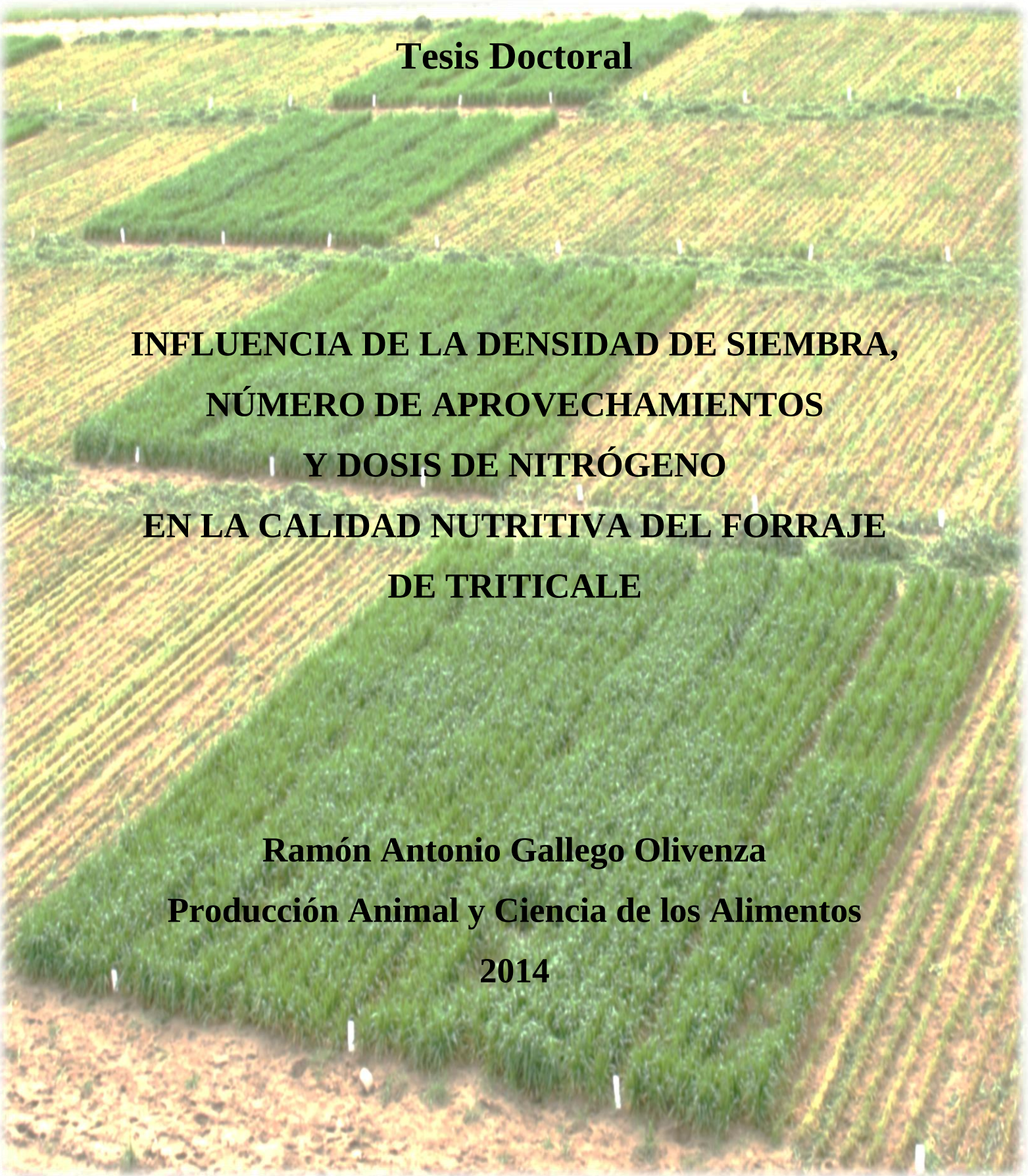
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DE SIEMBRA, NÚMERO DE APROVECHAMIENTOS Y DOSIS DE NITRÓGENO EN LA CALIDAD NUTRITIVA DEL FORRAJE DE TRITICALE

Ramón Antonio Gallego Olivenza

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2014

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DE SIEMBRA, NÚMERO DE APROVECHAMIENTOS Y DOSIS DE NITRÓGENO EN LA CALIDAD NUTRITIVA DEL FORRAJE DE TRITICALE

Ramón Antonio Gallego Olivenza

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Conformidad de los Directores

Fdo.: Dr. Fernando Llera Cid	**Fdo.: Dr. David Tejerina Barrado**	**Fdo.: Dr. Pedro Luis Rodriguez Medina**

2014

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A la finca La Orden perteneciente al CICYTEX, propiedad del Gobierno de Extremadura, en la que se han realizado los ensayos facilitándome todos los medios necesarios.

A todo el personal de La Orden, portándose de manera excepcional conmigo. Especialmente a las personas del departamento de cultivos extensivos y al laboratorio general.

A mis Directores David, Pedro y Fernando, por vuestro saber hacer, los buenos ratos que hemos pasado, vuestra paciencia y porque sin vosotros esta Tesis no sería lo mismo.

A Verónica Cruz por su forma de ser, ayuda, correcciones y opiniones para que esta Tesis sea mejor.

A Fernando Llera por acogerme desde el primer día.

A mi familia.

CICYTEX
CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DE EXTREMADURA

UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Una manera de hacer Europa

la orden
centro de investigación la orden - valdesequera

INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DE SIEMBRA, NÚMERO DE APROVECHAMIENTOS Y DOSIS DE NITRÓGENO EN LA CALIDAD NUTRITIVA DEL FORRAJE DE TRITICALE

Ramón Antonio Gallego Olivenza

2014

Índice

Índice

1. Resumen **1**

2. Revisión bibliográfica **5**

2.1. El Triticale 7

2.1.1. Historia y origen 7

2.1.2. Clasificación 8

2.1.3. Situación actual del cultivo de triticale 10

2.1.3.1. Situación mundial 10

2.1.3.2. Situación europea 12

2.1.3.3. Situación en España 13

2.1.3.4. Situación en Extremadura 15

2.1.4. La dehesa 17

2.1.4.1. El triticale en la dehesa 18

2.1.5. Utilización y aprovechamiento de triticale 19

2.1.5.1. Utilización del grano de triticale 20

2.1.5.2. Otros usos del triticale en la agricultura 20

2.1.5.3. El Triticale de doble aptitud 21

2.1.5.3.1. Manejo del triticale de doble aptitud 22

2.2. Calidad del triticale 24

2.2.1. Calidad del grano de triticale 25

2.2.2. Calidad del forraje de triticale 25

2.2.2.1. Proteína del forraje 26

2.2.2.2. Fibra Bruta (FB), Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD) y Lignina Ácido Detergente (LAD) 28

2.2.2.3. Valor Relativo del Forraje (VRF) 33

2.3. Tecnología NIRs 34

2.3.1. Origen y desarrollo de la técnica NIRs 34

2.3.2. Fundamentos básicos de la espectroscopia 35

2.3.2.1. Radiación electromagnética y su infrarrojo cercano 35

2.3.2.2. Interacción radiación-materia en el infrarrojo cercano 36

2.3.2.3. Enlaces moleculares e información generada mediante radiación 37

2.3.3. Equipos NIRs 38
2.3.3.1. Monocromadores de barrido 39
2.3.4. Fuentes de error en análisis NIRs 40
2.3.5. Calibraciones cuantitativas NIRs 40
2.3.6. Tratamiento de datos espectrales 41
2.3.6.1. Tratamientos matemáticos 41
2.3.7. Muestras aberrantes o extrañas 42
2.3.8. Métodos estadísticos para calibraciones NIRs 42
2.3.9. Criterios de selección de ecuaciones 44
2.3.10. Medición de la composición química de praderas mediante NIRs 49
2.3.11. Análisis cualitativo NIRs 50
2.3.11.1. Tipos de análisis cualitativo 51
2.3.11.2. Utilización del análisis cualitativo 57

3. Objetivos 65

4. Materiales y métodos 69
4.1. Materiales y métodos agronómicos 71
4.1.1. Duración y localización del ensayo 71
4.1.2. Material vegetal 71
4.1.3. Labores de cultivo 71
4.1.4. Clima 72
4.1.5. Grados Días Acumulados (GDA) 75
4.1.6. Caracterización del suelo 75
4.1.7. Diseño experimental 76
4.1.8. Muestreos 80
4.1.8.1. Campaña 2009/2010 80
4.1.8.2. Campaña 2010/2011 80
4.1.9. Procesado de muestras y análisis químicos 80
4.1.9.1. Proteína 81
4.1.9.2. Fibra bruta (FB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD) 81
4.1.9.3. Valor relativo del forraje (VRF) 81
4.1.10. Análisis estadístico 82

4.2. Tecnología NIRs 82
4.2.1. Selección del conjunto de muestras 83
4.2.2. Procesado de las muestras 85
4.2.3. Obtención de datos espectrales 85
4.2.4. Pretratamiento espectral 86
4.2.5. Métodos de referencia de las variables químicas 87
4.2.6. Análisis cuantitativo NIRs 87
4.2.6.1. Eliminación de *outliers* 87
4.2.6.2. Modelos de predicción NIRs
Calibración y validación 87
4.2.7. Análisis cualitativo NIRs 90

5. Resultados y discusión **95**
5.1. Capítulo I. Calidad del forraje de triticale de doble aptitud en función de la densidad de siembra, el número de aprovechamientos y la dosis de nitrógeno **97**
5.2. Capítulo II. Uso potencial de la tecnología NIRs para la cuantificación de parámetros químicos de calidad del forraje de triticale de doble aptitud **127**
5.3. Capítulo III. Clasificación del triticale de doble aptitud según la densidad de siembra, la fecha de corte y el abonado nitrogenado, mediante tecnología NIRs **159**

6. Conclusiones **238**

1. Resumen

El triticale de doble aptitud (forraje y grano) se utiliza, tradicionalmente, con una doble finalidad productiva y, por tanto, las técnicas empleadas para su cultivo varían significativamente respecto a las del triticale de grano. Además, factores como el cambio climático, el aumento de su demanda comercial, el incremento de las necesidades de pastoreo extensivo hace necesario ir adaptando estos cultivos y las prácticas culturales a la intensidad y velocidad de producción que se van imponiendo, con el objetivo de ampliar sus posibilidades de aprovechamiento y aplicar el uso de nuevas tecnologías emergentes que posibiliten minimizar los costes tanto de producción como de análisis nutricional. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de determinados factores agronómicos en la calidad nutritiva del forraje de triticale de doble aptitud, así como evaluar la capacidad predictiva de la tecnología NIRs para la cuantificación de parámetros químicos de su composición y establecer modelos de clasificación cualitativa. Para ello, se planteó un ensayo diseñado en *split split plot* (parcela sub-subdividida) y se evaluó el efecto de la densidad de siembra, el número de cortes (pastoreo simulado) y la dosis de nitrógeno sobre el contenido en Proteína Bruta (PB), Fibra Bruta (FB), Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD), Lignina Ácido Detergente (LAD) y su Valor Relativo del Forraje (VRF) del triticale (*X Triticosecale* Wittmack) de doble aptitud (forraje y grano) cv. `Verato´. Además, se aplicó la tecnología NIRs como alternativa a las metodologías convencionales para el análisis de los principales parámetros nutricionales, y así evaluar su uso potencial para el control de calidad de las muestras de una manera más rápida, económica y respetuosa con el medio ambiente.

Los resultados pusieron de manifiesto la influencia del ambiente en las variables estudiadas. Respecto a los factores de estudio, la densidad de siembra no tuvo influencia significativa ($p>0.05$) sobre la calidad del forraje. Sin embargo, al aumentar el número de cortes (aprovechamiento) se observó una disminución del contenido en PB y un aumento de la FB. El abonado nitrogenado aumentó significativamente el contenido de PB ($p<0.01$) y produjo un ligero incremento en la FND y FAD en la campaña 2009/2010 ($p<0.05$), provocando una disminución significativa del VRF en la misma campaña y en el año medio ($p<0.05$). Puede concluirse que la densidad de siembra no influyó en ninguna de las variables, el número de aprovechamientos influyó significativamente en el contenido de PB, disminuyéndolo, y FB, aumentándolo, y el abonado nitrogenado aumentó significativamente el contenido de PB (en ambas campañas), FND y FAD (en la primera campaña), produciendo una disminución del VRF.

Con respecto al análisis de predicción cuantitativa NIRs del contenido en PB, FB, FND, FAD y LAD aplicando diferentes pretratamientos espectrales (absorbancia, corrección multiplicativa extensiva de la señal (EMSC), corrección dispersiva desviación estándar normalizada (SNV), 1ª y 2ª derivada (con diferentes valores de intervalo de sustracción o GAP y longitud del segmento de suavizado) y combinaciones entre ellos, se observó que el

pretratamiento espectral con mayor capacidad predictiva, para la PB, resultó ser EMSC, con un coeficiente de determinación en validación cruzada (1-VR)= 0.9835 y un error estándar de validación cruzada (EE_{VC})=0.7965. El modelo óptimo para la cuantificación de la FB fue la primera derivada (1,10,15), con un 1-VR=0.6949 y un EE_{VC}=1.6181. Para la FND y la LAD fue la segunda derivada (2,10,15), con un 1-VR=0.7842 y un EE_{VC}=1.4573 y 1-VR=0.7287 y un EE_{VC}=1.1721, respectivamente. En el caso de la FAD, el mejor comportamiento fue una combinación de derivada de orden 1 y SNV (1,10,15+SNV) que mostraron un 1-VR=0.7649 y un EE_{VC}=1.1119.

Por tanto, la tecnología NIRs podría ser usada para predecir el contenido de PB, FND y FAD, pero es necesario seguir trabajando y mejorar la calibración para el resto de parámetros.

Simultáneamente, se realizó un estudio cualitativo NIRs con el objetivo de agrupar los forrajes según densidades de siembra, fechas de corte (periodo vegetativo) y dosis de abonado nitrogenad0. Para ello también se estudió, el efecto del pretratamiento espectral utilizado y diferentes análisis quimiométricos discriminantes (componentes principales, análisis de conglomerado con varios métodos de agrupación y medida de distancia euclidea al cuadrado, análisis SIMCA y PLS-DA). Los resultados revelaron que no se pudo agrupar el triticale en función de su densidad de siembra ni dosis de abonado nitrogenado. Sin embargo, la información espectral es adecuada para agrupar el triticale según su fecha de corte, y por lo tanto, según el periodo vegetativo en el que se encuentre el cultivo, siendo el método SIMCA y el PLS-DA los que mejores resultados ofrecen, y dependiendo del corte del que se trate, mejora o no con los pretratamientos MSC o EMSC.

Por lo tanto se puede concluir que el análisis NIRs es una herramienta adecuada para establecer la calidad del forraje de triticale, que sembrado en la dehesa podría cubrir las deficiencias de pastos en las explotaciones agroganaderas de Extremadura.

2. Revisión bibliográfica

2.1. El Triticale

2.1.1. Historia y Origen

En 1875, un científico apellidado Wilson informó a la Sociedad Británica de Edimburgo acerca de una planta estéril resultante del cruzamiento de trigo x centeno (Guerrero, 1999).

En 1888 el alemán Rimpau, en una población de cruzamientos de trigo x centeno, encontró una espiga que tenía 15 granos, 12 de los cuales produjeron plantas fértiles y dichas semillas se multiplicaron de generación en generación, con perfecta fidelidad genética: éstos fueron los primeros triticales verdaderos (Guerrero, 1999).

En la historia del triticale han ocurrido dos fenómenos casuales que han tenido consecuencias extraordinarias para el desarrollo de esta especie. El primero de ellos tuvo lugar en la Estación Experimental Agrícola de Saratov, en Rusia. Los mejoradores de la misma utilizaban centeno para separar las parcelas experimentales de trigo de invierno y así impedir que se cruzaran entre ellas. En 1918, al sembrar la semilla recogida de dichos trigos, observaron que aparecían miles de plantas híbridas, que eran el producto de fecundaciones espontáneas del trigo con polen del centeno. Todas ellas eran plantas androestériles incapaces de autofecundarse, pero por retrocruzamientos espontáneos con trigo y centeno se crearon miles de semillas fértiles (Royo, 1992).

Sin embargo, hasta 1930 el triticale sólo constituyó una curiosidad biológica, pues su apariencia deficiente y su baja fertilidad disminuyeron el interés de los fitomejoradores en lo que concernía a su potencial como cultivo alimenticio (Royo, 1992).

El segundo hecho relevante sucedió en 1937, cuando se descubrió en Francia que un alcaloide denominado colchicina, podía inducir la duplicación del número de cromosomas existentes en los núcleos de las células de las plantas, con lo que se podía producir cruzamientos de trigo x centeno en la seguridad de que el producto llamado triticale, podría ser una planta fértil en lugar de infértil (Guerrero, 1999).

Esta técnica, junto con la del cultivo de embriones, desarrollado en 1940, ayudó a los mejoradores a obtener un gran número de triticales hexaploides y octoploides, cruzando el centeno con trigos duros y harineros respectivamente, con un aceptable grado de fertilidad. De esta manera se pasó de una curiosidad científica y botánica a un cultivo comercial en las últimas décadas.

Después de realizarse gran cantidad de estudios y ensayos, los resultados que se obtuvieron anticipaban el fracaso en la obtención de una variedad de triticale que pudiese ser realmente un cereal comercial. Sin embargo, en el año 1967 se produjo el avance más importante en la mejora del triticale y tuvo lugar en las parcelas del Centro Internacional para la Mejora de Maíces y Trigo (CIMMYT) cuando una planta de triticale fue fecundada de forma

espontánea por polen de trigo enano de una parcela cercana. Dos generaciones después, los mejoradores observaron en el campo varias plantas con un aspecto extraordinario. El trigo le dio las características como enanismo, insensibilidad parcial al fotoperiodo, mayor peso específico en el grano, precocidad a maduración, buena calidad nutritiva y superó la barrera de esterilidad. Al resultado de dicho cruce se le denominó línea Armadillo, descubriéndose que el cromosoma 2D del trigo enano había sustituido al cromosoma 2R del centeno en el cual están los genes de sensibilidad al fotoperiodo de los triticales. Además, las características favorables conseguidas resultaron ser de carácter hereditario y fueron aprovechadas por los mejoradores del CIMMYT que las incorporaron en la genealogía de la mayoría de los triticales producidos a partir de 1970.

Hasta finales de los años 70 sólo eran recomendables para el cultivo dos o tres variedades de triticale de primavera, debido a caracteres indeseables, tales como son la esterilidad, el bajo rendimiento, el encamado, etc. A partir de 1978 se realizó un gran esfuerzo por parte de los investigadores de diferentes países, en la genética y mejora del triticale, que dieron como resultado la obtención de líneas con un excelente comportamiento, en rendimiento, caracteres agronómicos y calidad, dando lugar a la aparición de centenares de variedades. El objetivo era aunar las buenas características del trigo (alta producción, alto índice de cosecha y gran número de granos por espiga) con las del centeno (rendimientos estables, rusticidad, gran cantidad de biomasa, resistencia a frío y sequía, adaptación a suelos ácidos, mayor contenido en lisina del grano y resistencia a enfermedades) (Llera, 2002).

En los años 80 continúan los trabajos sobre el triticale y el Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA) obtiene las variedades "Tajuña" y "Camarma". Con el desarrollo del mapa autonómico español, se diversifican los trabajos y se obtienen las variedades "Trujillo", "Montánchez" y "Tentudía", de manifiesta nomenclatura extremeña. Destaca el trabajo realizado por el equipo de cereales del Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico (SIDT) de la Junta de Extremadura, que dirigido por Jaime Montero de Espinosa, han dado como resultado la Inscripción en el registro de variedades del Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero (INSPV) de diversos triticales (Llera, 2002).

Recientemente el equipo de mejora de cereales del Centro de Investigación Finca "La Orden-Valdesequera", ha registrado dos variedades denominadas Montijano (ciclo medio-corto) y Verato (ciclo medio-largo), que como es lógico deducir se encuentran adaptadas a las condiciones agroclimáticas de la región extremeña (Gil *et al*., 2009).

2.1.2. Clasificación

El triticale se puede clasificar según el tipo de cruzamiento por el cual ha sido obtenido, según el número de cromosomas que posee y una última clasificación es por la presencia o no de la dotación cromosómica del centeno de manera completa (Royo, 1992).

Según el tipo de cruzamientos los podemos clasificar en (Llera, 2002):

- Primarios: fruto del cruzamiento simple entre el trigo y el centeno.
- Secundarios: son los obtenidos por el cruzamiento entre triticales primarios o de éstos con el trigo. Este tipo de triticale puede ser:

    - Completos: cuando tienen la totalidad de cromosomas de sus progenitores, centeno y trigo. Estos triticales se parecen más, morfológicamente, al centeno.
    - Sustituidos: cuando algunos cromosomas del centeno han sido reemplazados por los cromosomas del trigo. Estos triticales se parecen más al trigo.

Si se clasifica en función del número de cromosomas se establecen los siguientes tipos: un primer tipo son los triticales hexaploides que son los triticales obtenidos a partir del cruzamiento entre el trigo duro y el centeno. Como resultado da un grano que casi nunca llega a germinar normalmente, porque el embrión suele abortar. Mediante cultivo de embriones se puede obtener una planta fértil. Un segundo tipo son los triticales octoploides, los cuales parten del trigo harinero, que es una especie hexaploide, y el centeno que es diploide, no siendo necesaria la técnica de cultivo de embriones en este segundo tipo de triticale (Royo, 1992).

Dependiendo de si la variedad de triticale pertenece al grupo de los triticales completos o a los triticales sustituidos poseerá unas características u otras. En la tabla 1 se recogen las características (positivas y negativas) que presentan cada uno de ellos (Royo, 1992).

