33	0,90
48	26,39	26,87	-0,48
49	27,10	27,43	-0,33
50	32,97	32,23	0,74
51	33,08	33,05	0,03
52	36,73	37,65	-0,92
53	24,82	25,03	-0,21
54	32,61	33,65	-1,04
55	24,88	25,40	-0,52
56	29,00	29,30	-0,30
57	32,48	31,75	0,73
58	27,29	27,47	-0,18
59	32,84	31,92	0,92
60	37,67	40,71	-3,04
61	27,28	27,33	-0,05
62	32,39	31,85	0,54
63	32,53	31,45	1,08
64	21,11	20,42	0,69
Medias	29,82	29,84	± 0,55
V. extremos	20,73-37,98	20,42-38,17	-1,04-1,26
Varianza	19,05	19,62	
Desviación típica	4,36	4,39	

Desviación típica conjunta = 4,39.

$t_{exp} = -0,3353$; $t_{err} = 2,62$ (prob. 99 %).

Error estandar = 0,750.

Coefficiente correlación múltiple: $R = 0,972$ (Ecuación [I]).

Indice de error sistemático: -0,021.

TABLA NUM. 4

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO DE VAN SOEST Y LA TECNICA DE R.I.
EN LA DETERMINACION DE LIGNINA

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
1	3,41	3,15	0,26
2	3,23	3,25	— 0,02
3	4,43	4,67	— 0,24
4	6,69	6,50	0,19
5	5,04	4,50	0,54
6	5,95	6,30	— 0,35
7	3,96	4,17	0,21
8	4,24	3,78	0,46
9	3,43	3,45	— 0,02
10	3,71	3,53	0,18
11	3,25	3,45	— 0,20
12	3,00	3,12	— 0,12
13	3,08	3,50	— 0,42
14	3,25	2,70	0,55
15	4,14	4,27	— 0,13
16	4,25	4,52	— 0,27
17	5,52	5,50	0,02
18	4,50	5,17	— 0,67
19	3,91	3,70	0,21
20	4,48	4,18	0,30
21	2,91	2,62	0,29
22	3,89	3,82	0,07
23	3,88	4,10	— 0,22
24	4,33	4,15	0,18
25	6,02	5,58	0,44
26	6,54	6,60	— 0,06
27	3,75	3,45	0,30
28	3,47	3,20	0,27
29	3,93	4,02	— 0,09
30	3,59	3,83	— 0,24
31	3,84	4,23	— 0,39
32	3,15	3,10	0,05
33	3,35	3,67	— 0,32
34	3,03	2,73	0,30
35	4,09	4,47	— 0,38
36	4,23	4,10	0,13
37	3,58	3,08	0,50
38	3,48	4,02	— 0,54
39	3,19	2,95	0,24
40	2,57	2,22	0,35
41	3,26	3,68	— 0,42
42	3,19	2,75	0,44
43	3,62	4,05	— 0,43
44	3,69	3,10	0,59
45	4,82	4,60	0,22
46	4,62	4,60	0,02
47	3,26	3,30	— 0,04
48	4,53	4,60	— 0,07
49	3,49	3,97	— 0,48
50	6,81	7,42	— 0,61

TABLA NUM. 4 (Continuación)

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
51	4,17	4,47	— 0,30
52	4,32	4,35	— 0,03
53	2,28	2,20	0,08
54	3,41	3,30	0,11
55	2,11	2,48	— 0,37
56	3,84	3,65	0,19
57	2,34	2,30	0,04
58	3,94	3,65	0,29
59	3,55	3,87	— 0,32
60	4,00	3,90	0,10
61	3,23	3,18	0,05
62	4,41	4,00	0,41
63	1,91	2,33	— 0,42
Medias	3,89	3,89	± 0,27
V. extremos	1,91-6,81	2,20-7,42	— 0,67-0,59
Varianza	1,02	1,12	
Desviación típica	1,02	1,06	

Desviación típica conjunta = 1,03.

$t_{exp} = -0,0005$; $t_{tecr} = 2,62$ (prob. 99 %).

Error estándar = 0,335.

Coefficiente correlación múltiple: $R = 0,900$ (Ecuación [1]).

Indice de error sistemático: 0,030.

TABLA NUM. 5

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO DE VAN SOEST Y LA TECNICA DE R.I. EN LA DETERMINACION DE D.N.D.F.

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
1	22,08	23,86	— 1,78
2	26,81	27,31	— 0,50
3	33,79	32,51	1,28
4	26,02	27,84	— 1,82
5	29,59	29,68	— 0,09
6	20,63	29,57	0,06
7	25,57	25,55	0,02
8	27,67	26,83	— 0,16
9	28,46	28,96	— 0,50
10	28,90	27,93	0,97
11	21,34	23,31	— 1,97

TABLA NUM. 5 (Continuación)

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		Diferencias
	R.I.	Van Soest	
12	17,39	17,61	— 0,22
13	43,90	42,68	1,22
14	27,29	27,64	— 0,35
15	20,64	19,08	1,56
16	28,32	27,54	0,78
17	23,95	22,04	1,91
18	26,55	26,74	— 0,19
19	25,07	25,74	— 0,67
20	21,78	21,21	0,57
21	23,65	22,89	0,76
22	19,91	20,02	— 0,11
23	25,18	25,85	— 0,67
24	26,68	25,48	— 1,20
25	23,21	24,30	— 1,09
26	28,86	27,29	1,57
27	20,15	22,16	— 2,01
28	24,03	23,23	0,80
29	25,86	27,01	— 1,15
30	23,13	22,94	0,19
31	33,62	31,92	1,70
32	33,27	34,80	— 1,53
33	34,04	32,83	1,21
34	25,26	24,17	1,09
35	35,86	36,92	— 1,06
36	24,47	22,25	2,22
37	41,07	42,57	— 1,50
38	25,09	24,15	0,94
39	22,74	24,22	— 1,48
40	42,07	44,02	— 1,95
41	27,58	26,43	1,15
42	36,68	37,05	— 0,37
Medias	27,34	27,53	± 1,01
V. extremos	17,39-43,90	17,61-44,02	— 2,01-2,22
Varianza	37,34	37,78	
Desviación típica	6,11	6,14	

Desviación típica conjunta = 6,13.

$t_{exp} = -0,1420$; $t_{ter} = 2,64$ (prob. 99 %).

Error estandar = 1,302.

Coefficiente de correlación múltiple: $R = 0,955$ (Ecuación [I]).

Indice de error sistemático: — 0,192.

Como consecuencia de lo anterior, los valores medios de las observaciones registradas, mediante ambas técnicas de análisis, son idénticos para cada uno de los parámetros. Según esto, si se admiten como valores reales de referencia los obtenidos en el laboratorio, se puede afirmar sin lugar a dudas que la técnica de análisis por reflectancia de infrarrojos es un medio sencillo, preci-

TABLA NUM. 6

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO DE VAN SOEST Y LA TECNICA DE R.I.
EN LA DETERMINACION DE D.M.D.

MUESTRA NUMERO	METODO DE ANALISIS		
	R.I.	Van Soest	Diferencias
1	66,74	66,87	— 0,13
2	64,69	64,69	0,00
3	62,57	62,50	0,07
4	61,05	62,03	— 0,98
5	64,35	64,32	0,03
6	65,56	65,93	— 0,37
7	65,83	67,14	— 1,31
8	64,77	65,80	— 1,03
9	64,74	64,88	— 0,14
10	67,08	68,34	— 1,26
11	64,53	63,31	1,22
12	61,81	61,10	0,71
13	66,70	64,81	1,87
14	64,09	64,77	— 0,68
15	63,05	63,42	0,37
16	68,54	68,67	— 0,13
17	69,49	71,20	— 1,71
18	64,91	66,44	— 1,53
19	65,09	66,24	— 1,15
20	64,71	64,06	0,65
21	59,40	61,38	— 1,98
22	66,43	65,59	0,84
23	58,92	57,19	1,73
24	62,79	61,66	1,13
25	63,65	60,97	2,68
26	68,63	66,52	0,11
27	67,48	66,15	1,33
28	65,00	66,36	1,64
29	67,70	66,50	1,20
30	64,98	64,38	0,60
31	68,09	68,91	— 0,82
32	67,18	66,45	0,73
33	65,85	67,84	— 1,99
34	63,29	63,48	— 0,19
35	67,17	65,50	1,67
36	66,92	67,52	— 0,60
37	68,40	66,67	1,73
38	70,46	71,71	— 1,25
39	66,58	67,55	— 0,97
40	70,09	72,38	— 2,29
41	66,79	68,12	— 1,33
42	68,87	69,22	— 0,35
Medias	65,59	65,66	± 1,01
V. extremos	58,92-70,46	57,19-72,38	— 1,99-2,68
Varianza	6,94	9,36	
Desviación típica	2,63	3,06	

Desviación típica conjunta = 2,85.