Tabla 1. Resumen de las principales diferencias entre triticales completos y triticales sustituidos

Características	T. Completos	T. Sustituidos
Altura de la planta	+	-
Sensibilidad al fotoperiodo	+	-
Precocidad a la maduración	-	+
Resistencia a las enfermedades	+	-
Productividad	+	-
Adaptación a ambientes marginales	+	-
Calidad harino-panadera	-	+

Los triticales completos son mejores para la doble aptitud (forraje y grano) que los sustituidos. Por otra parte, los triticales completos también se adaptan mejor a suelos ácidos, mientras que los sustituidos prefieren suelos básicos (Llera, 2002).

2.1.3. Situación actual del cultivo de triticale

2.1.3.1. Situación mundial

El triticale es un cereal que con el paso de los años y gracias a los avances en mejora genética ha logrado ganar interés a nivel mundial. Esto se ve reflejado en la figura 1 en la cual se observa la evolución de la superficie cultivada de este cereal en el mundo.

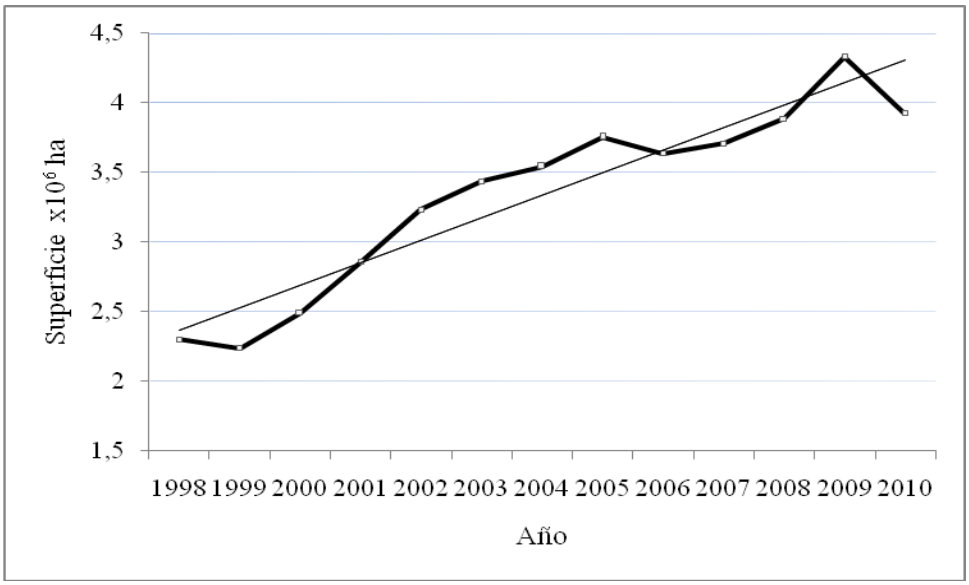


Figura 1. Superficie mundial cultivada de triticale (FAOSTAT)

La superficie cosechada a nivel mundial de triticale ha ido en constante aumento desde 1998 hasta el año 2009, año en el que se alcanza el valor máximo cuando se sembraron alrededor de 4.332.400 ha.

Igual que ocurre con los datos referentes a la superficie cultivada la producción mundial ha seguido un recorrido ascendente con algunas excepciones como son los años 2003 y 2006 (figura 2). En estas dos campañas los valores correspondientes sufren un descenso, siendo en el año 2006 más acusado, situándose en valores correspondientes a la campaña 2003, debido a las condiciones climáticas.

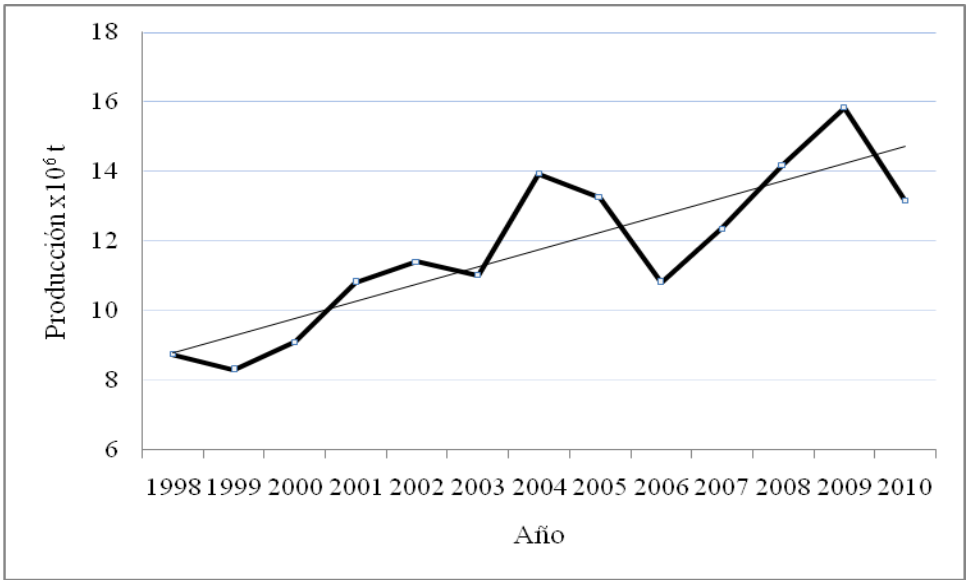


Figura 2. Producción mundial de triticale (FAOSTAT)

La producción durante el año 2004 aumenta considerablemente (figura 2), estando relacionado con el aumento de la superficie cultivada (figura 1) y a consecuencia de unas condiciones climatológicas óptimas para el cultivo, provocando el mayor aumento del rendimiento de la serie estudiada (figura 3). En 2005 y 2006 se observa una disminución de la producción (figura 2) debido principalmente a la caída de los rendimientos (figura 3).

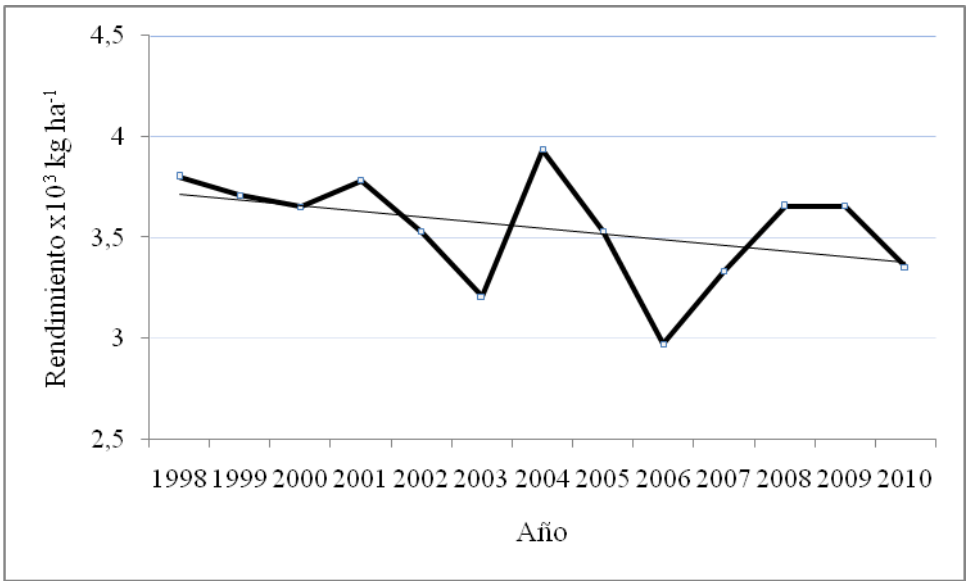


Figura 3. Rendimiento mundial de triticale (FAOSTAT)

El rendimiento medio del triticale (kg ha^{-1}) a nivel mundial durante el período estudiado ha oscilado entre 3000 – 4000 kg ha^{-1}.

El máximo rendimiento del triticale se obtuvo durante la campaña 2004 con 3935 kg ha^{-1}. En los últimos años, el rendimiento sigue una tendencia decreciente, a pesar de que la

superficie de cultivo sigue aumentando. Esto puede deberse a que los agricultores consideran al triticale como un cultivo muy rústico y su fertilización es deficiente.

2.1.3.2. Situación europea

Se observa que la evolución de la producción en Europa está relacionada directamente con los datos referentes a la superficie cultivada (figura 4 y 5). La producción (figura 5) muestra una tendencia similar a la descrita para la situación mundial (figura 2). Los rendimientos siguen también una tendencia decreciente (figura 6).

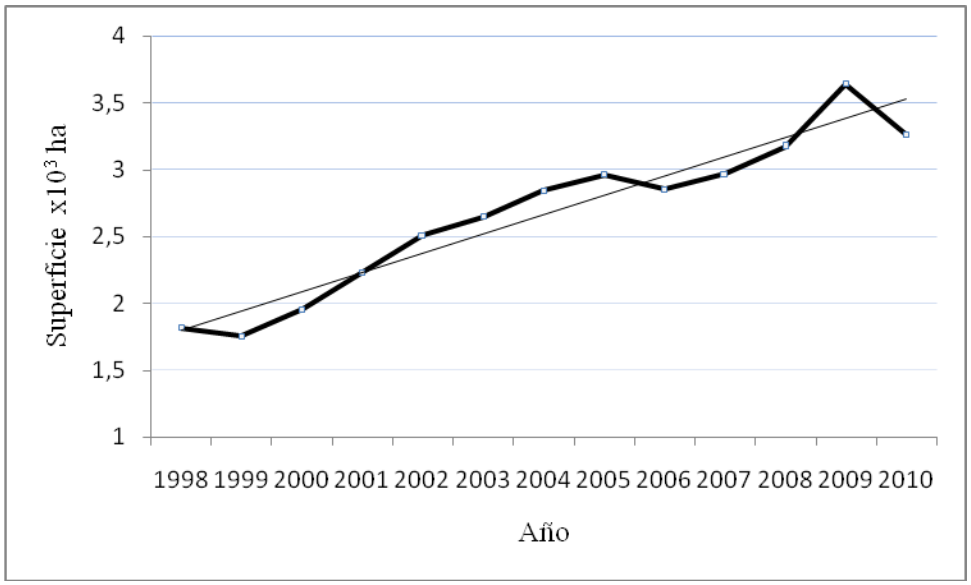


Figura 4. Superficie europea cultivada de triticale (FAOSTAT)

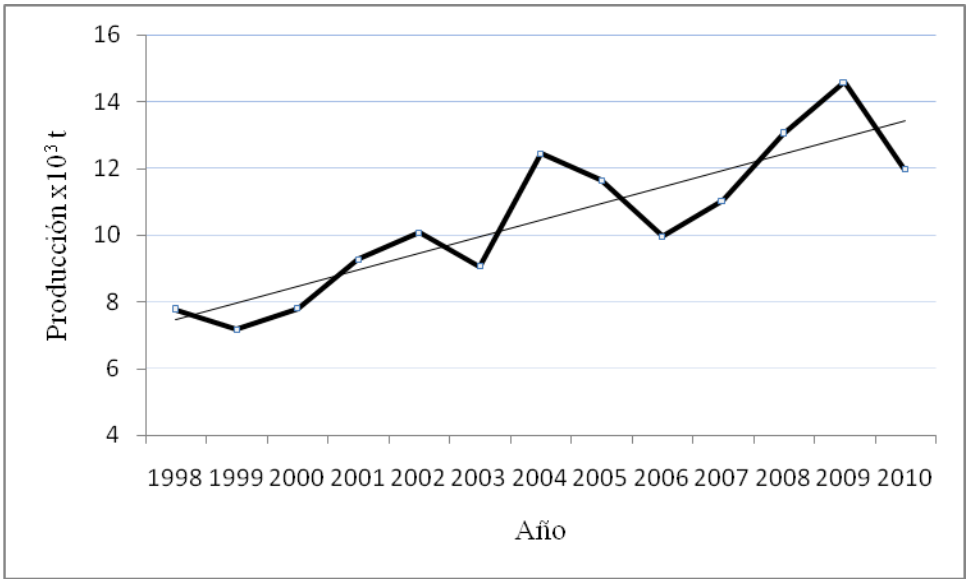


Figura 5. Producción de triticale en Europa (FAOSTAT)

Aunque los datos muestran, como norma general, un crecimiento progresivo de la superficie cultivada y de la producción, se observa que en los años 2005 y 2006 las producciones disminuyeron, saliéndose de la tendencia general. Esto puede deberse a condiciones climáticas desfavorables que originaron una disminución del rendimiento (figura 6) Desde 2006 a 2009 la tendencia ha sido creciente en superficie y producción, aunque no siempre en los rendimientos (figura 6).

En el año 2009 se observa el máximo de producción (figura 5), coincidiendo con el año en el que se cultivó la mayor superficie (figura 4). Este aumento en la superficie cultivada puede deberse al cambio producido en las ayudas a la agricultura hacia el Pago Único (Política Agraria Comunitaria), proporcionando libertad de cultivo a los agricultores, de tal modo que las ayudas percibidas no influyeron en las decisiones sobre qué cultivo sembrar.

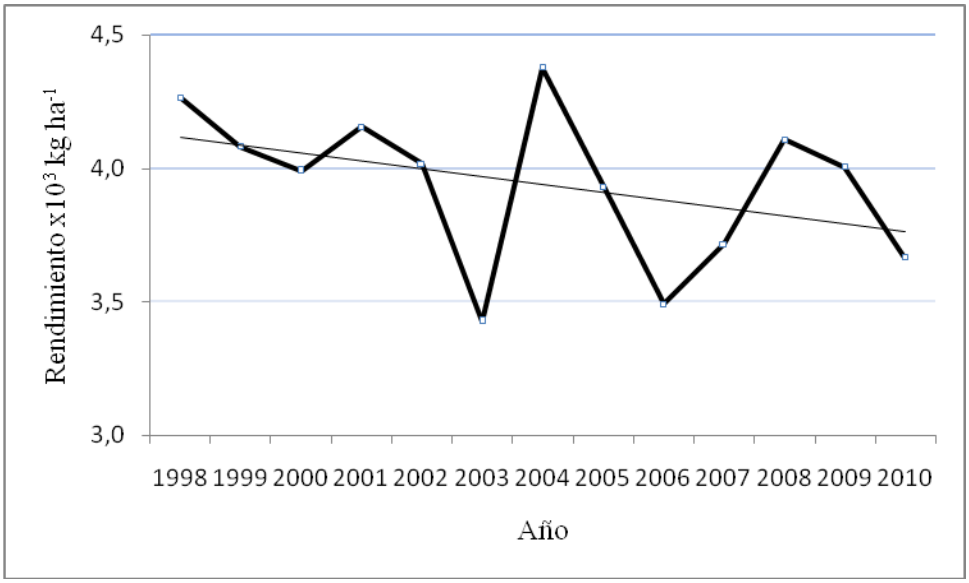


Figura 6. Rendimiento Unión Europea de triticale (FAOSTAT)

2.1.3.3. Situación en España

El triticale en España alcanzó su mayor superficie en 1989 llegando a las 75.000 ha y casi 200.000 toneladas producidas (MAPA, 1990). A partir de ese momento se produjo un declive de su superficie al ser desplazado por cultivos como el trigo duro con una subvención de la Unión Europea más atractiva para el agricultor. Así, la menor superficie se produjo en 2004 con 24.700 ha y a partir de ese momento, se ha producido una recuperación significativa hasta las 64.000 ha sembradas en 2010 (figura 7).

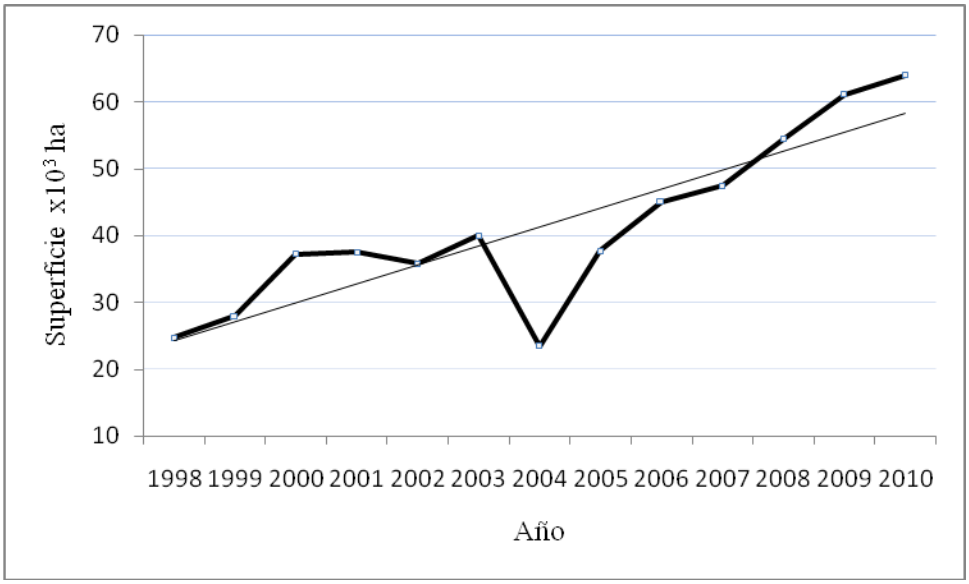


Figura 7. Superficie cultivada de triticale en España (FAOSTAT)

El aumento de superficie a partir del año 2005 coincide con el desacoplamiento parcial en España de las ayudas de la Política Agraria Común (PAC) que ha motivado una disminución de la superficie dedicada al trigo duro principalmente en la zona Sur, siendo sustituido por otros cereales como el triticale.

Respecto a la producción de triticale en España, entre los años 1998-2008 se han producido altibajos (figura 8), con intervalos de años donde se estabiliza la producción para dar paso a un descenso brusco en el año 2004 propiciado por el descenso de la superficie destinada al cultivo del triticale y la disminución del rendimiento (figura 7 y 9).

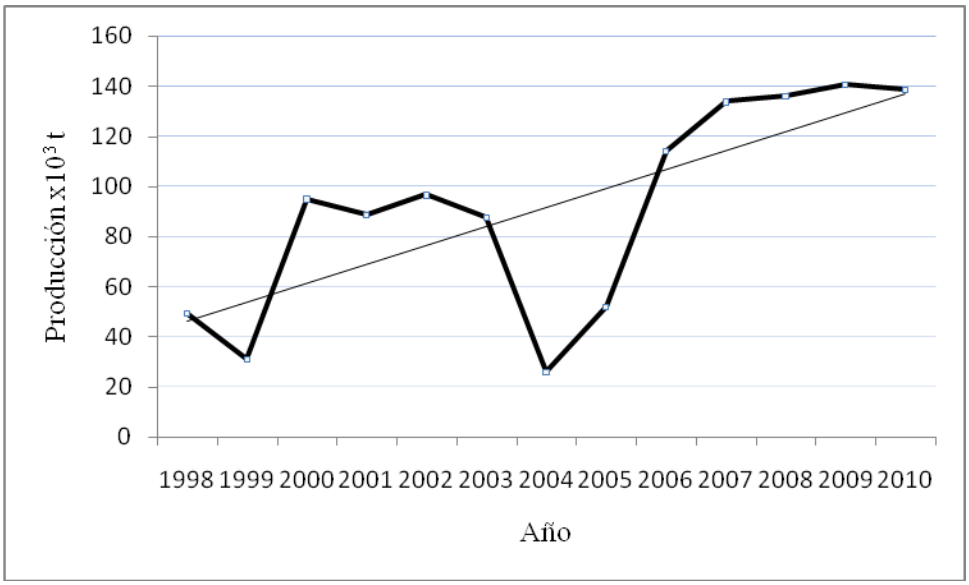


Figura 8. Producción de triticale en España (FAOSTAT)

A partir del año 2005 se ve un claro incremento de la producción en toda España, probablemente provocado por los cambios en la Política Agraria Común (PAC) que ha dejado de subvencionar el trigo duro en favor de otros cereales. Durante el año 2010, también se han producido cambios en la PAC que pueden favorecer el cultivo del triticale debido al desacoplamiento de las ayudas.

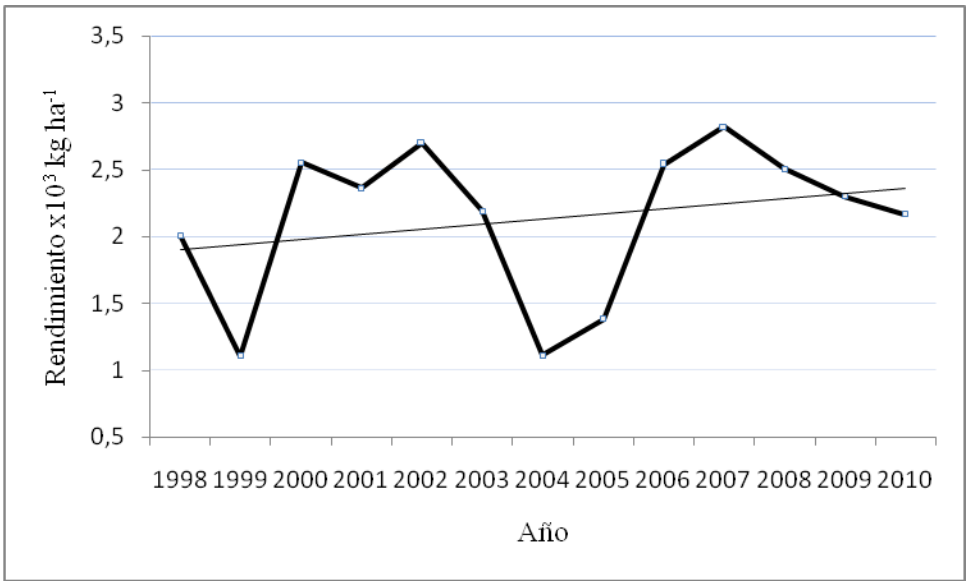


Figura 9. Rendimiento de triticale en España (FAOSTAT)

El rendimiento del triticale en España ha sido bastante irregular en los últimos años (figura 9) oscilando entre los 1000 kg ha^{-1} y los 3000 kg ha^{-1}. Estas variaciones pueden deberse a la utilización de diferentes variedades o a las condiciones climatológicas de la campaña (pluviometría anual). Debido al clima, los rendimientos españoles son inferiores a los obtenidos a nivel mundial y europeo.

2.1.3.4. Situación en Extremadura

Extremadura es la segunda comunidad de España en cuanto a superficie cultivada de triticale, detrás de Andalucía. Resulta interesante observar el aumento progresivo y significativo de superficie desde el año 1998, aunque en el año 2007 se produjera un descenso (figura 10).

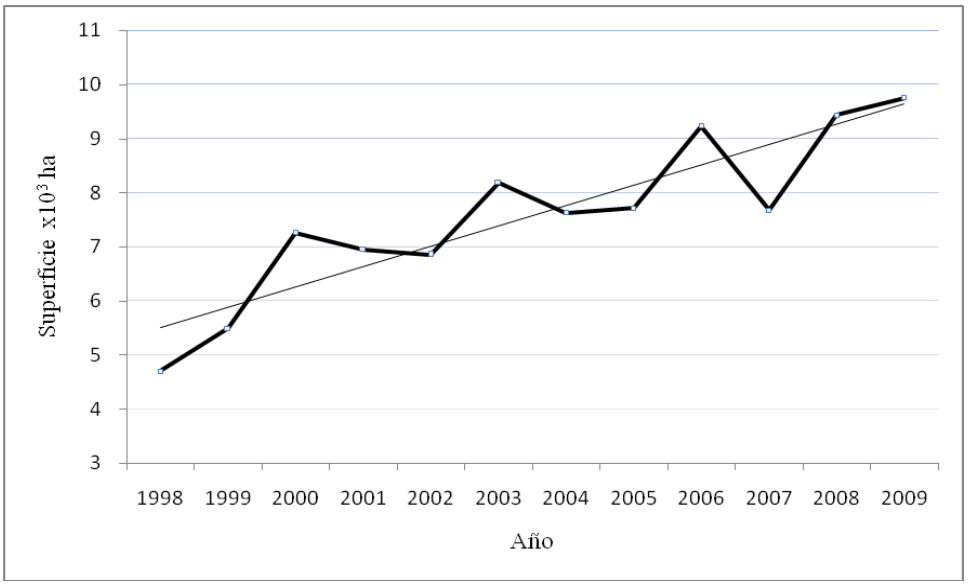


Figura 10. Superficie cultivada de triticale en Extremadura (MARMA)

Igual que ocurre con la superficie cultivada, la producción de triticale sigue una tendencia ligeramente al alza desde el año 1999, con dos descensos significativos en el año 2005 y 2009 (figura 11) que coinciden con la disminución del rendimiento (figura 12).

Figua 11. Producción de triticale en Extremadura (MARMA)

En Extremadura, el triticale se cultiva, en su mayoría, en explotaciones grandes de secano y se utiliza como pienso para el ganado, por lo que las estadísticas no suelen reflejar las verdaderas producciones y rendimientos. El rendimiento tiene una tendencia lineal con dos descensos acusados en los años 2005 y 2009 (figura 12).

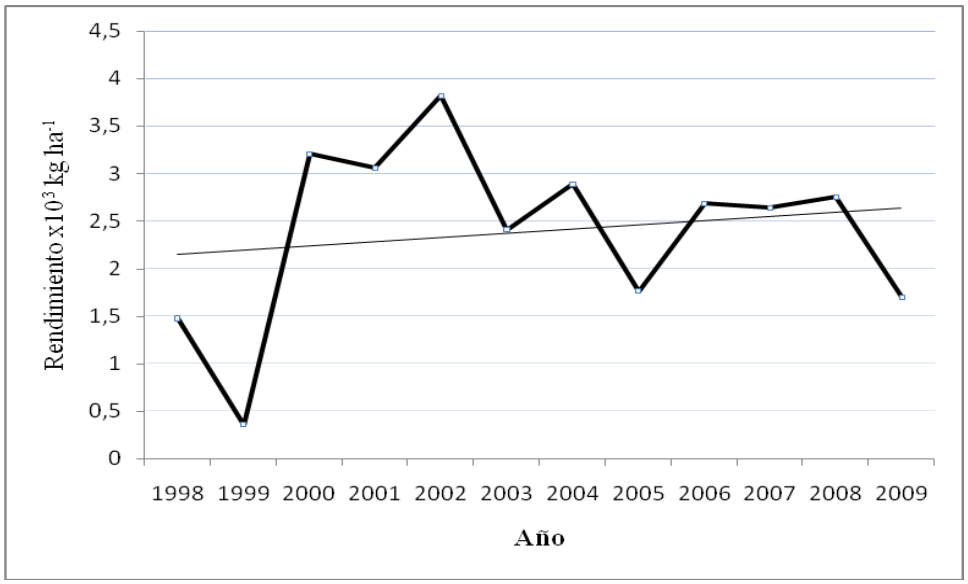


Figura 12. Rendimiento de triticale en Extremadura (MARMA)

2.1.4. La dehesa

Gonzalo *et al*. (2012) definen la dehesa como un ecosistema pastoral-silvo-agrario donde conviven, en un ambiente semiárido mediterráneo, especies herbáceas, arbustivas y arbóreas, pudiendo estar limitada la presencia de las arbustivas, que contribuyen a la alimentación de animales domésticos (ovino, vacuno, porcino, etc.) y silvestres (ciervo, jabalí, perdiz, conejo, etc.) en régimen extensivo , con respeto al medioambiente (sistemas sostenibles), suelo de textura variable (arenosa-franca), pH ácido y fertilidad limitada.

Este ecosistema, con casi 4 millones de hectáreas de extensión, ocupa gran parte de la mitad occidental peninsular, desde Salamanca al norte hasta Huelva al sur, incluyendo el Algarve y el Alentejo en Portugal donde recibe el nombre de "*montado*" (Santamaría *et al*., 2009). En Extremadura, los sistemas adehesados corresponden en su mayoría a dehesas de encinas, aunque también existen de alcornoques o mixtas entre ambas especies, ocupando un área aproximada del 51% de la superficie agraria útil extremeña (Parra, 1988); 45% en Badajoz y 50% en Cáceres según Pulido (2002), con un total aproximado de 1.32 millones de hectáreas aproximadamente (Santamaría *et al*., 2009; Gonzalo *et al*., 2012).

Kubiena (1953) y Olea *et al*. (1987, 1989) señalan que los suelos de dehesa pueden considerarse como suelos de tierras pardas meridionales, poco profundos, fácilmente erosionables y pobres en nutrientes (especialmente fósforo y nitrógeno).

Pese a su carácter extremo (veranos secos y calurosos e inviernos fríos y húmedos), propios de un clima mediterráneo semiárido (Olea *et al*., 1989), el elevado grado de rusticidad de las especies que se asientan en este ecosistema permite una buena adaptación a estas condiciones. Aún así, como indican Olea *et al*. (1987), las variaciones de temperaturas y sobre

todo de pluviometría a lo largo del año, factores climáticos condicionantes de la dehesa, provocan una escasez de alimentos que necesitan ser suplementados en las explotaciones ganaderas.

2.1.4.1. El triticale en la dehesa

Los pastos herbáceos son el componente principal y fundamental de la dehesa. Florísticamente son muy variados, abundando especies herbáceas anuales y con reducida presencia de perennes (Olea *et al.,* 1989). Puede apreciarse un máximo relativo de producción en otoño, tras las primeras lluvias, aunque en el caso de otoños secos, también éste puede convertirse en un periodo crítico para la producción de pastos; por supuesto, el máximo está en primavera, cuando confluyen las mejores condiciones climáticas para el desarrollo herbáceo (Buyolo y Escudero, 2002; Almogera, 2007; Viguera *et al*., 2007).

Tradicionalmente, la gestión ganadera de la dehesa ha consistido en adecuar el número de animales presentes en la explotación a los niveles medios de producción de pastos, aunque recurriendo a la trashumancia para paliar los desequilibrios estivales en la producción de pastos (Escribano y Pulido, 1998; Escribano *et al*., 2001). Morley (1975) incide en relacionar la capacidad de carga de un área de pastoreo con su capacidad de mantenimiento en momentos de escasez.

La práctica desaparición de la trashumancia y la intensificación de las explotaciones han provocado que el sistema de dehesa no pueda cubrir con recursos propios más de un 56% de las necesidades de la ganadería domestica (Pulido y Escribano, 1994), condicionando los sistemas productivos, la adecuación y el grado de dependencia de la ganadería hacia los recursos del medio externo. Las tremendas fluctuaciones que el precio de los cereales y, por consiguiente, el de los piensos (con incrementos hasta el 40 % en algunos casos), han sufrido en los últimos años, hace que la dependencia de recursos externos al sistema suponga un verdadero riesgo para la rentabilidad de las explotaciones ganaderas asentadas en este entorno (Gil *et al*., 2009; Pinheiro *et al*., 2009).

Una alternativa a la utilización de estos recursos puede ser la introducción de cultivos forrajeros para aprovechamiento a diente mediante pastoreo o bien procediendo a la conservación de la biomasa producida mediante ensilado o henificado, de manera que pueda conservarse para su posterior utilización en épocas en las que la producción de pastos naturales no cubra las necesidades de la explotación tal y como ya indicaran autores como Delogu *et al*. (2002), Francia *et al*. (2006) y Gil *et al*. (2009).

En este contexto resulta imprescindible tender hacia soluciones con menores requerimientos de agua, como pueden ser ciclos más cortos, especies más rústicas o cultivos forrajeros, que al finalizar antes su ciclo de cultivo o tener menores necesidades, se verán menos

afectados por el incremento de la temperatura y la disminución de la pluviometría primaveral, siendo esto especialmente necesario en los suelos sueltos de poca profundidad, cuya capacidad de retención de agua es menor. En este sentido, el interés que ofrece el triticale, tanto el forrajero como el de doble aptitud, para la dehesa es indudable (Gil *et al.*, 2009). Cruz *et al*. (2011) indican que el triticale de doble aptitud permite uno o dos aprovechamientos en invierno y luego se puede volver a aprovechar en verano, al final del ciclo, al ser capaz de proporcionar una producción de grano y paja (figura 13).

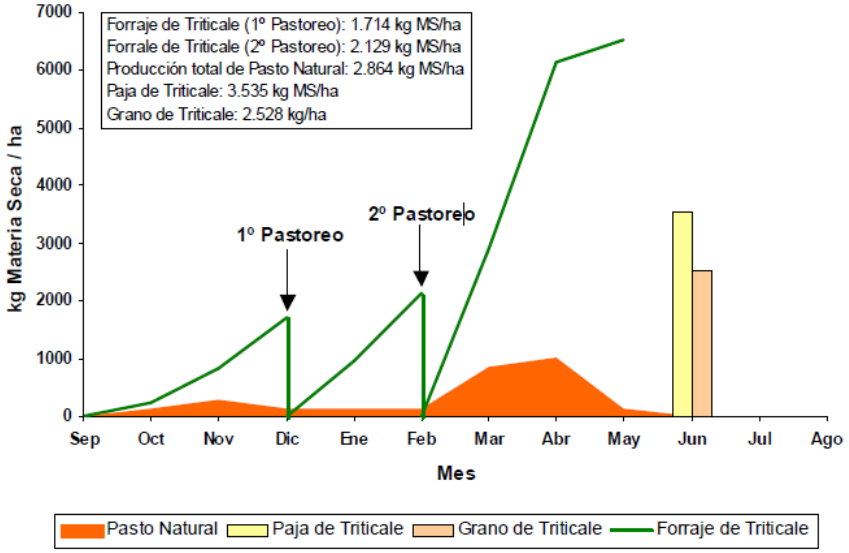


Figura 13. Curva de producción de materia seca de los pastos naturales y del triticale de doble aptitud de un año climatológicamente bueno. Fincas "La Orden" y "Valdesequera" (Cruz *et al.*, 2011)

Por todo ello, como señalan Llera *et al.* (1997), la utilización simultanea del triticale para forraje y grano tiene gran interés en zonas de dehesa.

Este modelo de aprovechamiento, encaja a la perfección con la curva de producción de los pastos de secano, pues viene a complementar a los dos periodos de escasez de alimentos que se producen tanto en pleno invierno, donde las bajas temperaturas paralizan el crecimiento de la hierba, como durante la época estival donde las altas temperaturas agostan los pastos (Gil *et al*., 2011).

2.1.5. Utilización y aprovechamiento del triticale

La utilización del triticale es diversa, pudiendo destinarse tanto a alimentación humana como animal e incluso industrial. En alimentación animal puede ser usado en forma de grano o en forma de forraje, o incluso en un uso mixto de forraje – grano (Royo, 1992). Debido a esto es un cereal idóneo para utilizarlo en la producción animal, gracias a las dos posibilidades que nos aporta (forraje y grano).

2.1.5.1. Utilización del grano de triticale

El grano se utiliza para la alimentación de animales monogástricos y de animales poligástricos.

Es un alimento excelente tanto para lechones como para cerdos de engorde y ha proporcionado la posibilidad de sustituir total o parcialmente el suplemento proteico debido a que algunas variedades de triticale tienen un contenido en aminoácidos muy importante (Polo, 2010). En estudios realizados por el Instituto Técnico de los Cereales y los Forrajes (ITCF) se ha visto que su utilización no ha creado ningún problema y en algunos casos ha permitido reducir en un 10 % el uso de soja debido a la riqueza en lisina del triticale (Royo, 1992).

En la alimentación avícola, el triticale puede ser empleado de forma parecida al trigo, pudiendo incluso sustituirlo (Polo, 2010). Además, si se emplea una fuente energética complementaria y un suplemento de soja da unos resultados similares a los de las dietas tradicionales con empleo de maíz (Royo, 1992).

En la alimentación de conejos los resultados son similares a los del uso de trigo cuando la cantidad del triticale representa un 45 % de la parte de la dieta destinada al cereal (Royo, 1992).

En animales poligástricos, el empleo del triticale es idéntico al del trigo. Aparentemente no hay límite para su empleo en raciones equilibradas. Además, el triticale es degradado de forma más rápida que el maíz o la cebada. Puede ser usado tanto en la alimentación de corderos, como en el ganado bovino, obteniéndose mejores resultados en terneros jóvenes y vacas lecheras jóvenes. También se utiliza como suplemento proteico parcial en los de engorde (Polo, 2010).

Respecto al consumo humano, el triticale se parece más al trigo que al centeno en cuanto a calidad panadera, sin embargo, los niveles cualitativos no alcanzan a los del trigo (Polo, 2010). A pesar de que la harina de triticale forma gluten, la cantidad del mismo es bastante inferior a la del trigo (por lo que da lugar a un pan de menor volumen) y su calidad es muchas veces inferior también. El color del grano, a menudo amarronado, confiere un color más oscuro a la harina (Royo, 1992).

2.1.5.2. Otros usos en la agricultura

Otro posible uso es el abonado en verde, como indican Ferro Palma y Llera (2011), los abonos verdes se utilizan para añadir nutrientes y materia orgánica al suelo. También sirven para mejorar la estabilidad y estructura del suelo, controlando el lavado de nutrientes, en especial el nitrógeno, su erosión, las malas hierbas y algunas plagas. El uso de gramíneas, como

el centeno, triticale, cebada y avena es menos frecuente en la región mediterránea, pero está muy recomendado en Norteamérica.

Se han demostrado las buenas cualidades del triticale para la producción de biocombustibles. Investigadores de la Universidad de Letonia llegaron a la conclusión de que el triticale y el trigo eran las materias primas más prometedoras para la producción de etanol en ese país. Además, investigadores en la universidad de Hohenheim concluyeron que en la producción de etanol por hectárea, el triticale era superior al trigo y al centeno (Sosulski, 2000).

2.1.5.3. El Triticale de doble aptitud

En la dehesa existen, a lo largo del año, periodos de escasez de alimentos para los animales. En el periodo invernal y estival, la producción de gramíneas y leguminosas se reduce, hasta el punto de no poder ofrecer alimento suficiente para el ganado. Una posible solución es la introducción de cereales de doble aptitud (forraje-grano) en la dehesa.

Los cereales de invierno están adquiriendo cada vez más importancia en los sistemas forrajeros de un gran número de regiones de todo el mundo (Caballero *et al*., 1995; Rebolé *et al*., 1996; Kraiem *et al*., 1997; Delogu *et al*., 2002; Francia *et al*., 2006; Hargreaves *et al*., 2009). Andueza (2000) indica que, entre sus características, destacan su elevado potencial productivo durante el invierno y su calidad nutritiva, que los convierte en forrajes adecuados para la cría de ganado. Las explotaciones extensivas (incluida la dehesa) están introduciendo en su sistema de producción la siembra de cereales de invierno para un doble uso: pastoreado o segado en invierno y segado para grano o conservar el forraje al final del ciclo (Bonachela *et al*., 1995; Delogu *et al*., 2002; Francia *et al*., 2006; Hargreaves *et al*., 2009). Gil *et al*. (2009) señalan que, en caso de necesidad y donde la pluviometría en primavera no sea un factor limitante, o bien cuando existe la posibilidad de dar un riego alternativo, pueden darse sucesivos aprovechamientos, hasta un máximo de dos para los triticales de primavera y facultativos y de tres para los intermedios y de invierno, si finalmente se pretende obtener una cosecha de grano.

Rebolé *et al*. (1996) y Delogu *et al*. (2002) indican que la cebada, avena y triticale son los cereales de invierno que suelen utilizarse en áreas de clima mediterráneo, ya que son los que mejor soportan las erráticas características de este clima. El triticale, incluso en terrenos marginales, es capaz de soportar un doble aprovechamiento, cosa que el trigo o la cebada no pueden (Santiveri *et al*., 2004). Royo *et al*. (1994) exponen que en ambientes sin déficit hídrico en los momentos críticos del cultivo, la biomasa cosechada en estado de grano lechoso o el grano cosechado en madurez, no ven reducido su rendimiento por un aprovechamiento previo en el invierno.

2.1.5.3.1. Manejo del triticale de doble aptitud

Según Muldoon (1985) esta habilidad para rebrotar tras el aprovechamiento se debe a que el meristemo basal de crecimiento es muy bajo, y por tanto, la capacidad de emitir un nuevo tallo es alta. Saroff *et al*. (2003), indican que también influye la gran capacidad de expansión foliar tras el pastoreo y el alto número de yemas que potencialmente pueden desarrollar macollos. No solo influye la especie, sino que la recuperación de la planta después de aprovechamientos invernales depende del genotipo, del momento fisiológico del aprovechamiento, del nivel de agua y nutrientes disponibles y de las condiciones ambientales (Marinetto, 1992; Llera *et al*., 1999; Delogu *et al*., 2002). Martínez-Ochoa *et al*. (1989) señalan que la obtención de forraje en los cereales afecta al rendimiento en grano de forma muy variable, ya que depende de condiciones ambientales, prácticas de cultivo, fertilidad del suelo y genotipo de la planta. Por lo tanto, para este doble uso, un manejo correcto del cultivo y su momento de corte, según Francia *et al*. (2006), afectará al rebrote del cultivo y por tanto, al rendimiento final del forraje así como a su composición nutritiva (Kozloski *et al*., 2005; Hargreaves *et al*., 2009). Es importante el momento en el que se realiza el pastoreo, ya que éste ha de hacerse cuando el cultivo se encuentra en el estado 30 de la escala de Zadoks *et al*. (1974) ya que aprovechamientos "a diente" en estadios posteriores pueden reducir considerablemente el rendimiento y la calidad de la cosecha final del grano (Royo *et al*., 1994; Llera, 1997; Llera *et al*., 1997), aunque el manejo afecta menos al triticale que a la cebada o a la avena (Muldoon, 1985).

Carnide *et al*. (1988) afirman que el aprovechamiento del forraje durante el ahijado puede no afectar a la producción de grano. Royo (1992) observó que, en condiciones favorables, cabe esperar un aumento de la producción de grano tras el pastoreo, mientras que Kilcher (1982) afirma que en condiciones más desfavorables es previsible una disminución importante del rendimiento del grano, disminución aun más fuerte si se aplican dos cortes en vez de uno (García del Moral *et al*., 1995). Lo que sí parece probado es que la siega no afecta al número de tallos productivos por hectárea, pero si al número de granos por espiga y al peso de los mismos (Muldoon, 1985). De la misma manera, se ha investigado que existe una compensación entre el número de espigas por metro cuadrado y el número de granos por espiga, manteniéndose el número de granos por metro cuadrado invariable (Santiveri *et al*., 2004).

Llera *et al.* (2011a) sugieren que para conseguir el éxito en el cultivo del triticale de doble aptitud, hay que tener en cuenta tres cuestiones:

- La *precocidad*, muy importante en los primeros estadios de su desarrollo, ya que cuanto antes se alcance el estado de ahijado, antes podrá ser aprovechado por el ganado y más tiempo tendrá para seguir creciendo y proporcionar una buena producción de grano. Por

ello, la siembra debe realizarse en el mes de octubre para que pueda ser aprovechado por el ganado en diciembre.

- El *ahijado*, ya que a mayor número de hijos mayor cantidad de biomasa va a proporcionar el cultivo. Llera *et al.* (2011b) han estudiado la tasa de ahijamiento (número de hijos que proporciona una planta) y del índice de supervivencia (hijos que dan lugar a espiga) del triticale de doble aptitud, y han establecido que entre estas dos variables existe una relación negativa, es decir, a medida que aumenta la tasa de ahijamiento disminuye el índice de supervivencia.
- La *capacidad de rebrote*, es decir, que el cultivo sea capaz de regenerar su parte aérea a partir del remanente que haya dejado el ganado tras el pastoreo.