$t_{exp} = -0,1080$; $t_{ter} = 2,64$ (prob. 99 %).

Error estandard = 1,131.

Coefficiente de correlación múltiple: $R = 0,864$ (Ecuación [1]).

Indice de error sistemático: — 0,098.

so y exacto para la determinación de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en plantas herbáceas.

La importancia de esta afirmación es aún mayor si se tiene en cuenta el gran número de muestras consideradas para cada uno de los parámetros (tablas I-VI) y el amplio margen de concentraciones que se abarca en todos los casos (6-22 % para proteína, 38-68 % para NDF, 20-38 % para ADF, 1,91-7,42 % para lignina, 17-44 % para DNDF y 57-72 % para DMD), como lo demuestran los altos valores de las varianzas y desviaciones típicas; estas últimas se hallaron únicamente con la finalidad de servir como medida de la variación de las concentraciones que toman los respectivos parámetros en cada una de las series de muestras consideradas. Junto a esto, debe también señalarse que las muestras de las plantas proceden de cinco comunidades naturales diferentes que, a su vez, pertenecen a diversos estados vegetativos.

Si ahora se tiene en cuenta la *t* experimental de Student, resultante de comparar estadísticamente los valores encontrados en la determinación de los respectivos parámetros, obtenidos mediante R.I. y manualmente se puede observar en las seis tablas citadas valores bajos de dicha *t* frente a los de la *t* teórica procedente de tablas estadísticas. Así, pues, se puede admitir que las dos técnicas de análisis proporcionan resultados iguales con una probabilidad superior al 99 %. Esto no es más que corroborar lo que antes se había dicho, lo cual es consecuencia evidente de los elevados coeficientes de correlación múltiple resultantes (se recuerda que proceden de la regresión que utiliza el Infra-Alyzer en la estimación de cada uno de los parámetros).

Conviene señalar también que es posible alcanzar aún mayor exactitud con la nueva técnica de R.I., si se hacen uno o más calibrados del aparato tomando muestras con intervalos de concentraciones menores a los que aquí se utilizan. Además, por otra parte, se pueden eliminar ciertas muestras, donde la diferencia entre los dos valores observados sea grande, lo que permitiría realizar un calibrado más perfecto. Esta última operación debe hacerse en el caso de lignina y DMD, ya que desde un punto de vista altamente significativo el coeficiente de correlación múltiple debe ser mayor de 0,95.

Otro factor importante que siempre ha de tenerse en cuenta en todo tipo de determinaciones rutinarias es el tiempo que se invierte en la operación. La técnica de reflectancia de infrarrojos permite determinar secuencialmente las concentraciones de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en una muestra de planta, en unos dos minutos.

Con un Infra-Alyzer calibrado se puede realizar muy bien la determinación cuantitativa de los seis parámetros citados en unas 40 ó 50 muestras a la hora. El analizar dichas muestras usando los métodos químicos convencionales, posiblemente supone a un operador adiestrado más de semana y media de trabajo continuo y con mayor riesgo de error (con el nuevo sistema de análisis los índices de error sistemático encontrados fueron: —0,013, —0,095, —0,021, 0,030, —0,192 y —0,098 respectivamente para los seis parámetros).

Se puede finalmente concluir que la nueva técnica de análisis por reflectancia de infrarrojos es el medio más rápido que se conoce para la determinación precisa y exacta de la proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en material seco de plantas herbáceas.