El rebrote depende a su vez de tres factores fundamentales:

- La intensidad del pastoreo (carga ganadera y duración del pastoreo). El manejo del pastoreo y su impacto sobre la estructura y dinámica del cultivo es de vital importancia, ya que el aprovechamiento forrajero debe hacerse sin que se eliminen los ápices reproductivos de la planta, que permitirán el rebrote y finalmente, el espigado de los hijos.
- El momento del aprovechamiento. El momento más adecuado es al final del ahijado, ya que los puntos de crecimiento (que darán lugar a las espigas) se encuentran por debajo del nivel del suelo, en el nudo de ahijamiento, y por tanto, no existe peligro de que puedan ser eliminados por el pastoreo. También, en este momento, es cuando se obtiene la mayor cantidad de forraje con una buena calidad. Si se retrasase el aprovechamiento (a partir del encañado), los entrenudos del tallo comenzarían a alargarse empujando la espiga hacia arriba, provocando por tanto, la eliminación de estos ápices reproductivos y se comprometería seriamente la cosecha de grano (Royo, 1992), reduciéndose la calidad al disminuir el contenido de proteína.
- La fertilización nitrogenada tras cada pastoreo es fundamental para que se produzca un buen rebrote y se logre una rápida regeneración de la parte aérea de la planta. Llera *et al*. (1997), Llera (2002) y Gil *et al*. (2009) han determinado las exportaciones de nitrógeno que realiza el cultivo cuando es pastoreado por el ganado durante el ahijado, estableciéndose una cantidad de nitrógeno a aportar al cultivo en torno a 40-50 kg ha^{-1}. En estudios posteriores, Llera y Cruz (2012) han establecido que la cantidad de nitrógeno a aplicar después del pastoreo es de 55 kg ha^{-1}.

De los distintos tipos de triticales, primavera, facultativos, intermedios e invernales (Ye *et al.*, 2001), son los facultativos e intermedios los que mejor se adaptan a la doble aptitud ya

que poseen mayor capacidad de ahijamiento y rebrote que los primaverales y alcanzan producciones de forraje mayores en las primeras fases del desarrollo que los invernales. En el Programa de Selección de Triticales del Centro de Investigación Agraria Finca "La Orden-Valdesequera" se han obtenido dos variedades con este fin: Verato de tipo intermedio (ciclo medio-largo) y Montijano tipo facultativo (ciclo medio-corto). Estas variedades son idóneas para utilizarlas en pastoreo directo y dejarlas que sigan su ciclo hasta el final, ya que son capaces de proporcionar una buena cosecha de grano.

2.2. Calidad del triticale

Un aspecto muy importante de la producción de los cereales en la dehesa es su calidad o valor nutritivo, ya que de éste dependerá en gran parte el comportamiento productivo de los animales. Éstos requieren de una dieta compuesta por seis elementos básicos para crecer: fibra, energía, proteína, minerales, vitaminas y agua.

El conocimiento de la calidad de los forrajes, de forma rápida y fiable, es de particular relevancia en zonas ganaderas donde las praderas son la principal fuente de alimento para el ganado (Alomar y Fuchslocher, 1998). Esto es esencial no sólo por la salud animal, también desde un punto de vista económico, donde el coste de la alimentación es simplemente el más importante de los costes en un sistema productivo, ya que determina el esperado retorno financiero para el agricultor (Givens *et al*., 1997).

Osborne *et al*. (1993), señalan que diversas y modernas técnicas instrumentales basadas en la medida de propiedades físicas de una muestra, han sido desarrolladas en respuesta a la necesidad de métodos analíticos alternativos a las técnicas tradicionales, en donde la tecnología NIRs ha sido una de las más exitosas, la que combina rapidez, precisión y simplicidad experimental. Poblaciones *et al*. (2008) desarrollan ecuaciones de calibración mediante Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRs) (1100-2500 nm), para el análisis de la humedad, proteína bruta (PB), digestibilidad, fibra ácido detergente (FAD), fibra neutro detergente (FND) y lignina ácido detergente (LAD) en gramíneas como *Dactylis glomerata* L, *Festuca arundinacea Schreb*, *Lolium perenne* L. y *Phalaris aquatica* L., obteniendo buenos resultados.

El contenido de carbohidratos (solubles y estructurales) y los compuestos nitrogenados constituyen indicadores bioquímicos que reflejan el grado de actividad metabólica y la calidad de los pastos (Lemaire, 1995 y Del Pozo, 1998).

2.2.1. Calidad del grano de triticale

El valor nutritivo del grano de los cereales se mide por el porcentaje de proteína y la calidad biológica de la misma, a mayores valores mayor calidad.

La Fundación Española para el Desarrollo de la Alimentación Animal (FEDNA, 2004) indica que el contenido proteico del grano ha disminuido a valores próximos al 12%, debido a que se cultiva en áreas marginales. Llera (1997) ha trabajado con triticales con hasta 14.85% de proteína en grano (tabla 2).

El grano de triticale tiene actualmente un valor nutritivo intermedio entre el de centeno y el de trigo, pero más próximo a éste último, especialmente cuando se cultiva en zonas fértiles. El contenido proteico total del triticale es similar al del trigo que está próximo a 11.30%, y por tanto, superior al de otros granos de cereales. El contenido en aminoácidos esenciales parece estar más próxima al trigo que al centeno, por lo que la calidad proteica del triticale es superior a la media de los cereales de los que procede. En general, la concentración de lisina es aproximadamente un 30% superior a la del trigo. El contenido medio de almidón del grano es de un 56%, intermedio entre trigo y centeno, con un 23% de amilasa (FEDNA, 2004).

Como en el resto de cereales, su contenido en elementos minerales es bajo y es relativamente alto en fósforo, potasio, zinc y manganeso. La disponibilidad del fósforo es elevada (Royo, 1992).

El contenido de vitaminas del triticale es parecido al del trigo, excepto el de niacina que es la vitamina limitante en el caso del triticale (Royo, 1992).

2.2.2. Calidad del forraje de triticale

Rinehart (2008) apunta algunos principios de la alimentación de los rumiantes:

- Los rumiantes están adaptados para usar forraje debido a los microorganismos presentes en su rumen.
- Cantidades adecuadas de forraje verde pueden suplementar la mayoría, sino toda, la energía y proteína que los rumiantes necesitan.
- La composición nutricional del forraje cambia dependiendo de la madurez de la planta, especie, estación, humedad y sistema de pastoreo.
- La suplementación excesiva puede reducir la habilidad de los microbios del rumen para usar el forraje.

La preocupación nutricional para rumiantes se centra en la energía (carbohidratos), proteína, minerales, vitaminas y agua. La energía es responsable de las funciones de crecimiento y

mantenimiento del animal y de la generación de calor. La proteína hace crecer el tejido y realiza otras funciones vitales (Rinehart, 2008). Los microorganismos del rumen permiten a los rumiantes obtener energía de los carbohidratos fibrosos (celulosa y hemicelulosa) que están ligados a la lignina perteneciente a los forrajes. El rumen almacena temporalmente la fibra para que fermente la celulosa y la hemicelulosa, de hecho la presencia de fibra es necesaria para estimular la rumia.

El triticale, además de sus ventajas adaptativas, tiene una composición nutricional óptima en cuanto a vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales se refiere (Lorenz *et al*., 1974). Además, posee un alto contenido en almidón, lípidos, fibra y proteína comparado con el trigo (Dyson, 2006).

2.2.2.1. Proteína del forraje

La proteína es la estructura básica de los tejidos de los animales, es importante no sólo para el crecimiento y producción de leche sino también para el mantenimiento del animal (Hall *et al*., 2011). Un déficit implica una limitación a nivel de producción de los animales y una menor eficacia en la utilización de la ración (De la Roza y Martínez, 1994). Robinson *et al*. (1998) señalan que la proteína provee de aminoácidos esenciales tanto a los microbios del rumen como al animal. A mayor proteína proveniente del forraje se necesita menor cantidad de suplemento. Sin embargo, la mayoría de los nutricionistas consideran que el valor de energía e ingesta de forraje tiene una mayor importancia.

La proteína está íntimamente relacionada con la cantidad de nitrógeno en la planta (Robinson *et al*., 1998 y Langevele *et al*., 2008) y es el primer indicador de la calidad, encontrándose en mayor proporción en hojas, donde se realiza la fotosíntesis que provoca que sean órganos ricos en proteína y otras sustancias de elevado valor nutritivo, y pobres en paredes celulares (Andueza, 2000).

El contenido de proteína variará dependiendo de la fertilidad y la humedad del suelo, y otras condiciones de crecimiento (Royo, 1992). Fernández *et al*. (1991) estudiaron la influencia del número de aprovechamientos en la calidad nutritiva del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis)*, concluyendo que, a medida que aumenta el número de aprovechamientos disminuye la calidad del forraje, al disminuir la cantidad de PB y aumentar la FND, disminuyendo la digestibilidad. Chamorro *et al*. (2002) señalan que es preciso establecer con claridad tanto los niveles de fertilización como la edad del pasto, ya que afectan de forma clara a la concentración de proteína, digestibilidad de la pared celular, calidad y consumo de la materia seca del forraje. Collins *et al*. (1981) apuntan que el nitrógeno aumenta la cantidad y calidad de la materia seca del pasto como los carbohidratos no estructurales, fósforo, potasio y magnesio. Cuando se aplica nitrógeno a una pradera de gramínea, hay un incremento del porcentaje de

proteína. Wilman y Wright (1983) en un ensayo en Inglaterra, al pasar de cero a 100 Kg N ha^{-1}, en una media de 32 ensayos, se elevó en 0.16 unidades el porcentaje de proteína. Pasando de 100 a 200 kg N ha^{-1} el incremento fue de 0.24. Jung y Deetz, (1993) muestran que la concentración de FND y lignina aumenta mientras que la proteína disminuye en forrajes de edad avanzada. Del Pozo *et al*. (2002) en el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), comprobaron la influencia de la edad del rebrote y el nivel de nitrógeno en el contenido de proteínas (figura 14).

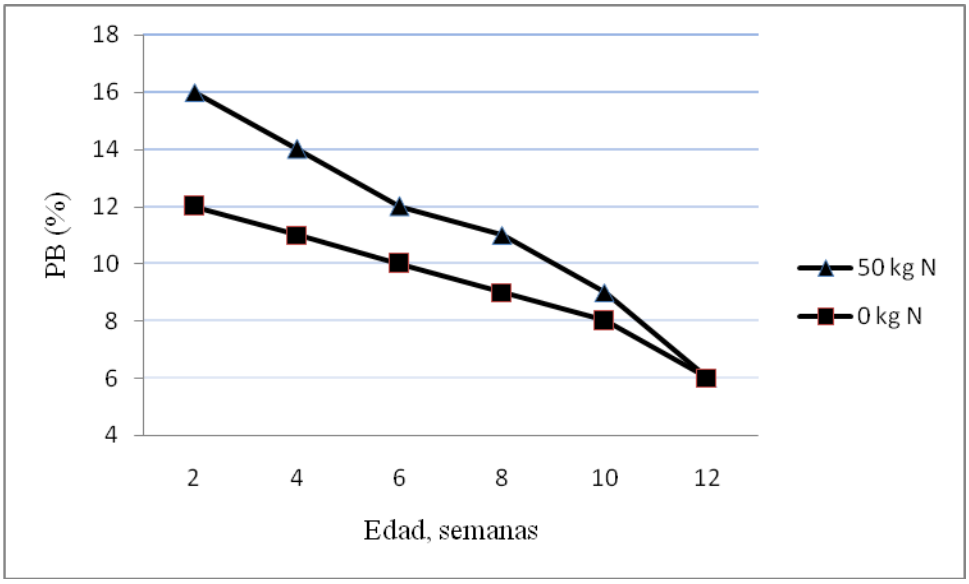


Figura 14. Cambios en el contenido de PB % con la edad del rebrote y el nivel de nitrógeno en *Cynodon nlemfuensis* (Del Pozo *et al*., 2002)

Si los intervalos de defoliación en la pradera de gramínea son largos, el mayor crecimiento vegetal provocado por la aplicación de nitrógeno hace que el porcentaje de proteína de la pradera disminuya: ley de dilución (Lemaire y Salette, 1984). A medida que aumenta la producción de materia seca, se produce un efecto de dilución de la proteína (disminuye) por un proceso de traslocación desde las partes vegetativas a las reproductivas (Marino *et al*., 2004). Existen evidencias de que las curvas de dilución de la proteína, permiten evaluar la calidad de los pastos (Juárez y Bolaños, 2007) ya que pueden seleccionarse nuevas líneas que maximicen el contenido en proteína, sin ver comprometida la producción de biomasa. Llera *et al*. (2012) han establecido las curvas de dilución del triticale cv. `Verato´ en función de la densidad de siembra, las dosis de abono nitrogenado y el número de aprovechamientos, concluyendo que la densidad de siembra no afectaba a la producción de biomasa ni a la concentración de proteínas en el forraje, al contrario que el número de aprovechamientos y la cantidad de nitrógeno aportado, que sí afectan significativamente, destacando una relación negativa entre el aumento de la biomasa producida y la concentración de proteínas en el forraje de triticale cv. `Verato´.

En la tabla 2 se muestra el contenido de proteína del forraje de diversas líneas de triticale, siendo el contenido medio del 23.29% de la materia seca (Llera, 1997).

Tabla 2. Proteína del forraje del triticale de doble aptitud en condiciones Mediterráneas (Llera, 1997)

Línea	MS Forraje (kg ha^{-1})	Contenido de proteína del forraje	Producción de grano (kg ha^{-1})	Contenido de proteína del grano (%)	Tipo
LO3Ex	1.904	23.60	5.227	10.85	D. Aptitud
LO11Ex	1.634	27.95	4.732	12.80	D. Aptitud
LO15Ex	1.832	22.50	4.706	13.70	D. Aptitud
LO30Ex	1.762	22.40	4.226	13.00	Forraje
LO33Ex	2.049	22.95	3.467	13.40	Forraje
LO46Ex	1.999	20.45	3.279	14.60	Forraje
LO50Ex	2.042	21.70	3.586	14.30	Forraje
LO59Ex	2.054	24.80	4.546	14.85	D. Aptitud

2.2.2.2. Fibra Bruta (FB), Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD) y Lignina Ácido Detergente (LAD)

En los años 60 se desarrolló la técnica de Tilley y Terry para medir la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de los forrajes, comenzando así el auge de la evaluación sistemática de la calidad de los recursos forrajeros. Posteriormente, Van Soest inventó una técnica para cuantificar la FND, FAD y LAD. Desde entonces estos parámetros, conjuntamente con la determinación de PB, constituyeron el pilar de la evaluación de recursos forrajeros en el mundo (Di Marco, 2011), aunque existen otros criterios para poder evaluar la calidad de los forrajes y cada laboratorio usa el que considera más conveniente.

En general, los constituyentes químicos de las plantas pueden ser divididos en componentes estructurales de la pared celular (lignina, hemicelulosa, celulosa y sílice) y el contenido celular soluble (azúcares, almidón, fructosanos, ácidos orgánicos y fracciones nitrogenadas) (Parsi *et al*., 2001). Los forrajes contienen un 25-60% de FB.

La FB es considerada como una mezcla de celulosa, hemicelulosa, pectinas, ß-glucanos, lignina y ácidos fenólicos, entre otros, y cuya función en la planta es estructural (celulosa, hemicelulosa, pectina…) y no estructural (polisacáridos…) y tiene un efecto importante sobre la digestibilidad de la biomasa (Buxton, 1996; Kozloski *et al*., 2005). En nutrición, el término fibra se refiere a los componentes nutricionales derivados de plantas que no pueden ser digeridos por los sistemas enzimáticos de los mamíferos (Moore y Hatfield, 1994), aunque sí por los enzimas de los microorganismos ruminales y del intestino grueso. La facilidad con la que los microorganismos del rumen degradan esa fibra depende de la distribución de las diferentes moléculas (celulosa, hemicelulosa, lignina), dentro de la planta, de los enlaces entre ellas y de su sustitución por compuestos fenólicos (Chesson *et al.*, 1983).

La FND se compone de hemicelulosa, celulosa, lignina y cutina. Este componente representa entre el 30 y el 80% de la FB en los recursos forrajeros. En rumiantes, los solubles

celulares (MO menos FND) son casi completamente digeribles. La degradabilidad de la FND es muy variable, principalmente debido a diferencias en composición y estructura. Esto resulta en una limitada disponibilidad de la energía en forrajes para los rumiantes (Buxton y Redfearn, 1997). Los valores de FND son importantes porque reflejan la cantidad de forraje que el animal puede consumir. A medida que aumenta el porcentaje FND, la ingestión de materia seca generalmente disminuirá. Más del 50% de la fibra del forraje pasa a través del tracto digestivo sin ser degradada (Cherney *et al*., 1991). Se ha asumido que, en dietas fibrosas, es el volumen y el tiempo de permanencia de los forrajes lo que en primer lugar limita el consumo, debido a que la materia sin digerir permanece en el tracto digestivo (Jung, 1997).

La FAD está formada por celulosa, lignina y cutina y representa entre el 20 % y el 40 % de la FB. A medida que aumenta el FAD la digestibilidad del forraje disminuye normalmente. La diferencia entre la FND y la FAD proporciona el contenido de hemicelulosa del forraje, siendo un dato importante porque esta puede ser utilizada por los rumiantes. Generalmente, la fibra que tiene baja celulosa, lignina y hemicelulosa va a ocupar menos espacio en el estómago y será capaz de aportar grandes cantidades de energía al animal. Las fibras con alto contenido de estos materiales ocupan mayor espacio y producen menos energía para el animal.

La LAD se compone de lignina y cutina, pudiendo representar, aproximadamente, entre el 4 % y el 12 % de la FB. Uno de los mayores limitantes para la degradabilidad de la fibra es la presencia de lignina, aunque la pobre utilización de la fibra en rumiantes también obedece a limitaciones físicas a nivel de organización celular (Barahona y Sánchez, 2005). La lignina está asociada estrechamente a los carbohidratos de la pared con los que forma complejos (ligninocelulósicos) que dificultan la acción enzimática. La cantidad de lignina es el factor más crítico que afecta a la digestibilidad encontrándose junto al sílice en cantidades variables en la pared celular, siendo la calidad afectada en forma primordial por la reducción de la digestibilidad y tasa de digestión, lo cual se refleja en un menor consumo voluntario (Parsi *et al*., 2001), además, la lignina, que aumenta según crece el forraje, está asociada a una baja digestibilidad de la materia seca (Jung y Vogel, 1986).

El contenido de las fibras, y por tanto de la calidad como alimento, descritas anteriormente, varían en su valor según la etapa de crecimiento en la que se encuentre la planta y sus diferentes fracciones. Éstas a su vez varían según las condiciones ambientales, como el suelo, clima y fertilización y por su manejo, por ejemplo el número de aprovechamiento que se realicen. Norton (1981) afirma que las diferencias en el valor nutritivo de los pastos radican en la anatomía, fisiología y bioquímica de la planta (células, tejidos) y en su composición morfológica (distribución y proporción de órganos).

Un aspecto de interés es los cambios en los principales componentes de los forrajes con la madurez y cómo afectan éstos a su calidad (MGAP-IPA, 1995) (figura 16). En las primeras etapas de su desarrollo, las células vegetales deben ser capaces de crecer en tamaño (Iiyama *et*

al., 1993) y el citoplasma constituye una importante proporción de la materia seca, siendo la pared celular la menos importante. En este estadio, la pared celular recibe el nombre de pared primaria y es capaz de alargarse porque los polímeros de la pared no están ligados entre sí. La pared primaria está constituida por varios polisacáridos, incluyendo celulosa, β-glucanos de enlaces mixtos, heteroglucanos, glucuronarabinoxilanos y heteroxilanos (Moore y Hatfield, 1994), siendo los xilanos más abundantes en las paredes de las gramíneas que en las de las leguminosas.

A medida que el forraje madura, diversos factores interactúan, disminuye el citoplasma aumentando los carbohidratos estructurales y la lignificación de los mismos. Esto se produce por un aumento relativo de los tallos, los cuales poseen más lignina que las hojas (Parsi *et al*., 2001). Jung y Allen (1995) sugirieron que la formación de puentes de ferulato entre la lignina y los polisacáridos es un factor adicional que limita la degradación de fibra en el rumen. Del Pozo *et al*. (2002), en el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), comprobaron la influencia de la edad del rebrote y el nivel de nitrógeno en el contenido de carbohidratos solubles totales (figura 15), encontrando que, cuando la concentración de nitrógeno es baja, se reduce el contenido de carbohidratos solubles y de PB, aumentando los carbohidratos estructurales (FB).

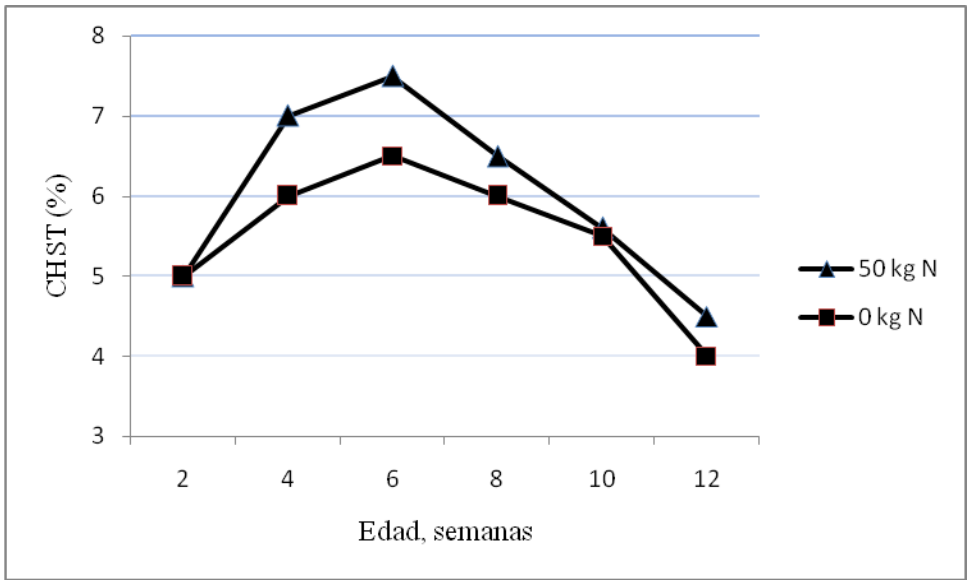


Figura 15. Influencia de la edad del rebrote y el nivel de nitrógeno en el contenido de carbohidratos solubles totales en *Cynodon nlemfuensis* (Del Pozo *et al*., 2002)

Cuando la célula vegetal deja de crecer e inicia el proceso de maduración, también se inicia la deposición de la pared secundaria y el proceso de lignificación. Al avanzar el estado de madurez, la proporción de los componentes de la pared celular de los pastos (celulosa, hemicelulosa y lignina) aumenta, mientras la proporción del contenido celular disminuye (Bruinenberg *et al*., 2000), lo que genera una disminución de la digestibilidad (figura 16).

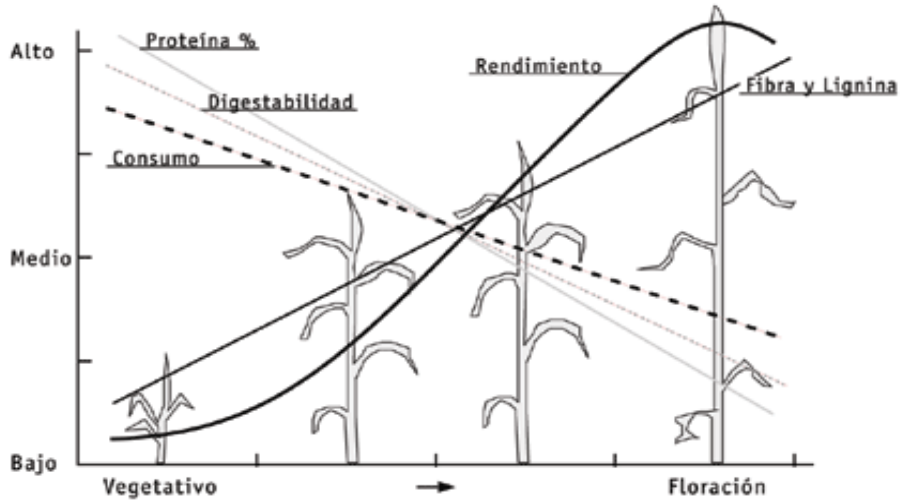


Figura 16. Variación del consumo, digestibilidad, rendimiento, proteína y fibra de un forraje al pasar del estado vegetativo a plena floración (Bruinenberg *et al.*, 2000)

Aparte de la evolución natural de las plantas, un factor muy importante es la temperatura, ya que es el factor que ejerce mayor influencia en la calidad del forraje. Como indican Trujillo y Uriarte (2005) al aumentar la misma, la digestibilidad disminuye como resultado de la combinación de dos efectos: alta temperatura ambiente resulta en aumento de la lignificación de la pared celular y además, promueve un incremento de la actividad metabólica con elevación de la tasa de crecimiento, lo cual disminuye el *pool* de metabolitos en el contenido celular. Esta actividad reduce el contenido de nitratos, de proteína, y de carbohidratos solubles del *pool* metabólico, mientras aumentan los componentes de la pared. A mayor temperatura aumenta la actividad enzimática asociada a la biosíntesis de lignina (Van Soest, 1994).

Otro factor es el abonado nitrogenado: la fertilización nitrogenada tiene un efecto positivo sobre la producción de materia seca y el contenido de proteína. Los aminoácidos y las proteínas son sintetizados a partir de los azúcares, por lo tanto, los carbohidratos solubles disminuyen. Este efecto se acelera a temperaturas altas (Trujillo y Uriarte, 2005).

Un ejemplo de la influencia del manejo en el contenido de fibras es el que proporcionan González *et al*. (2005), que comprobaron la influencia de la densidad de siembra en el contenido de fibra de un forraje de maíz, no observando diferencias significativas entre las distintas densidades de plantas y la fibra (tabla 3). Aunque otros autores, como Cusicanqui y Lauer (1999) sí detectaron incrementos en el contenido de FND y reducciones en la digestibilidad de la materia seca.

Tabla 3. Efecto de la densidad de población sobre la calidad del forraje en un híbrido de maíz (González *et al*. 2005)

Variable	Densidad de población (x10^4 pl ha^{-1})			Significancia
	6	8	10	
FND (% MS)	44.2	44.2	45.4	ns
FAD (% MS)	24.1	24.4	25.3	ns

Por otra parte, el problema de la baja degradabilidad de los forrajes está relacionado con la frecuencia del pastoreo, las prácticas de fertilización, el uso de sistemas silvopastorales y la renovación de praderas degradadas (Barahona y Sánchez, 2005). En un sentido amplio, un adecuado manejo de los pastos debe considerar la interacción pasto-animal-ambiente con el objetivo de alcanzar máximos rendimientos de forraje en cantidad y calidad, con la mejor estabilidad y persistencia del pastizal junto al óptimo de producción animal (Carámbula, 1996).

A fin de aumentar la degradabilidad de los forrajes, los programas de mejora y selección deben concentrarse en reducir el contenido de fibra y en aumentar su digestibilidad (Barahona y Sánchez, 2005). En los triticales, principalmente en los de hábito intermedio, se encontraron valores de FAD menores al 30% y valores de FND menores al 50%, cuando se realizaron dos cortes; lo anterior significa que el contenido de fibra de estos materiales está dentro de los rangos de forrajes de alta calidad, como la alfalfa (tabla 4) (Béjar y Ammar, 2007).

Tabla 4. Rendimiento y calidad nutritiva de triticales forrajeros y otras especies de invierno (Béjar y Ammar, 2007)

Genotipo	PB (%)	FND (%)	FAD (%)	VRF
Cebada	14.15	49.72	23.73	128
Trigo rojo	15.85	49.57	30.65	125
Centeno	15.84	56.84	28.82	110
Av. Cuauh.	19.60	42.64	25.28	161
Av. Coker	18.85	55.82	30.12	111
Trit. L7	16.50	54.42	29.03	114
Trit. L13	16.74	51.32	27.21	123
Trit. L16	19.77	5176	24.86	123
Trit. L4	19.46	49.04	21.16	132
Trit. L5	15.96	52.79	29.27	118
Trit. L8	17.10	51.50	27.53	122
Trit. L9	15.36	49.85	26.98	126
Trit. L11	17.16	51.24	24.92	124
Trit. L12	13.26	55.39	28.43	113
Trit. L14	11.59	50.57	27.10	125
Trit. L15	18.58	52.24	31.60	118
Trit. L17	21.12	49.81	24.10	128
Trit. L1	24.71	45.98	21.99	129
Trit. L3	11.44	54.63	28.72	114
Trit. L18	22.36	50.94	23.73	126
Trit. L19	22.82	47.67	21.43	136
Trit. AN34	11.33	51.66	27.98	122
Ryegrass	16.00	35.80	28.58	183
Trit. L2	19.51	48.33	23.81	132
Trit. L6	14.74	52.90	27.62	119
Trit. L10	13.96	55.25	30.29	112
Trit. L20	14.92	51.23	26.29	123
Trit. AN31	15.29	50.72	26.03	125

2.2.2.3. Valor relativo del forraje (VRF)

A lo largo de la historia se han investigado varios índices de calidad del forraje, por ejemplo, consumo de energía digestible, índice de calidad, índice de valor nutritivo y valor relativo del forraje (Moore y Hatfield, 1994).

La medida de la calidad del forraje de alfalfa más ampliamente aceptada es el Valor Relativo del Forraje (VRF). VRF es un índice utilizado para comparar la calidad de los forrajes en relación con el valor nutritivo de la alfalfa en plena floración y se utiliza para comparar forrajes de la misma especie basándose en la cantidad ingerida y en la digestibilidad de la materia seca (Dunham, 1998).

El valor relativo del forraje (VRF) es el único índice de calidad del forraje utilizado ampliamente en los Estados Unidos. Fue desarrollado por la *American Forage and Grassland Council* (AFGC) (Rohweder *et al*., 1978). Actualmente, los laboratorios de la *National Forage Testing Association* (NFTA) informan de los valores de VRF y los productores de semillas forrajeras también lo utilizan para indicar la variedad mejorada (Moore y Undersander, 2002). Los productores y compradores de heno utilizan el VRF para fijar los precios (Undersander, 2001). Conceptualmente, el VRF es similar al sistema francés de las Unidades Lastre desarrollado por el INRA (1978). El INRA francés ha propuesto no utilizar la materia seca como medida de la capacidad de ingestión, sino utilizar la Unidad Lastre (UL) que se define como la ingestión voluntaria de materia seca de un pasto joven por parte de un rumiante; la implantación de este sistema de valoración de la ingestión ha sido progresiva y en su última edición el INRA (2007) ya lo utiliza en todas las especies de rumiantes domésticos. En la tabla 4 se pueden observar valores de VRF de distintos cultivos forrajeros.

Este índice (VRF) está basado en la estimación de la Materia Seca Digestible (MSD) y el Consumo De Materia Seca (CMS) y como indican Jeranyama y García (2004), existen algunas limitaciones en su uso:

- CMS y MSD se asumen constantes para todos los forrajes.
- FND y FAD son los únicos valores de laboratorio usados para el cálculo.
- La proteína del forraje no se utiliza.
- VRF no puede ser utilizado en la formulación de raciones o en su evaluación.

Los rumiantes, en el caso de raciones de buena calidad, regulan la ingestión de alimento de forma similar a los monogástricos, ingiriendo la cantidad de energía necesaria para cubrir sus necesidades energéticas. Cuando se usan forrajes, sobre todo si éstos son de mala calidad por sus altos contenidos en fibras, la capacidad física del rumen hace imposible que el animal ingiera todo el alimento que necesita, por lo que el animal debe obtener parte de la energía

movilizando sus reservas corporales o recurriendo el ganadero a concentrados. Por ello, es necesario estimar la calidad del forraje que puede consumir el animal, ya que la capacidad ruminal suele limitar la inclusión de forrajes en la ración, al retrasar la velocidad del vaciado ruminal por la permanencia de la fibra en el rumen, haciendo necesario un aumento de alimentos concentrados.

2.3. Tecnología NIRs

La tecnología NIRs es una técnica espectroscópica de gran aplicabilidad en el sector agroalimentario, farmacéutico o químico,… ya que permite la cuantificación de distintos parámetros de composición de las muestras problema, así como establecer modelos predictivos de clasificación cualitativa, a través de la combinación de la química analítica con técnicas estadísticas multivariantes; lo que se conoce como quimiometría. Dentro de sus múltiples aplicaciones, permite determinar la composición nutricional de distintos forrajes (Alomar y Fuchslocher, 1998; Faughey y Sharma, 2000).

En los últimos 40 años, ésta técnica ha logrado importantes contribuciones al sector de la producción agroalimentaria, ya que su correcto uso es capaz de reportar importantes beneficios de tiempo y dinero, siempre y cuando se mantenga una debida interacción entre empresarios agrícolas, profesionales del área, ambientalistas, plantas procesadoras de alimentos y proveedores de materias primas (Batten, 1998).

La tecnología NIRs ha sido ampliamente utilizada tanto en forrajes destinados a alimentación animal (Cozzolino, 2002), como en forrajes de praderas o ensilados (Castro *et al*., 2005), maíz forrajero (Campo *et al*., 2007), así como carne y productos cárnicos (Prieto *et al*., 2006; Tejerina *et al*., 2009); ya que se trata de una técnica rápida, precisa, respetuosa con el medio ambiente y no destructiva, que requiere de una mínima o nula preparación de la materia prima (Givens *et al*., 1997). De manera contraria, la principal desventaja de NIRs, señalada por Alomar y Fuchslocher (1998), es que requiere de instrumentos de espectroscopía de alta precisión y valor comercial, aunque para Osborne *et al*. (1993), sería la dependencia de NIRs a los métodos empíricos tradicionales de análisis químicos de alimentos. Por otra parte, Rodriguez *et al*. (1996) destacan la necesidad de efectuar calibraciones específicas para cada espectrofotómetro. Murray (1986) y Osborne *et al. (*1993) afirman que los métodos cuantitativos y cualitativos tradicionales de análisis son dificultosos, demandan tiempo, mano de obra, y que los equipos son de un elevado costo.

2.3.1. Origen y desarrollo de la técnica NIRs

El primer espectro de reflectancia en el infrarrojo data de los estudios de William Herschel en el año 1800 (Hindle, 1999). Posteriormente, en 1881 se determinó fotográficamente el espectro en el infrarrojo cercano (NIR) de varios líquidos orgánicos, poniendo de manifiesto la importancia que representan los enlaces de hidrógeno en la absorción de energía en la región NIR (Osborne *et al*., 1993).

El origen de la técnica NIRs se remonta a Europa, sin embargo, su mayor desarrollo tuvo lugar en los Estados Unidos de Norteamérica, (Osborne *et al*., 1993). Pero hasta la década de los ‘50 no se llevó a cabo la construcción de espectrofotómetros, con los cuales el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), comenzó a estudiar materiales biológicos (Hindle, 1999). Norris *et al*. (1976) dan a conocer en su trabajo *Predicting Forage Quality by Infrared Reflectance Spectroscopy*, una de las primeras aplicaciones de NIRs para predecir la composición, consumo y digestibilidad de forrajes en el ganado; trabajo que más tarde fue la base para establecer un sistema computacional para investigaciones sobre forrajes en el USDA (Givens *et al*., 1997).

2.3.2. Fundamentos básicos de la espectroscopía

La espectroscopía se basa, esencialmente, en la interacción de la radiación electromagnética con la materia objeto de estudio (Reeves, 2000). El funcionamiento básico de esta técnica busca la absorción de energía por parte de las moléculas constituyentes de la materia y su posterior reacción vibratoria, de extensión, doblamiento u otras, de los enlaces covalentes que las conforman (Alomar y Fuchslocher, 1998).

2.3.2.1. Radiación electromagnética y su infrarrojo cercano

Morcillo (1974) y Osborne *et al*. (1993) señalan que la radiación electromagnética puede ser considerada como un conjunto de ondas armónicas simples, las que ondulan interconectadas entre sí mediante campos eléctricos perpendiculares a la dirección de propagación y campos magnéticos con la misma frecuencia y perpendicular al campo eléctrico, siendo éstos los que interactúan con la materia objetivo. Por su parte, un movimiento de onda armónico simple, puede ser caracterizado por las propiedades del seno de ésta, tales como: frecuencia (número de ciclos por segundo de la onda) y longitud de onda.

El vasto espectro de la radiación electromagnética, se encuentra clasificado en varias categorías, las cuales, según Hecht y Zajac (1986), corresponden a una división bastante ligera y sin universalidad en la nomenclatura física actual. Una de las anteriores categorías constituye la

región infrarroja, la cual se extiende aproximadamente desde 780 nm hasta 1000 mm, siendo subdividida en infrarrojos cercano, intermedio, lejano y extremo.

La región NIR, para Hechtz y Zajac (1986), está comprendida entre los 780 nm y 3000 nm, mientras que Osborne *et al*. (1993) indican como límite superior los 2500 nm. A pesar de lo anterior, Infrasoft International (1992) coincide con lo propuesto por Osborne *et al.* (1993), en que el límite superior de NIR corresponde a los 2500 nm. Por su parte Reeves (2000), menciona que existe otra región que se encuentra ubicada entre la visible (400–760 nm) y el NIR, siendo ésta denominada NIR onda corta (short-wave-NIR) ubicada entre 760 y 1100 nm, y que en ciertas ocasiones es incluida y utilizada como parte de NIR, considerando la región NIR desde 760 hasta 2500 nm. Para Infrasoft International (1992), la región NIR corresponde desde los 1100 a 2500 nm, y desde los 700 a 1100 es una etapa de transición entre las regiones visibles y NIR.

2.3.2.2. Interacción radiación – materia en el infrarrojo cercano

La interacción de la radiación infrarroja con una muestra puede ser registrada mediante un espectro de transmitancia o reflectancia. Este se define como la representación gráfica de la radiación infrarroja incidente (transmitida o absorbida) en función de la longitud de onda (o número de onda) de la misma (Morcillo, 1974).

Esencialmente, la técnica NIRs puede ser aplicada mediante dos modos (de radiación): transmitancia y reflectancia de la energía (Murray, 1993). Cuando la radiación incidente (I_o) interactúa con una muestra, ésta puede ser absorbida (I_a), transmitida (I_t) o reflejada (I_r). Según la ley de conservación de la energía, la radiación total incidente debe ser igual a la sumatoria de los distintos caminos que pueda seguir la radiación. Ésta se representa en la ecuación 2.1. (Murray, 1993; Osborne *et al*., 1993).

$$I_0 = I_a + I_t + I_r \qquad (2.1)$$

La luz total reflejada por una muestra es la suma de la reflexión especular más la reflexión difusa. Esta última representa la dispersión de las ondas y ocurre cuando la energía es transmitida momentáneamente y a la vez absorbida de manera parcial a través de una muestra para luego emerger difusamente sin un patrón definido. La dispersión sufrida por las ondas se encuentra sujeta a las propiedades físicas de la superficie sometida, es decir, de la composición física de la muestra. Las más importantes son: el tamaño de partículas, contenido de humedad y temperatura de la misma. La heterogénea composición de una muestra es causante, en adición a las características físicas, de una mayor distorsión en la dispersión de la luz expresada en el

solapamiento de las bandas espectrales correspondientes a la materia analizada (Givens *et al*., 1997).

Shenk y Westerhaus (1994) y Reeves (2000), aclaran que de acuerdo a la ley de Beer-Lambert, la radiación absorbida por una muestra (At) es directamente proporcional a la absorbancia de ésta en el momento que ocurre transmisión (T) de energía, estableciendo que la concentración de los enlaces moleculares es lineal al log 1/T (ecuación 2.2). Dicha relación, es fundamental para cuantificar la absorción y puede además ser aplicada en mediciones de reflectancia (R) para aquellos materiales que dispersan luz. La interpretación de la ley de Beer-Lambert para utilizarse en reflexión difusa se expresa en la ecuación 2.3.

$$At = \log 1/T = \log I_o / I_t \quad (2.2)$$

$$Ar = \log 1/ R = \log I_o / I_r \quad (2.3)$$

donde: At es la radiación absorbida utilizando transmitancia y Ar utilizando reflectancia. I_o: intensidad de luz que incide en la muestra y proveniente de la fuente. I_t: intensidad de luz transmitida. I_r: intensidad de reflejada.

2.3.2.3. Enlaces moleculares e información generada mediante radiación

El infrarrojo cercano se caracteriza porque las muestras presentan baja absorción comparado con otras regiones del infrarrojo. Esto permite la penetración de la luz en el interior de la muestra. Tras la interacción de la radiación con la muestra, los enlaces covalentes experimentan la acción vibratoria y de desdoblamiento (Alomar y Fuchslocher, 1998).

Cuando una muestra es irradiada, la luz es absorbida selectivamente de acuerdo a la frecuencia vibratoria específica de las moléculas, es decir, se produce un acoplamiento de iguales frecuencias que provoca cambios en el estado energético de éstas, reflejando la información de los grupos moleculares presentes (Morcillo, 1974; Givens *et al*., 1997).

Las reacciones vibratorias moleculares, corresponden principalmente a moléculas asociadas al átomo de hidrógeno, como pueden ser uniones C–H, O–H y N–H (Uruguay, instituto de investigaciones agropecuarias INIA, 2001). En general, todos los enlaces de origen orgánico presentan bandas de absorción en la región del infrarrojo cercano, mientras que los minerales sólo pueden ser detectados en complejos orgánicos o quelados, o indirectamente en su efecto sobre enlaces de hidrógeno (Ciavarella *et al*., 1998; Reeves, 2000).

Las uniones moleculares pueden presentar más de una banda de absorción. Osborne *et al*. (1993), mencionan que para el enlace más importante en las moléculas orgánicas (C-H) diversos estudios han establecido hasta cinco bandas de absorción para un mismo compuesto.

En la tabla 5 se presentan algunas bandas de absorción que identifican a los constituyentes de una muestra mediante sus enlaces químicos (Davies y Grant, (1987) y Osborne *et al*. (1993)).

Tabla 5. Bandas de absorción de enlaces químicos en la región NIRs (Davies y Grant, 1987; Osborne *et al*., 1993)

Longitud de onda (nm)	Constituyente	Enlace asignado
1152	CH_3	C-H
1170	HC=CH	C-H
1200	Lípidos, CH_2	C-H
1440	Agua, almidón, sacarosa	O-H
1730	Lípidos	C-H
1780	Lípidos, celulosa	C-H
1940	Agua	O-H
1980	Proteínas	N-H
2080	Almidón, sacarosa	O-H
2180	Proteína, CH_2	C=O, N-H
2320	Lípidos	C-H
2350	Lípidos, celulosa	C-H

En la ecuación 2.3 se presentó la relación que permite aplicar la ley de Beer-Lambert para reflectancia. La información obtenida a partir de los enlaces moleculares presentes en una muestra es captada por detectores que la amplifican. Posteriormente los espectros son promediados y expresados como log 1/R (1= referencia) para la longitud de onda correspondiente (Coventry, 1988; Givens *et al*., 1997).

2.3.3. Equipos NIRs

El desarrollo tecnológico experimentado en las últimas décadas, ha permitido el avance de la técnica NIRs para la creación de nuevos diseños, tanto de equipos como de sus componentes (Alomar y Fuchslocher, 1998). Las ciencias involucradas con la técnica: óptica, electrónica, computación (hardware y software) y quimiometría, han sido importantes condicionantes para la evolución de los equipos NIRs (Hindle, 1999; Reeves, 2000).

Al considerar la variada y abundante información generada por los espectros NIRs, obtenida por ejemplo, de distintos alimentos como forrajes o leche, la cual sólo puede ser extraída mediante el procesamiento matemático de los datos, Osborne *et al*. (1993), destacan la relevancia de los computadores utilizados como componente de los equipos. Así, señalan que la información obtenida no sería posible de utilizar sin la presencia de éstos y que a medida que la velocidad y capacidad de ellos aumente, así lo hará la utilización de NIRs.

La disponibilidad de diferentes modelos de equipos NIRs es alta. Sin embargo, principalmente están compuestos por: una fuente que irradia energía, un discriminador de longitudes de onda, un medio para exponer la muestra a la irradiación, un detector que convierta la energía irradiada a una señal eléctrica y un procesador de la señal y lector (Givens *et al*., 1997). No obstante, la configuración básica de los dispositivos antes mencionados difiere entre

instrumentos según sea el carácter de acción de la radiación que utilice el equipo: transmitancia o reflectancia (Osborne *et al*., 1993).