Se destaca especialmente la labor de puesta a punto del analizador automático Infra-Alyzer, prestada por J. Holgado, de la firma Technicon España, S. A., y la colaboración de M.^a A. Sánchez y J. Bustos por su ayuda en la ejecución en los análisis químicos y tratamiento estadístico de datos, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CALANDRA, F., 1976: *Determinación inmediata por reflectancia en el infrarrojo del aceite residual en harinas de girasol*. SIMSA. Laboratorio de Control. Pontejos (Santander).
- (2) GARCÍA, C.B., 1975: *Fraccionamiento químico de alimentos forrajeros y su evaluación por métodos de laboratorio*. Acta Salmanticensia. Serie de Ciencias, 53.
- (3) GOERING, H.K., and VAN SOEST, P.J., 1970: *Forage analysis*. Agric. Handb., 379. U.S. Dep. Agric.
- (4) GRAHAM, T.F., 1975: *Analysis of samples with the InfraAlyzer unit*. TIS News Infraletter, vol. 1, núm. 1.
- (5) GRAHAM, T.F. and COLLINS, F.I., 1976: *Optimum Sample preparation: The Key to accurate analysis by infrared reflectance*. TIS News Infraletter, vol. 2, núm. 1.
- (6) VAN SOEST, P.J., 1963a: *Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low Nitrogen content*. J. Ass. Off. Agric., Chem. 46, 825.
- (7) VAN SOEST, P.J., 1963b: *Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin*. J. Ass. Off. Agric. Chem., 46, 829.
- (8) VAN SOEST, P.J., 1964: *Symposium on Nutrition and forage and pastures new chemical procedures for qualifying forages*. J. Anim. Sci., 23, 838.
- (9) VAN SOEST, J.J., 1965a: *Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. III Study of effects of beating and drying on field of fiber and lignin in forages*. J. Ass. Off. Agric. Chem., 48, 4, 785.
- (10) VAN SOEST, P.J., 1965b: *Comparison of two different equations for the prediction of digestibility from cell contents, cell wall constituents and the lignin content of acid-detergent fiber*. J. Dairy Sci., 48, 845.
- (11) VAN SOEST, and MOORE, L.A., 1965: *New chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value*. Proc. IX. Int. Grassld. Congr., Sao Paulo, Brasil, paper 626.
- (12) VAN SOEST, P.J., 1966: *Nonnutritive residues: A system of analysis for the replacement of crude fiber*. J. Ass. Off. Anal. Chem., 49, 546.
- (13) VAN SOEST, P.J., 1967: *Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forage*. J. Anim. Sci., 26, 199, 128.
- (14) VAN SOEST, P.J., and WINE, R.H., 1967: *Use of detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant cell wall constituents*. J. Ass. Off. Agric. Chem., 50, 50.
- (15) VAN SOEST, P.J., and WINE, R.H., 1968: *Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with Permanganate*. J. Ass. Off. Agric. Chem., 51, 4, 780.
- (16) VAN SOEST, P.J., 1971: *Estimation of nutritive value from laboratory analysis*. Cornell Nutr. Cong. Feed. Manuf., 106.
- (17) VAN SOEST, P.J., 1973: *Feeds. Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin*. J. Ass. Off. Agric. Chem., 56, 4, 781.
- (18) WILLIAMS, P.C., 1975: *Applications of New Infrared Reflectance Spectroscopy to Analysis of cereal grains and oil seeds*. Cereal Chem., 52, 4.
- (19) WILLIAMS, P.C., 1976: *Sampling and Sample preparation for infrared reflectance spectroscopy (I.R.S.)*. Analysis of grains. TIS News Infraletter, vol. 2, núm. 1.

DIRECT DETERMINATION OF PROTEIN, NDF, ADF, LIGNINE, DNDF AND
DMD IN HERBAGE PLANTS BY INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY

SUMMARY

To carry out analysis quickly and precisely is perhaps the main object of any laboratory whatever its aim may be. Analysis technic by infrared ray reflectance gives one of the simpler, quicker and more precise and economic methods known up to date for the quantification of determined parametres.

In the present paper an automatic analysis machine by I.R.S. is calibrated for rutinary determination of Protein, NDF, ADF, Lignine, DNDF and DMD in herbage plants. A statistical analysis of the results corresponding to each one of the considered parametres is carried out for the purpose, contrasting the automatic analysis with the manual one (KJELDAHL and VAN SOEST methods).

It is proved that this new technique works precisely and accurately; data of all tested parametres given in this way are significantly (level of probability higher than 99 %) identical to those obtained by laboratory proceedings for very aceptable standard errors and indexes of sistematic error. Moreover this technique, apart from needing no reactive substance, offers the great advantage of being able to measure: Protein, NDF, ADF, Lignine, DNDF and DMD altogether in just two minutes.