En la actualidad, los instrumentos NIRs es posible encontrarlos en una amplia variedad de tamaños y formas. Reeves (2000), señala que existen diversas formas de clasificación para equipos. Según el mecanismo para presentar la muestra pueden ser de: fibra óptica, celdas rotatorias para muestras molidas, cubetas para materiales voluminosos y contenedores para líquidos. En base al diseño óptico pueden clasificarse en equipos de: filtros, rejillas (red de difracción), diodos emisores de luz (*diode array*), detectores simples (*single detectors*) y esferas integradas. Según el rango de longitud de onda que emitan, pueden clasificarse en: infrarrojo cercano (NIR), onda corta NIR (SWNIR), SWNIR y NIR e infrarrojo medio (MIDIR). Sin embargo, Deaville y Flinn (2000), mencionan que los equipos más ampliamente difundidos son los equipos monocromadores de barrido, que presentan la ventaja de emitir longitudes de onda que abarcan el infrarrojo cercano en su totalidad.

2.3.3.1. Monocromadores de barrido

Estos instrumentos, comparten con los demás equipos la presencia de una fuente de radiación, espejos o lentes para enfocar la luz, detectores para cuantificar la luz reflejada y un estándar interno para ajustar distintas condiciones ambientales (Clark *et al*., 1987).

La absorción en NIRs requiere de una fuente de energía de tal magnitud, que la emisión de ésta debe abarcar la región espectral del infrarrojo cercano en su totalidad. Prácticamente todos los instrumentos NIRs utilizan bombillas con filamento de tungsteno como fuente emisora, existiendo además, bombillas halógenas de cuarzo de mayor duración que las anteriores (Osborne *et al*., 1993). Como fuente dispersora de la luz emitida, un monocromador utiliza un prisma o red de difracción que genera diferentes longitudes de onda (Givens *et al*., 1997; Alomar y Fuchslocher, 1998), las que son cuantificadas mediante "detectores infrarrojos", comúnmente de sulfuro de plomo (material fotosensible), y por último, como estándar interno se utiliza un cerámico (Givens *et al*., 1997).

La forma de presentar una muestra para la obtención de su espectro, es mediante dispositivos o sondas especialmente diseñados para equipos NIRs. Los más utilizados en reflectancia cuentan del siguiente diseño; una cubierta circular de cuarzo, de 3,5 cm de diámetro, montada en un cilindro plástico o de aluminio (color negro) de un centímetro de profundidad. Estas pueden ser utilizadas en el análisis de materiales finamente molidos o con algún grado de preparación. Otros modelos de recipientes, permiten trabajar indistintamente en el modo de reflectancia o transmitancia y con muestras intactas. Para ello, deben poseer una doble ventana de cuarzo, entre las cuales se deposita la muestra, permitiendo así el paso de la radiación para el caso de transmitancia (Reeves, 2000).

2.3.4. Fuentes de error en análisis NIRs

Las principales fuentes de variación en la técnica son referidas a factores intrínsecos de la muestra en lo que respecta a: tamaño de partícula, temperaturas de la muestra e instrumento y diversidad composicional. En relación al equipo, se mencionan factores concernientes al mismo como fuente de error (divergencia del haz en la celda, reflexión o efectos de interferencia, etc) (Reeves, 2000). Sin embargo, Norris *et al*. (1976) advierten que la mayor fuente de error en mediciones NIRs es la muestra misma en su proceso anterior al análisis, producto de errores de muestreo, inestabilidad de la muestra, irregularidad de la muestra, problemas de almacenamiento y errores en los análisis de referencia.

Para calcular el error de laboratorio se utiliza el error estándar de laboratorio (EEL) de la variable calibrada (Westerhaus, 1989). El EEL se define como el error estándar de muestras analizadas en duplicado mediante el método de referencia y cuya fórmula es:

$$EEL = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_1 - y_2)^2}{2n}} \quad (2.4)$$

donde y_1 e y_2 son el primer y segundo duplicado del valor de la propiedad a determinar para una misma muestra, y n es el número de muestras

2.3.5. Calibraciones cuantitativas NIRs

Éstas se definen como el procedimiento matemático mediante el cual se relacionan las medidas ópticas de NIRs con un constituyente o propiedad física que se desea conocer de una materia definida (Deaville y Flinn, 2000).

Según Osborne *et al*. (1993), para poder realizar medidas cuantitativas con instrumentos NIRs es necesaria una calibración previa, independientemente de los equipos utilizados, Murray (1988) y Givens *et al*. (1997), señalan que al no existir una ley matemática que permita describir la interacción de la radiación con un medio de dispersión de ondas, el cual resulta en una heterogénea distribución de éstas, las técnicas de espectroscopía son empíricas o secundarias puesto que requieren de calibraciones por medio de muestras de conocida composición, determinada mediante técnicas primarias o métodos tradicionales de análisis químicos.

El procedimiento usual para calibraciones involucra la colección de un grupo de muestras, las cuales deben ser representativas de la población que será analizada con el instrumento (Deaville y Flinn, 2000). El siguiente paso es la colección de los espectros y

análisis de referencia, pre-tratamiento de la información espectral, modelos estadísticos y su validación (Givens *et al*., 1997).

2.3.6. Tratamiento de datos espectrales

Los datos recogidos en reflectancia por el espectrofotómetro son transformados a absorbancia porque el rango de variación del valor químico a medir es más amplio que en reflectancia.

Posteriormente al almacenamiento de los datos de reflectancia (R) como absorbancia (log 1/R), es necesario someter la información espectral a tratamientos matemáticos para, mediante análisis estadísticos, determinar las calibraciones más satisfactorias (Shenk y Westerhaus, 1994; Alomar y Fuchslocher, 1998).

2.3.6.1. Tratamientos matemáticos

Al obtener el espectro de una muestra en un espectroradiómetro, debido fundamentalmente al tamaño de las partículas, forma de las partículas, composición química de la muestra etc., principalmente aparecen tres dispersiones en el espectro, influyendo en el proceso matemático de elaboración del modelo de calibración cuantitativa. Estas dispersiones son el efecto aditivo, el efecto multiplicativo y la superposición de la señal.

Los tratamientos matemáticos permiten, en general, reducir interferencias por factores como el tamaño de partícula de la muestra, destacar rasgos del espectro y facilitar el análisis estadístico de regresión (Shenk y Westerhaus, 1994; Alomar y Fuchslocher, 1998), además de eliminar la falta de linealidad en datos espectrales, debida a la dispersión de luz (Givens *et al*., 1997). Estos tratamientos matemáticos evitan que los efectos negativos anteriormente mencionados dominen sobre las variaciones de las medidas con la concentración.

El tamaño de partículas de una muestra produce interferencias tales como la expansión o contracción del espectro en forma multiplicativa y variaciones en la capacidad de penetración de la luz incidente sobre la muestra, para lo cual diversos tratamientos matemáticos pueden ser aplicados al espectro, ya sea en partes localizadas o a la totalidad de éste. Con esto se consigue eliminar ruidos o interferencias en la muestra, logrando lo que se denomina un espectro suavizado (Shenk y Westerhaus, 1994; Alomar y Fuchslocher, 1998).

El tratamiento de diferenciaciones o derivadas es señalado como el más común entre las posibles alternativas a utilizar ya que aminoran los efectos de superposición y a su vez puede ser aplicado en conjunto a otros tratamientos. Sin embargo, el uso de derivaciones es sólo parcialmente atractivo, puesto que reduce sustancialmente el efecto del tamaño de partículas, pero no lo elimina totalmente (Murray, 1988; Osborne *et al*., 1993). La utilización de

diferenciaciones permite tratar matemáticamente el espectro mediante cambios locales del mismo y considera el cálculo de promedios y sustracciones de los datos de absorción a distintas longitudes de onda a lo largo del espectro (Shenk y Westerhaus, 1994), así reduciendo la alta correlación entre los datos espectrales a diferentes longitudes de onda (Osborne *et al*., 1993). Según Davies y Grant (1987) sobre la base de tratamientos de diferenciación, es posible mejorar considerablemente la resolución de las bandas de absorción mediante la descomposición de la compleja combinación de picos que forman un espectro infrarrojo. Sinnaeve *et al.* (1994), señalan que los mejores resultados obtenidos en el análisis de forrajes, se han conseguido con una primera o segunda derivada, considerando segmentos e intervalos de cinco datos o puntos.

Los tratamientos matemáticos más destacables dentro de la literatura que permiten transformaciones a la totalidad del espectro son: Transformación de Fourier, Corrección de Variación Normal Estándar (SNV) y Corrección de Dispersión Multiplicativa (MSC) (Dardenne *et al*., 2000; Deaville y Flinn, 2000).

En el procedimiento de MSC se fija un espectro promedio del grupo de muestras y se busca el ajuste de éste mediante su contracción o expansión, logrando así el mejor parecido de los espectros al promedio seleccionado (Deaville y Flinn, 2000) y reduciendo los efectos por adición y multiplicación en los espectros. El SNV propuesto por Barnes *et al*. (1989), elimina la interferencia multiplicativa o dispersión, reduciendo el efecto de tamaño de partícula mediante el ajuste de cada espectro utilizando los datos del propio espectro para disminuir los efectos de interferencia.

2.3.7. Muestras aberrantes o extrañas

Según Westerhaus (1989), durante el proceso de calibración, uno de los parámetros más importantes es la determinación de límites para detectar y eliminar muestras aberrantes u "*outliers*".

Murray (1988) señala que existen dos criterios para clasificar una muestra como aberrante: en base a los valores de referencia (información química), valor denominado "T", o a sus datos espectrales, valor denominado "H", donde el primero representa la relación entre el valor de predicción y el de referencia para cada muestra, y el segundo relaciona cada espectro con el resto de las muestras que forman el grupo de calibración.

2.3.8. Métodos estadísticos para calibraciones NIRs

El método estadístico más utilizado en NIRs es el análisis de regresión (Infrasoft International, 1992). Givens *et al*. (1997) destacan la variada disponibilidad de métodos

multivariables de calibración, sin embargo todos poseen la misma forma básica, como se muestra en la ecuación 2.5.

$$Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + ... + b_k X_k \quad (2.5)$$

donde Y es la variable a ser medida; *a* es la constante de regresión de la ecuación; de b_1 a b_k son los coeficiente de regresión y X_1 a X_k son los términos de valores espectrales.

En referencia a la ecuación, Walpole *et al.* (1999) señalan que cuando este modelo es lineal en los coeficientes, se denomina modelo de regresión lineal múltiple. Montgomery y Runger (1996) aclaran que se utiliza el término lineal porque la ecuación (2.5) es una función lineal de los parámetros desconocidos: a y b_1 a b_k. Además, mencionan que frecuentemente los modelos de regresión lineal múltiple se emplean como funciones de aproximación. Ésto es, se desconoce la verdadera relación funcional entre Y y b_1 a b_k, pero sobre ciertos rangos de las variables independientes el modelo de regresión lineal múltiple constituye una aproximación adecuada.

Las técnicas de regresión lineal más utilizadas para desarrollar calibraciones NIRs son: regresión múltiple, componentes principales (PCR) y mínimos cuadrados parciales (PLS).

La esencia de los métodos PCR y PLS radica en la asignación de factores provenientes de los datos espectrales. El objetivo es el de reducir la cantidad de información espectral a variables no relacionadas, y así evitar problemas de sobreajuste de las ecuaciones obtenidas, pero, sin desechar cualquier información útil (Osborne *et al.*, 1993). La diferencia entre los métodos antes mencionados está basada en la información utilizada. PLS utiliza la información química de las muestras pertenecientes al grupo de calibración para realizar la asignación de los factores; mientras que para PCR se generan factores omitiendo la información química (Infrasoft International, 1992).

Pero en el desarrollo de cualquier modelo de calibración se necesita de algún sistema que, aparte de saber si una calibración proporciona una capacidad predictiva apropiada, permita evaluar la conveniencia de utilizar más o menos componentes principales (valor *p*= número de términos de la ecuación). En el modelo PLS, la selección del número de factores óptimo se realizará basándose en el estadístico del error cuadrático medio (RMSE = *Root Mean Square Error*).

Cuanto mayor sea el número de factores, el porcentaje de información incluida en el modelo es mayor y los errores de calibración disminuyen, sin embargo, la complejidad del modelo aumenta. Es por ello, que se debe llegar a una solución de compromiso tratando de obtener el modelo más simple con la mejor capacidad predictiva. Uno de los criterios que usamos para esta selección fue la elección de los factores que suministre el menor error de predicción. La determinación del número de factores o componentes se llevará a cabo utilizando

como criterios de decisión el análisis de la ganancia en varianza explicada al añadir un nuevo componente al modelo y a través de la comparación de la representación gráfica del RMSE frente al número de componentes, tanto para calibración (RMSEC) como para validación (RMSEP). Así, el RMSEC disminuirá paulatinamente al aumentar el número de componentes, en cambio, el RMSEP presenta un mínimo o bien una disminución relativa significativamente menor a partir del número óptimo de componentes.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(Y_1^{\,NIR} - Y_2^{\,REF}\right)^2}{n}}$$

Siendo *n* el número de muestras, Y^{REF} los valores de referencia e Y^{NIR} los valores predichos por el modelo. El RMSE puede ser considerado como el error medio obtenido en el proceso de modelado y está expresado en las mismas unidades que los datos de referencia.

2.3.9. Criterios de selección de ecuaciones

En el proceso de elaboración de ecuaciones, para la elaboración de un modelo de calibración, se obtienen distintas ecuaciones de regresión. El problema surge a la hora de determinar cuál es la más adecuada, es decir, aquella de la que cabe esperar un mejor funcionamiento en la práctica: máxima exactitud y robustez (López, 1997).

Los estadísticos utilizados para la evaluación de ecuaciones NIRs no han sido totalmente estandarizados por la comunidad NIRs, siendo frecuente que diferentes trabajos publicados y software difieran a veces en los estadísticos utilizados.

No obstante existen algunos estadísticos de uso muy generalizado, normalmente propuestos por investigadores en el área NIRs, de relevancia en el desarrollo teórico de esta tecnología (Shenk y westerhaus, 1992; Workman, 2009).

A continuación, se detallan los diferentes estadísticos de calibración utilizados en el desarrollo de las mismas:

- El coeficiente de determinación (R^2), se define como el porcentaje de variabilidad explicada en las concentraciones modeladas por la ecuación de regresión. Se emplea tanto en el proceso de calibración (R^2) como en el proceso de validación cruzada (1-VR). Un R^2 de 0 indica que no existe relación entre ambas variables, mientras que un R^2 igual a 1 indica un ajuste perfecto. Un bajo valor de R^2 indica generalmente que los valores de laboratorio son imprecisos (Westerhaus, 1989; Shenk y Westerhaus, 1994).

– El error estándar de calibración (EEC), de validación cruzada (EE_{VC}) y de predicción (EEP) son los errores estándares de los residuales para el conjunto de calibración, validación cruzada y validación externa, respectivamente y se obtienen a partir de la fórmula general del error estándar (EED) (Infrasoft International, 1992):

$$EED = \sqrt{\sum (D)^2 / N} \quad (2.6)$$

donde: D = diferencia entre dos valores y N = número de muestras.

El EEC tiene como función comparar diferentes calibraciones generadas a partir de un mismo grupo de datos, indicando la incertidumbre de la calibración (Davies y Grant, 1987). Un bajo valor EEC indica un buen ajuste de las muestras usadas para la calibración. Si la medición NIRs y el proceso de calibración estuvieron libres de error, el EEC será igual al error estándar de laboratorio (EEL) de la variable calibrada (Westerhaus, 1989).

- Reeves *et al*. (1991), Murray (1993) y Westerhaus (1989) señalan que al momento de seleccionar una ecuación es necesario considerar ambos indicadores, R^2 y EEC, como discriminador de ecuaciones. La fórmula general para el EEC y R^2 se presentan en las ecuaciones 2.7 y 2.8, respectivamente.

$$EEC = \sqrt{\frac{\sum (y - x)^2}{(N - tc - 1)}} \quad (2.7)$$

donde: *y* es el valor de referencia; *x* es el valor predicho por NIRs; N es el número de muestras en el grupo de calibración y t_c es el número de términos en la ecuación de regresión.

El coeficiente de determinación se define mediante la siguiente fórmula:

$$R^2 = 1 - \frac{EEC^2}{DE^2} \quad (2.8)$$

donde: *DE* representa la desviación estándar de los valores de referencia (Westerhaus 1989).

La selección de la mejor ecuación de calibración está dada por la relación entre los coeficientes de determinación más altos y los errores estándar de calibración más bajos (Reeves *et al.*, 1991; Alomar y Fuchslocher, 1998).

Según Walpole *et al*. (1999) el R^2 sólo indica qué proporción de la variación total en la respuesta Y (valor predicho) se explica con el modelo ajustado, debiendo utilizarse éste como un criterio más para seleccionar la mejor ecuación de regresión. Montgomery y Runger (1996) señalan que un valor elevado de R^2 no necesariamente implica que el modelo de regresión sea satisfactorio. La adición de una variable al modelo siempre aumenta el R^2, sin importar si la variable es o no estadísticamente significativa. Es así como los modelos que presenten elevados coeficientes pueden proporcionar predicciones pobres de nuevas observaciones o estimaciones de la respuesta promedio.

En consideración a lo expuesto anteriormente, Reeves *et al*. (1991), Murray (1993) y Westerhaus (1989) señalan que al momento de seleccionar una ecuación es necesario considerar ambos indicadores, R^2 y EEC, como discriminadores de ecuaciones.

- El error estándar de la validación cruzada (EE_{VC}) se obtiene de la predicción de las muestras no incluidas en los grupos de calibración en una validación cruzada y resulta ser el mejor estimador de la capacidad de predicción de una ecuación de calibración (Shenk y Westerhaus, 1996).

Se debe tener en cuenta que el error estándar de la validación cruzada será siempre mayor al error estándar de la calibración (Infrasoft International, 1992).

Aunque no existen normas que determinen la mejor ecuación, la mayoría de los investigadores NIRs emplean uno o varios de los siguientes criterios:

1. Los valores de error estándar de la calibración y validación cruzada deben ser de magnitud similar entre sí y semejantes al error estándar de laboratorio. En general, las ecuaciones que posean un error estándar de la validación cruzada o de predicción de una magnitud 1 a 1.5 veces el error estándar de laboratorio, tienen una precisión excelente. Ecuaciones con valores de EE_{VC} o EEP de una magnitud de 2 a 3 veces el error estándar de laboratorio de referencia tienen una precisión buena (Delgado, 2003).
2. Se considera que los valores de EEC o EE_{VC} de dos ecuaciones no son significativamente diferentes cuando se diferencian en menos del 20% (Delgado, 2003).
3. Los valores del coeficiente de determinación de la validación cruzada y de la calibración deben ser próximos a 1 ó bien ser acordes con el máximo establecido por la ecuación de Workman (2009), donde se estima R^2 de acuerdo al error estándar de laboratorio y el error estándar de los valores de concentración de las muestras analizadas.

$$R^2_{est} \approx 1 - \frac{EEL^2}{DE^2_{rango}} \quad (2.9)$$

donde: *EEL* = error estándar del laboratorio y *DE* rango = error estándar de los valores X (valores de concentración)

Shenk y Westerhaus (1994) indican que las calibraciones con valores de R^2 entre 0.89 y 0.69 producen una buena predicción cuantitativa y las que tengan un valor comprendido entre 0.6 y 0.5 permiten una adecuada separación entre muestras de alto, medio y bajo contenido en un determinado parámetro analítico. Los mismos autores sugieren que aquellas calibraciones con un valor de R^2 inferior al 0.5 permiten únicamente una separación de muestras en dos grandes grupos: alto y bajo contenido.

4. Se elegirán ecuaciones sencillas que utilicen un menor número de términos o factores PLS.
5. A igualdad de los estadísticos EE_{VC} y EEC, son preferibles las ecuaciones que utilicen derivadas y dentro de éstas son preferibles las ecuaciones que utilizan 1ª y 2ª derivada frente a las de orden superior.
6. Otro índice utilizado es el RPD, que es la relación entre desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada (DE/EE_{VC}) que según Williams *et al*. (1992), valores de RPD menores a 2.4 corresponden a ecuaciones poco confiables para propósitos de predicción. Con relaciones RPD entre 2.4 y 3, la calidad predictiva aumenta y la ecuación se puede aplicar con fines de aproximación o clasificación en rangos. Cuando el RPD es superior a 3, la calidad de la ecuación es aceptable para fines de predicción.

Todos los estadísticos utilizados guardan relación con R^2. Si mejora R^2 los estadísticos mejoran correlativamente, luego la clave está en escoger la calibración con mayor R^2 y menor número de componentes principales (CP) y como índice de efectividad el mayor RPD.

Una vez seleccionadas las mejores ecuaciones de calibración NIRs para cada uno de los componentes analizados, se procederá a su comprobación mediante la predicción de un grupo externo de muestras (validación externa). En ese caso, Alomar y Fuchslocher (1998), señalan que se calcula un R^2 (ecuación 2.8) y un error estándar de predicción (EEP) el que se determina con los desvíos de los valores predichos respecto de los valores de referencia. La fórmula del EEP se presenta en la ecuación 2.10.

$$EEP\sqrt{\frac{\sum(y-x)^2}{(n_v-1)}} \quad (2.10)$$

donde: *y* es el valor de referencia; *x* es el valor predicho por NIRs y n_v el número de muestras en el grupo de calibración.

El procedimiento de **validación externa** se basa en los siguientes criterios de acuerdo con Infrasoft International (1992) y Shenk y Westerhaus (1994).

1. El grupo de validación ha de tener como mínimo 9 muestras
2. Se establece como límite para el sesgo el obtenido de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Limite sesgo} = EE_{VC} \times 0.6 \quad (2.11)$$

3. Se define el error estándar de predicción corregido por el sesgo (EEP(C)) como un estimador del error aleatorio o error no explicado por la regresión. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$EEP(C) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_{ct} - y_{pi} - sesgo)^2}{N-1}} \quad (2.12)$$

donde: N = Nº de muestras del grupo de validación, y_{ci}= Valor del constituyente para la muestra *i* y y_{pi}= Valor predicho para la muestra *i.*

El sesgo expresa la diferencia entre los valores obtenidos en laboratorio y los predichos por NIRs. El signo del sesgo indica si los valores obtenidos en laboratorio son mayores o menores a los obtenidos en la predicción NIRs, además indica el promedio de esa diferencia.

Al mismo tiempo, se establece un límite para EEP(C) de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Limite EEP(C)} = EE_{VC} \times 1{,}3 \quad (2.13)$$

4. La pendiente de la regresión entre los valores predichos y los valores del método de referencia debería estar comprendida entre 0.9 y 1.0.
5. La media de los valores predichos y de referencia no debe diferir en más de un 20%.
6. El coeficiente de determinación (R^2) de la regresión establecida entre los valores predichos y los del método de referencia debe ser mayor de 0,6 e idealmente aproximarse a 1.

7. La distancia H de las muestras del grupo de validación debe ser inferior al valor límite de 3.

2.3.10. Medición de la composición química de praderas mediante NIRs

Actualmente, es posible encontrar diversos estudios que dan a conocer resultados de predicción mediante el uso de NIRs para fracciones químicas de forrajes. Gran parte de estos trabajos estiman la composición nutricional de forrajes conservados. Estos análisis divergen en la preparación de la muestra, ya sean secas o frescas. Uno de estos estudios ha estimado la composición química de forrajes, previamente sometidos a secado, tales como: *Dactylis glomerata* L. y *Festuca arundinacea* Schreb. Este trabajo destaca que los mejores resultados de calibración se han obtenido utilizando la totalidad del espectro, con el método SNV-D y con diferenciaciones de primer y segundo orden (Naydenova *et al*., 1998). En tabla 6 se presentan algunos de los resultados obtenidos por varios autores en la predicción de la composición química de praderas considerando varias especies (Cuevas, 2005).

Tabla 6. Predicción de la composición química de praderas mediante NIRs e indicadores estadísticos

FRACCIÓN QUÍMICA	R^2ca	EEC	1-VR	EE_{VC}	R^2p	EEP
Proteína bruta (%)	0.90	1.00	-	-	0.95	0.80
	0.93	-	-	-	-	0.99
	0.98	0.62	-	-	0.96	0.90
Fibra Neutro Detergente (%)	0.88	3.30	-	-	0.90	2.90
	0.92	5.30	-	-	-	-
	0.92	1.56	0.90	1.68	-	-
Fibra Ácido Detergente (%)	0.88	2.00	-	-	0.71	2.20
	0.90	-	-	-	-	1.56
	0.91	1.66	-	-	0.88	1.99
	0.93	1.14	0.91	1.29	-	-
Ceniza Total (%)	0.84	0.80	-	-	0.64	1.20
	0.97	-	0.92	-	-	-
Carbohidratos Solubles (g kg^{-1})	0.79	12.40	-	-	0.85	13.70
Digestibilidad de la Materia Orgánica (%)	0.87	2.60	0.84	2.85	-	-
Energía Metabolizable (Mj kg^{-1})	0.96	0.34	0.87	0.59	-	-

R^2ca y EEC: Coeficiente de determinación y error estándar de calibración; **1-VR y EE_{VC}**: Coeficiente de determinación y error estándar de validación cruzada; **R^2p y EEP**: Coeficiente de determinación y error estándar de predicción.

Alomar y Fuchslocher (1998) señalan que en experimentos realizados en la medición de fracciones químicas de forrajes, no se han logrado predicciones seguras como es el caso de fracciones fibrosas: FND y FAD. Sin embargo, De la Roza *et al.* (1998) y Naydenova *et al.* (1998) mencionan que modelos de calibración NIRs ofrecen una precisión aceptable en la estimación de nutrientes contenidos en la pared celular, así como también de su digestibilidad y valor nutritivo. En la predicción de valores para proteína, Waters y Givens (1992) demostraron que mediante calibraciones NIRs es posible estimar los valores de proteína para forrajes frescos.

En la determinación de minerales, Infrasoft International (1992) señala que al trabajar con la fracción de ceniza, se debe considerar que los minerales no absorben en la región NIR, por lo que sólo pueden ser detectados si forman parte de compuestos orgánicos. Además, al trabajar con muestras de forrajes previamente secadas, la concentración mineral de éstas es relativamente baja.

Flores *et al.* (2000) estimaron mediante NIRs la calidad de gramíneas forrajeras sometidas a distintos periodos de aprovechamiento. Los trabajos de Reeves (1988) demuestran la validez de la técnica NIRs para la determinación rápida de las diferentes fracciones de la lignina, que habitualmente requieren un costoso y tedioso análisis químico. La importancia radica en que estas fracciones pueden explicar mejor el propio contenido en lignina, su digestibilidad, y por tanto, el valor nutritivo del forraje (Reeves, 1985).

2.3.11. Análisis cualitativo NIRs

Los datos obtenidos con un instrumento NIRs pueden ser utilizados tanto para el análisis cuantitativo como cualitativo. El análisis cualitativo NIRs consiste en la comparación de espectros de muestras desconocidas con grupos de espectros NIR de muestras de características conocidas (Mark, 1992). Estas características o atributos, variables categóricas y no continuas, pueden ser, como ejemplo, el origen geográfico, variedad, tipo de producto, tipo de alimentación, tipo de abonado, etc.

Tanto el análisis cuantitativo como el cualitativo NIRs se basan en la obtención de espectros de absorción de un grupo de muestras con características conocidas para después obtener un modelo quimiométrico, es decir, una ecuación de calibración si se realiza un análisis cuantitativo, o un modelo de clasificación, si es cualitativo.

La principal diferencia entre el análisis cualitativo y el cuantitativo es que, en el primer caso, no es necesario disponer de datos químicos adicionales al dato espectroscópico NIR, basta con conocer la categoría o calidad en la que se incluye la muestra.

El análisis cualitativo NIRs consiste en la comparación del espectro de un producto desconocido, con una biblioteca espectral o con un espectro estándar, representativo de un determinado producto y del cual se posee información sobre sus atributos (Garrido *et al.*, 1996). La distancia n-dimensional, entre el espectro del producto desconocido y la media de los espectros contenidos en la biblioteca o la existente con respecto al espectro estándar, permite clasificar cualitativamente el espectro del producto desconocido (Infrasoft International, 1992).

Otro aspecto general dentro del análisis cualitativo a tener en cuenta, es que se necesita tener un perfecto conocimiento de las muestras que se van a analizar, para que las pequeñas diferencias en absorbancia, puedan ser usadas para separar los espectros dentro de diferentes

grupos y poder construir, de esta forma, un modelo de clasificación, que una vez validado, se utilizará para predecir muestras de características desconocidas (Downey, 1999).

Las ventajas que presenta el análisis cualitativo son la posibilidad de realizar una clasificación directa, usando únicamente datos NIR y tener menos dependencia de determinaciones a realizar mediante los métodos de referencia. Como desventaja, hay que tener en cuenta el enfoque conceptual poco conocido y la dependencia de cálculos estadísticos multivariantes también poco conocidos.

2.3.11.1. Tipos de análisis cualitativo

Todos los modelos de clasificación o de reconocimiento de pautas se podrían agrupar en dos grandes categorías: supervisados y no supervisados. Ambos se diferencian en el nivel de información que se disponga *a priori* del agrupamiento existente en los datos (Massart *et al.*, 1997).

Según Queipo y Pintos (2001) la solución para el problema de clasificación puede ser de dos formas:

- **Clasificación no supervisada**: En este caso las propias características espectrales de la muestra son las que, mediante el algoritmo adecuado, permiten que se agrupen las más parecidas. Los grupos que se forman así pueden responder o no a un criterio de clasificación, interesante para el observador. Existen dos ejemplos muy conocidos de este tipo de clasificación, como son el análisis "*Cluster*" o de aglomerados y "los mapas organizativos" (Queipo y Pintos 2001).
- **Clasificación supervisada**: En este caso es el observador externo el que establece a qué grupo corresponde cada muestra. Los distintos algoritmos intentan encontrar una función matemática que responda a lo que se plantea. Como ejemplos de este tipo de clasificación existen el método SIMCA (Dago *et al*., 2008) y el análisis lineal discriminante.

A diferencia de los métodos no supervisados, en los supervisados sí se dispone de información acerca de los grupos o categorías existentes en el grupo de muestras, y son los utilizados normalmente en el análisis cualitativo. El principal objetivo de este tipo de método es el de generar diferentes reglas o modelos de clasificación para un número determinado de clases o grupos de muestras analizadas (Downey, 1996; Naes *et al.*, 2002).

La variante más extendida de análisis cualitativo consiste en comparar el espectro de un producto con una librería espectral o con un espectro estándar, representativo de un determinado producto, del cual se posee información de sus atributos cualitativos (color, procedencia

geográfica, variedad, etc.). Por lo tanto, es necesaria una librería espectral representativa del producto en cuestión, para el cual el espectro de un material de comprobación pueda ser comparado, con el fin de establecer su calidad o autenticidad.

Dentro del análisis cualitativo, también se puede incluir la interpretación espectral visual donde se estudian los picos de absorbancia de los espectros, localizándose las bandas de absorción de grupos funcionales, detección de zonas de máxima diferencia entre varios productos, etc.

Un paso preliminar al análisis discriminante suele ser un Análisis de Componentes Principales, mediante el cual se reducen los datos de longitudes de onda del espectro original, a unos pocos nuevos ejes o dimensiones. El espectro de cada muestra puede ser representado como un punto con respecto a estos nuevos ejes (Downey, 1999).

La presencia de muestras anómalas es también de gran importancia en el análisis cualitativo, debido a la necesidad de constituir el grupo de aprendizaje, a partir de muestras de características muy controladas y definidas. Las herramientas de detección de anómalos son similares a las empleadas en el análisis cuantitativo. En general, muestras detectadas como de elevadas diferencias al resto en cuanto a los valores de distancia de Mahalanobis y/o varianza residual, tanto durante el desarrollo del modelo como en su posterior evaluación con muestras externas han de ser consideradas anómalas (Mark, 1992; Naes *et al.*, 2002).

Los principales métodos que se utilizan para abordar el estudio de estos modelos discriminantes son: Análisis de conglomerados (*Cluster Analysis*), Análisis Discriminante Factorial, Análisis de variables Canónicas, Análisis de los vecinos más cercanos (*K-nearest Neighbours Analysis*), Análisis de Modelado SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), Análisis Discriminante mediante ecuaciones de regresión de términos PLS, Análisis Discriminante mediante Redes Neuronales, etc. (Very, 2006).

A continuación, se describen algunos métodos de clasificación supervisada y no supervisada.

- Análisis "*Cluster*": Es un método estadístico multivariante de clasificación automática de datos, que intenta situar los casos en grupos homogéneos, conglomerados o *Cluster*. Los grupos no son anteriormente conocidos y vienen sugeridos por la esencia de los datos, de modo que los individuos con características similares se asignan a un mismo grupo (Carrasco y Hernán, 1993).

  Según Bisquerra (1989), cualquier análisis *cluster* está precedido por la toma de tres tipos de decisiones:

  - Selección de las variables relevantes para identificar los grupos.

- Elección de la medida de proximidad entre los individuos.
- Elección del criterio para agrupar individuos en conglomerados.

Las variables escogidas deben ser relevantes para identificar los grupos dependiendo del objetivo que se pretenda lograr con el estudio. Aplicando este criterio a la espectroscopía NIRs nos encontramos con el problema intrínseco de la colinealidad y presencia de información redundante, por lo que la realización de un análisis de componentes principales permite reducir significativamente el número de variables originales (Mallo, 1985; Martens y Naes, 1987). Así, cada muestra queda definida por sus cargas factoriales en cada uno de los componentes principales retenidos tras el análisis, siendo estas cargas las utilizadas para definir el perfil de cada caso.

La medida de proximidad entre los individuos es un problema de medida de distancias y según Mezzich y Solomon (1990) o SPSS (2012), existen numerosas alternativas:

- Distancia euclídea al cuadrado: La distancia entre dos *ítems x* e *y* es la suma de las diferencias elevadas al cuadrado entre los valores de ambos *ítems.* Normalmente se la conoce por su abreviatura en inglés SEUCLID y es la que se utiliza por defecto en la mayoría de los programas, además de normalizar los datos en alguna medida.

$$SEUCLID\ (x,y) = \Sigma_i(x_i-y_i)^2$$

- Distancia euclídea: La distancia entre dos *ítems x* e *y* es la raíz cuadrada de la suma de las diferencias elevadas al cuadrado entre los valores de ambos *ítems*. Normalmente se conoce por su abreviatura en inglés EUCLID.

$$EUCLID\ (x,y) = \sqrt{\Sigma_i(x_i-y_i)^2}$$

- Distancia *City* Block *o Manhatan:* La distancia entre dos ítems es la suma de las diferencias absolutas entre los valores de los *ítems*.

$$BLOCK\ (x,y) = \Sigma_i \left| xi - yi \right|$$

- Correlación de Pearson: Es un patrón de similaridad.

$$\text{CORRELACION } (x,y) = \Sigma_i(Z_{xi}Z_{yi})/N$$

Z_{xi} es la puntuación Z de x (estandarizada) para el iésimo caso o variable

N es el número de casos o variables.

- Correlación absoluta de Pearson, similar a la anterior pero trabajando con el valor absoluto de r.
- Correlación de rangos de Spearman: mide la correlación entre dos secuencias de valores. Las diferencias en el rango de las dos secuencias se calculan para cada posición, i. Luego se calcula la distancia entre las secuencias X = (X1, X2, etc.) e Y = (Y1, Y2, etc.), dando un valor de rangos entre +1 y -1.
- Distancia de Kendall (Tau): se trata de una medida de distancias no paramétrica útil para identificar muestras muy distintas dentro de un conjunto de datos. Responde a la expresión:

$$\tau = \frac{n_c - n_d}{\frac{1}{2}n(n-1)}$$

donde:

n_c = número de pares de rangos concordantes

n_d = número de pares de rangos disconcordantes

- Distancia métrica de Chebychev: La distancia entre dos *ítems* es el valor absoluto máximo de la diferencia entre los valores de los *ítems*. Resulta muy sensible a la presencia de valores extremos.

$$\text{CHEBYCHEV } (x,y) = \max_i \left| xi - yi \right|$$

- Distancia de Bray-Curtis: también conocida como disimilitud de Bray-Curtis o distancia de Sorensen. Se utiliza habitualmente en estudios de biología, ecología y oceanografía, para cuantificar las diferencias entre poblaciones. Responde a la expresión:

$$QS = \frac{2C}{A+B} = \frac{2n(A \cap B)}{n(A)+n(B)}$$

donde A y B son el número de especies en las muestras A y B, siendo C el número total de especies encontradas.

En cuanto al criterio para agrupar individuos hay varias posibilidades (Carrasco y Hernán (1993):

- *Enlace simple*: Considera la distancia entre dos individuos o grupos la que responde al concepto de "vecino más cercano". Desde un punto de vista teórico es un buen criterio, aunque en la práctica no es tan eficiente, porque tiende a encadenar individuos y luego grupos que están próximos, aunque sean diferentes. Tiene especialmente en cuenta la información aportada por individuos extremos que tienden a distorsionar la agrupación, de modo que se obtienen grupos poco compactos.
- *Enlace completo*: Considera la distancia entre dos individuos o grupos la que atiende al concepto de "vecino más lejano". Sigue como criterio los casos más alejados entre los individuos o grupos que en algún momento del análisis puedan existir. Tiene tendencia a producir grupos de igual diámetro.
- *Enlace promedio*: Considera la distancia entre dos individuos o grupos la distancia media entre todos los pares posibles de casos. Tiende a producir grupos más compactos.
- *Enlace centroide*: Considera la distancia entre dos individuos o grupos la que existe entre sus "centros de gravedad" (centroides o "medias multivariantes"), que vienen definidos por las medias aritméticas de las variables de los individuos que componen los grupos (también se conoce como distancia de Mahalanobis, en honor al matemático indio que la elaboró). Es el método más fuerte ante la presencia de casos atípicos.
- *Enlace por mínima varianza (Ward):* Considera la distancia entre dos individuos o grupos el menor incremento de varianza residual global. De manera que si existe un determinado número de individuos o grupos se prueban todas las parejas posibles y se calcula la varianza residual global con cada pareja unida y todos los demás grupos. La pareja de grupos que produce el mínimo incremento de esta varianza es la elegida para formar un nuevo nivel de agrupamiento. Este método tiende a formar grupos esféricos de tamaño semejante y utiliza más información sobre el contenido de los grupos que otros métodos. Es el más eficaz junto al enlace promedio.

Los resultados de un análisis *cluster* pueden representarse gráficamente mediante un "dendrograma" o árbol lógico en el que se puede ver a qué grupo concreto pertenece cada caso y de qué manera se forman los diferentes grupos (Bisquerra, 1989).

- Clasificación SIMCA: SIMCA (*Soft Independt Modelling of Class Analogies*), Sistema de Clasificación Supervisada desarrollado por Svante Wold en 1976. Es un método de clasificación supervisada que se basa en la analogía de las muestras que pertenecen a una misma clase, para lo que calcula las puntuaciones (*scores*) de las muestras que pertenecen a cada clase, mediante un análisis de componentes principales, establece los límites de cada clase con un 95% de fiabilidad (Ferreira *et al*., 1999).

  Una vez que se establecen los correspondientes espacios para los grupos, las nuevas muestras estarán más o menos próximas a dichos espacios, y se incluirán en el grupo más cercano (Mark, 2008; Vanden y Hubert, 2005). No hay garantía de resultado unívoco, de manera que, en función de la distancia real entre los distintos grupos y de la distancia entre una nueva muestra y los distintos grupos, la nueva muestra puede clasificarse como perteneciente a más de un grupo (Brereton 2009).

- Análisis Discriminante: Tal y como hemos visto previamente, el análisis discriminante se encuadra dentro de las técnicas multivariantes destinadas a clasificar y, posteriormente, a predecir. Se trata de una herramienta que permite asignar o clasificar nuevos individuos dentro de grupos previamente reconocidos o definidos. El análisis parte de una tabla de datos de *n* individuos en los que se han medido *p* variables cuantitativas independientes o "explicativas" que definen el perfil de cada uno de ellos, además existe una variable cualitativa adicional que sirve de referencia para indicar a qué grupo, de un mínimo de 2, pertenece cada individuo.
  A partir de esta tabla se obtiene un modelo matemático discriminante contra el que será contrastado el perfil de un nuevo individuo cuyo grupo se desconoce para, en función de un resultado numérico, ser asignado al grupo más probable (Carrasco y Hernán, 1993). Lógicamente, cuanto mejor sea la información de partida, más fiable será el resultado de las posteriores asignaciones.
  La base matemática es conseguir, a partir de las variables explicativas o independientes, funciones lineales con capacidad para clasificar otros individuos en los grupos correspondientes (Bisquerra, 1989).
  En el ámbito NIRs esta técnica de clasificación fue propuesta inicialmente por Mark y Tunnell (1985), utilizando distancias de Mahalanobis, si bien utilizando un número

limitado de longitudes de onda, probablemente por las limitaciones computacionales existentes en aquel momento.

Posteriormente, se desarrolló el análisis discriminante basado en mínimos cuadrados parciales PLS-DA. Es un análisis de regresión multivariante PLS convencional, en el que se trabaja con los espectros de las muestras y como analitos a predecir se utilizan unas variables *dummies* o *tontas* (Brereton, 2009). De esta manera, durante la fase de calibración, los casos pertenecientes al grupo tienen asignado un valor 1 y el resto un valor 0, construyéndose un modelo de regresión. Deben construirse tantos modelos como grupos tengamos (Camo, 2006).

La clasificación de nuevos casos se produce "prediciendo" su valor, si el valor es cercano a 1, se asume que el caso pertenece al grupo en cuestión, si es próximo a 0, se asume la no pertenencia. Lógicamente, hay que probar cada caso con todos los modelos existentes para poder efectuar una asignación con seguridad. Todo ello en conjunción con el margen de error (RMSEP) proporcionado durante la elaboración del modelo (Esteve *et al.,* 2012).

La validación o evaluación de un modelo cualitativo es tan importante en análisis cualitativo como en las aplicaciones cuantitativas. En general, el estadístico a emplear en cualquier método de clasificación es el error, entendido éste como el porcentaje de muestras clasificadas incorrectamente. Este error de clasificación puede estimarse, tanto mediante un proceso de validación cruzada como mediante un conjunto de muestras que no hayan intervenido en el desarrollo del modelo, entendiendo que mientras menor sea su valor, mayor capacidad de clasificación presentará el modelo (Naes *et al.,* 2002).

2.3.11.2. Utilización del análisis cualitativo

La utilización de la técnica NIRs en el análisis cualitativo de materiales tiene un uso aún limitado, lo que se traduce en una escasez de trabajos de trabajos científicos publicados.

Con todo, en el ámbito de la alimentación animal se encuentran algunos trabajos relacionados, como por ejemplo, NIRs como tecnología de apoyo a la alimentación animal (Garrido *et al*., 1996), desarrollado en el curso de especialización FEDNA por la Universidad de Córdoba, donde tratan de deliberar el papel de la técnica NIRs para implantar un servicio integral de alimentación animal de forma ágil, económica y que abarque un rango amplio de elementos a evaluar en la explotación, como agua, suelo, tejidos vegetales y animales, etc.

Garrido (1997) estudió las aplicaciones actuales y futuras del NIRs en la industria de los piensos, cuyo objetivo era mostrar la contribución de esta técnica en el control de calidad en la industria de la alimentación animal.

La tecnología NIRs sigue avanzando, por ejemplo, con aplicaciones en producción animal. Garrido *et al*. (2003) han desarrollado un nuevo curso de especialización FEDNA, donde se ponían de manifiesto los avances de la tecnología NIRs en este ámbito. Nuevos aparatos, más asequibles, nuevas formas de analizar las muestras, etc. con sus ventajas e inconvenientes.

Cozzolino (2002) asegura que la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano es un método rápido y exacto de evaluar la composición de cereales y forrajes destinados a la alimentación animal. Este autor también identifica la presencia de harinas de origen animal en harinas de origen vegetal, obteniendo buenos resultados.

Por su parte, Dunea y Motca (2007) realizaron mediciones NIRs en diferentes etapas del desarrollo del trébol rojo con el objetivo de obtener un análisis detallado de la presencia de trébol en un pasto natural, obteniendo los límites de estabilidad y sostenibilidad de un sistema intensivo en la pradera.

Una aplicación interesante desde el punto de vista práctico es la desarrollada por Dale *et al*. (2013), que utilizaron el análisis cualitativo (PLS-DA) con el objetivo de distinguir distintas especies de plantas tóxicas en pastos, obteniendo buenos resultados.

Fuera ya del campo de la agronomía y de la producción animal, Veras *et al*. (2010), también obtuvieron buenos resultados al clasificar biodiesel utilizando PCA y el método SIMCA. Esta tecnología ha servido para discriminar, con la misma capacidad que un análisis químico, diferentes muestras de queso procedente del norte de Italia, en Asiago (Ottavian *et al*., 2012). En la industria farmacéutica Cebeci *et al*. (2013), mediante el análisis cualitativo NIRs, clasificaron diversos materiales farmacéuticos con éxito.

BIBLIOGRAFÍA

ALMOGERA J. (2007) Modelo dehesa sobre las relaciones pastizal-encinar-ganado. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid.

ALOMAR D. Y 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.

ANDUEZA D. (2000) Producción de materia seca y valor nutritivo de cereales de invierno en zonas semiáridas. Tesis doctoral. Departamento de Producción Animal. Universidad de Lleida.

BARAHONA R. Y SÁNCHEZ S. (2005) Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Revista corpoica. 6(1).

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

BATTEN G. (1998) An appreciation of the contribution of NIR to agriculture. <www.nirpublications.com/j6abs.html> (15 mar. 2001).

BEJAR, M. Y AMMAR, K. (2007) Triticale, una alternativa para el norte de México.

BISQUERRA R. (1989) Introducción conceptual al análisis multivariable. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, LISREL Y SPAD. Promociones y Publicaciones Universitarias, Barcelona.

BONACHELA S., ORGAZ F., FEDERES E. (1995) Winter cereals grown for grain and for the dual purpose of forage plus grain. Field Crops Res. 44, 1-11.

BRERETON R. (2009) Chemometrics for pattern recognition. John Willey & Sons, Ltd. Chichester, United Kingdom.

BRUINENBERG M. H., VALK H., KOREVAAR H. Y STRUIK P.C. (2000) Factors affecting digestibility of temperate forages from semi natural grasslands: a review. Grass and Forage Science, 57, 292–301.

BUXTON D.R. (1996) Quality-related characteristics of forage as influenced by plant environment and agronomic factors. Animal Feed Science Technology, 60, 37-49.

BUXTON, D.R. Y REDFEARN D.D. (1997) Plant limitations to fiber digestion and utilization. Conference: New Developments in Forage Science Contributing to Enhanced Fiber Utilization by Ruminants. Journal of Nutrition, 127, 814–818.

BUYOLO T. Y ESCUDERO J.C. (2002) Variaciones estructurales y de composición en el pastizal de dehesa tras la utilización por ganadería vacuna. Producción de pastos forrajes y céspedes. Actas de la XLII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. SEEP. Lleida, Spain. pp. 177-182.

CABALLERO R., GOICOECHEA E.L., HERNAIZ P.J., (1995) Forage yields and quality of common vetch and oat sown at varying seeding ratios and seeding rates of common vetch. Field Crops Res. 41, 135–140.

CAMO (2006) The Unscrambler methods. Camo Software AS. Oslo, Norway

CAMPO L., CASTRO P., MORENO J. (2007) Calibración NIRs para estimar la digestibilidad de la materia orgánica de la planta entera de maíz en híbridos seleccionados para forraje. En: Neiker (ed) Los sistemas forrajeros: entre la producción y el paisaje, pp. 461-467. Vitoria-Gasteiz, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP).

CARÁMBULA M. (1996) Pasturas naturales mejoradas. Editorial Hemisferio Sur. Uruguay.

CARNIDE V., MASCARENHAS-FERREIRA A. Y GUEDES-PINTO H. (1988) A comparative study of triticale lines as a forage crop. Tagungsbet. Akad. Landwirtschaftswiss. DDR, 266, 591-604

CARRASCO J. Y HERNÁN M. (1993). Estadística multivariante. Ciencia 3, Madrid.

CASTRO P., FLORES G, GONZALEZ-ARRAEZ A.,CASTRO, J. Y FERNANDEZ-LORENZO, B. (2005) Nutritive quality of silages by conventional laboratory methods and near infrared reflectance spectroscopy. En: Proc. Of the XXth Internacional Grassland Congress. F.P. O'Mara et al. (Eds.) The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 261.

CEBECI D., KWOK K., WANG P., TAYLOR L. Y BEN-AMOTZ D. (2013) Rapid classification of pharmaceutical ingredients with Raman spectroscopy using compressive detection strategy with PLS-DA multivariate filters. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 80, 63-68.

CHAMORRO D.R., BARAHONA R., ARREAZA L.C., CONDE A. Y CUESTA A. (2002) Manejo de la proteína en la Producción de Ganado Bovino. Bogota, Neiva y Cartagena. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA; Agencia Colombiana de Cooperación Internacional ACCI, Ministerio De Agricultura y Desarrollo Rural, Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas UDCA. Septiembre 23 al 30 del 2002.

CHERNEY J.H., CHERNEY D.J.R., AKIN D.E. Y AXTELL, J.D. (1991) Potential of mid-rib, low-lignin mutants for improving forage quality. Advances in Agronomy, 46, 157–198.

CHESSON A., GORDON A. H. Y LOMAX J. A. (1983) Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen organisms. Journal of the Science of Food and Agriculture. 34, 1330-1340.

CIAVARELLA S.; BATTEN D. Y BLAKENEY A. (1998) Measuring potassium in plant tissues using near infrared spectroscopy. J. Near Infrared Spectroscopy. 6, 63-66.

CIMMYT (1967) El Batán. México. En http://www.engomix.com

CLARK D., MAYLAND H. Y LAMB R. (1987) Mineral analysis of forage with near infrared reflectance spectroscopy. Agronomy J. 79, 485-490.

COLLINS N.E., WILLIAMS T.H., Y KEMBLE L.J. (1981) Measured machine energy requirements for grain production systems. ASAE Publ. 4(81), 407-411.

COVENTRY G. (1988) The development and application of NIR with particular reference to the food industry. Food Science and Technology Today. 2(2), 130-131.

COZZOLINO D. (2002) Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. Agrociencia, 2, 25-32.

CRUZ V., RIVERA A.Mª. Y LLERA F. (2011) El triticale de doble aptitud: un nuevo cultivo forrajero para la ganadería extensiva. Tierras de Castilla y León, 180, 62-67.

CUEVAS J.M. (2005) Calibración de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRs) para medición de la composición química de praderas (muestras secas) en la Décima Región. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía. Universidad austral de chile. Facultad de ciencias agrarias. Escuela de agronomía. Valdivia. Chile.

CUSICANQUI J. Y LAUER J.G. (1999) Plant density and hybrid influence corn forage yield and quality. Agronomy J. 91, 911-915.

DAGO A., CAVADO A., FERNÁNDEZ R. Y LINCHENAT E. (2008) Desarrollo de un modelo SIMCA para la clasificación de kerosinas mediante el empleo de la espectroscopía infrarroja. Quimica Nova, 31(6), 1573-1576.

DALE L., THEWIS A., BOUDRY C., ROTA R., ABBAS F., DARDENNE P., BAETEN V., PFISTER J. Y FERNÁNDEZ J.A. (2013) Discrimination of grassland species and their classification families by laboratory scale NIR hyperspectral imagin: Preliminary results. Talanta. 116, 149-154.

DARDENNE P., SINNAEVE G. Y BAETEN V. (2000) Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy. J. Near Infrared Spectroscopy, 8, 229–237.

DAVIES A. Y GRANT A. (1987) Review: Near infra-red analysis of food. Int. Journal Food Science. Technology, 22, 191-207.

DE LA ROZA B. Y MARTÍNEZ A. (1994) Alimentos para el ganado. Parámetros de calidad y normas de recogida de muestras para análisis. Serie informes técnicos, 2(94). Principado de Asturias, Consejería de Medio Rural y Pesca.

DE LA ROZA B., MARTINEZ A. Y SANTOS B. (1998) The estimation of crude protein and dry matter degradability of maize and grass silages by near infrared spectroscopy. J. Near Infrared Spectroscopy. 6, 145-151.

DEAVILLE E. Y FLINN P. (2000) Near-infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. En: Givens, D., Owen, E., Axford, R. y Omed, H. (eds). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. pp. 301-320. CABI. Wallingford, UK.

DEL POZO P. (1998) Análisis del crecimiento del pasto estrella (Cynodon nlemfuensis) bajo condiciones de corte y pastoreo. Tesis Doctoral. Cs. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. pp. 105

DEL POZO P., HERRERA R. Y GARCÍA, M. (2002) Dinámica de los contenidos de carbohidratos y proteína bruta en el pasto estrella (Cynodon nlemfuensis) con aplicación de nitrógeno y sin ella. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 36(3), 275-280

DELGADO E. (2003) Caracterización cuantitativa y cualitativa de lomo curado de cerdo ibérico, mediante análisis espectral en el infrarrojo cercano (NIRs). Trabajo profesional fin de carrera. E.T.S de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Universidad de Córdoba. España.

DELOGU G., FACCINI N., FACCIOLI P., REGGIANI F., LENDINI M., BERNARDO N. Y ODOARDI M. (2002) Dry matter yield and quality evaluation at two phenological stages of triticale grown in the Po Valley and Sardinia, Italy. Field Crop Res. 74, 207-215.

DI MARCO O. (2011) Estimación de calidad de los forrajes. Producir XXI., 20(240):24-30.

DOWNEY G. (1996) Authentication of food and food ingredients by near infrared spectroscopy. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 4: 47-61.

DOWNEY G. (1999) Near Infrared Spectroscopy in the food industry: a tool for quality management. Research Report Nº14. The National Food Centre.

DUNEA D. Y MOTCA G. H. (2007) Forage Quality Assessments of red clover (Trifolium pratense L.) through Near Infrared Spectroscopy. Cría de la ciencia y la biotecnología 40 (1). Timisoara. Rumanía.

DUNHAM J.R. (1998) Relative feed value measures forage quality. Forage Facts, 41.

DYSON C. (2006) Triticale grain for feed - Nutritional information. Alberta Government Agriculture and Food.

ESCRIBANO M. Y PULIDO F. (1998) La dehesa en Extremadura. Estructura económica y recursos naturales. Colección Monografías. SGT-Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Junta de Extremadura.

ESCRIBANO M., RODRÍGUEZ DE LEDESMA A., MESIAS F.J., PULIDO F. (2001) Niveles de cargas ganaderas en la dehesa extremeña. Archivos de Zootecnia. 51, 315-326.

ESTEVE L., ELLIS D., DUVICK S., COGGI A. S., HURBURGH C. R., GARDNER C. (2012) Feasibility of near infrared spectroscopy for analyzing corn kernel damage and viability of soybean and corn kernels. Journal of Cereal Science, 55,160-165.

FAO (2010) http://faostat.fao.org/default.aspx?alias=faostat&lang=es

FAUGHEY G. Y SHARMA H. (2000) A preliminary evaluation of near infrared spectroscopy for assessing physical and chemical characteristics of flax fiber. J. Near Infrared Spectroscopy 8, 61-69.

FERNÁNDEZ R., CHÁVEZ M., VIRGÜEZ D. Y GARCÍA M. (1991) Efecto de la frecuencia de corte sobre el rendimiento y valor nutritivo del pasto estrella (Cynodon nlemfuensis) en la unidad agroecologica 3e 144 del valle de aroa. Zootecnia tropical. Zootecnia Trop. 9(2), 165-179.

FERREIRA M., ANTUNES A., MELGO M. Y VOLPE P. (1999) Quimiometria I: calibraçao multivariada, um tutorial. Quimica Nova, 22(5), 724-731.

FERRO J.M. Y LLERA F. (2011) Abonos verdes: cultivos para una agricultura sostenible. Agricultura de conservación, nº 622-626.

FLORES M., ALOMAR D. Y BALOCCHI O. (2000) Efecto del período de rezago sobre la calidad de cinco gramíneas forrajeras y su predicción por NIRs. Agro Sur 28(1), 41-55.

FRANCIA E., PECCHIONI N., LI DESTRI NICOSIA O., PAOLETTA G., TAIBI L., FRANCO V., ODOARDI M., STANCA A., DELOGU G. (2006) Dual-purpose barley and oat in a Mediterranean environment. Field Crops Res. 99, 158-166.

FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL (FEDNA) (2004) Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. S. Calsamiglia, A. Ferre, A. Bach. Madrid, pp 70.

GARCIA DEL MORAL L.F., BOUJENNA A., YANEZ J.A. Y RAMOS J.M. (1995) Forga production, grain yield, and protein content in dual-purpose triticale grown for both grain and forage. Agroomy. J. 87, 902-908.

GARRIDO A., GÓMEZ, J. GUERRERO Y FERNÁNDEZ V. (1996) NIRs: una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. En: Avances en Nutrición y Alimentación animal. Pp. 275-303. P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos (Coords). Ed. Fira de Barcelona. Barcelona. España.

GARRIDO A. (1997) Current and future applications of NIRs technology in the feed industry. Universidad de Córdoba. CIHEAM-Options Mediterraneennes.

GARRIDO A., PÉREZ M., GUERRERO J., GÓMEZ A. (2003) Avances en la utilización de la tecnología NIRs. Aplicaciones en producción animal. XIX Curso de especialización FEDNA, Madrid. Universidad Politécnica de Córdoba.

GIL A., LLERA F., GARCÍA A.M. Y RUFO, S. (2009) Nuevas oportunidades de alimentación en la dehesa: el triticale. La agricultura y la ganadería extremeñas, informe 2008. pp 173.

GIL A., LLERA F. Y ESPEJO M. (2011) Utilización de triticale de doble aptitud para la alimentación del ganado bovino. Ganadería, 72, 54-59.

GIVENS D., DE BOEVER, J. Y DEAVILLE, E. (1997) The principles, practices and some future infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. Nutrition Research Reviews. 10, 83-114.

GONZÁLEZ F., PEÑA A., NÚÑEZ G. Y JIMÉNEZ C. (2005) Efecto de la densidad y altura de corte en el rendimiento y calidad del forraje de maíz. Revista Fitotecnia Mexicana. 28(4), 393-397.

GONZALO J., POBLACIONES M.J., RODRIGO S. Y OLEA L. (2012) Influencia de los índices térmicos en la producción de cerdos ibéricos de "montanera" en la provincia de Badajoz (Extremadura, España). Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extinción. Sociedad Española para el estudio de los pastos (SEEP). Pp. 305-312.

GUERRERO A. (1999) Cultivos Herbáceos Extensivos. Editorial Mundi Prensa.

HALL J., SEAY W., BAKER S. (2011) Essential Nutrients, Feed Classification and Nutrient Content of Feeds. Virginia Cooperative Extension.

HARGREAVES A., HILL J. Y LEAVER, J.D. (2009) Effect of stage of growth on the chemical composition, nutritive value and ensilability of whole-crop barley. Animal Feed Science and Technology. 152, 50-61.

HECHT E. Y ZAJAC A. (1986) Optica. Traducido por Malacara, D. 2 th. ed. Delaware, Estados Unidos. Iberoamericana. pp. 586.

HINDLE P. (1999) The last millennium: a brief history of science leading to current infrared technology. En: Davies, A. y Giangiacomo, R. (ed) Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9th International Conference. pp. 1-6. Verona, Italia.

IIYAMA K., LAM T.B.T., MEIKLE P.J., RHODES D. Y STONE B.A. (1993) Cell wall biosynthesis and its regulation. En "Forage Cell Wall Structure and Digestibility" ed. Jung, H.J. American Soc. Animal Sci. pp.621-683. New York.

INFRASOFT INTERNATIONAL. (1992) NIRs 3.0: Routine Operation, Calibration and Network System Management Software for Near Infrared Instruments. ISI. Estados Unidos, Silver Spring. pp 328.

INIA, (2001) Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Uruguay. <www.Inia.org.uy/DDRR/LaEstanzuela/Laboratorios/nirs/intronir.htm> (5 agos. 2001).

INRA (1978). Alimentation des Ruminants. Ed. INRA Publications (Route de Saint-Cyr), 78000 Versalles.

INRA (2007). Alimentation de bovinos, ovinos y caprinos. Necesidades de los animales. Valores de los Alimentos. Tablas Inra 2007. Acribia, Zaragoza.

JERANYAMA P. Y GARCIA A. (2004) Understanding Relative Feed Value (RFV) and Relative Forage Quality (RFQ). Extension Extra, pp, 8149.

JUÁREZ J. Y BOLAÑOS E.D. (2007) Las curvas de dilución de la proteína como alternativa para la evaluación de pastos tropicales. Redalyc, 23(1), 81-90.

JUNG H.G., Y VOGEL K.P. (1986) Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. J. Anim. Sci. 62, 1703.

JUNG H.G. Y DEETZ. D.A. (1993) Cell wall lignifications and degradability. En: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (ed) Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Pp, 315-339. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.

JUNG H.G. Y ALLEN M. S. (1995) Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. Journal of Animal Science 73, 2774–2790.

JUNG H.G. (1997) Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. Conference: New Developments in Forage Science Contributing to Enhanced Fiber Utilization by Ruminants. Journal of Nutrition. 127, 810 - 813.

KILCHER M.R. (1982) Effect of cattle grazing on subsequent grain yield of fall rye (Secale cereale L.) in southwestern Saskatchewan. Can. J. Plant Sci. 62, 795-796.

KOZLOSKI G.V., PEROTTONI J. Y SÁNCHEZ L.M.B. (2005) Influence of regrowth age on the nutritive value of dwarf elephant grass hay (Pennisetum purpureum Schum. Cv. Mott) consumed by lambs. Animal Feed Science and Technology, 119, 1-11.

KRAIEM K., MAJDOUB A., BEN ABBES S. Y MOUJAHE N. (1997) Effects of the level of supplementation with concentrate on the nutritive value utilization of oats hay cut at three maturity stages. Livestock Production Science. 47, 175-184.

KUBIENA W.I. (1953) Claves sistemáticas de suelos. CSIC. Madrid.

LANGEVELE F.V., DRESCHER M., HELTKÖNI, I.M.A. Y PRINS, H.H.T. (2008) Instantaneus intake rate if herbivoresas function of forage quality and mass: Effects on facilitative and competitive interactions. Ecologigal Modelling. 213, 273-284

LEMAIRE G. Y SALETTE J. (1984) Relationship between growth and nitrogen uptake in a pure grass stand. 1. Environmental effects, Agronomie 4 (5), 423-430.

LEMAIRE G. (1995) Ecophysiological approaches to intercropping. En: Ecophysiology of tropical intercropping. Ed. H. Sinoque y P. Cruz. INRA. Francia. pp, 9.

LLERA F. (1997) Production of double aptitude Triticale (forage and grain) in the Ecossystem of the Dehesa in Extremadura. Triticale Topics. 15, 2-5.

LLERA F., PÉREZ F. Y AYUSO A. (1997) Fertilización de triticale para forraje y grano. Vida Rural, 42, 42-43.

LLERA, F., CARRASCO J.M., PÉREZ F., AYUSO A. (1999) Selección y producciones del triticale de doble aptitud (forraje y grano) en condiciones mediterráneas. Jornadas Ibéricas sobre Triticale. (ed) Junta de Extremadura, pp 68-76. Extremadura. España: Junta de Extremadura.

LLERA F., (2002) Triticale: El cereal del futuro. Nuevas perspectivas y variedades: grano, forraje y doble aptitud (H.D. nº 6/02).(ed) Secretaría General de la Junta de Extremadura, pp 56. Badajoz: España.

LLERA F., CRUZ V., RIVERA A.Mª. Y RODRIGUEZ, F., (2011a) Capacidad de rebrote del triticale de doble aptitud (forraje y grano): Influencia de la densidad de siembra y la dosis de nitrógeno. En: Pastos, paisajes culturales entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI. (ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 347-352. España.

LLERA F., RIVERA A. Mª., CRUZ V. Y RODRIGUEZ, F. (2011b) Estudio de la tasa de ahijamiento y el índice de supervivencia del triticale de doble aptitud (forraje y grano). En: Pastos, paisajes culturales entre entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI.(ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 353-359. España.

LLERA F. Y CRUZ, V. (2012) El triticale: una interesante alternativa forrajera. Agricultura, 955, 656-659.

LLERA F., DE SANTIAGO A., RIVERA A.Mª., GALLEGO R.A. Y CRUZ, V. (2012) Curvas de dilución de la proteína en un triticale de doble aptitud: influencia de la densidad de siembra, la dosis de nitrógeno y el número de cortes. Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extinción. Sociedad Española para el estudio de los pastos (SEEP). pp. 417-423.

LÓPEZ M. (1997) Estudio del uso de la técnica NIR para la valoración química de piensos compuestos. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Cáceres.

LORENZ K., F. REUTER Y C. SIZER. (1974) The mineral composition of triticales and triticale milling fractions by X-ray fluorescence and atomic absorption. Cereal Chemistry. 51, 534.

M.A.P.A. (1990) http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estad-publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx

MALLO F. (1985) Análisis de componentes principales y técnicas factoriales asociadas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de León, León.

MARINO M.A., MAZZANTI A., ASSUERO S.G., GASTAL F., ECHEVERRIA H.E. Y ANDRADE F. (2004) Nitrogen dilution curves and nitrogen use efficiency during winter-spring growth of annual ryegrass. Agronomy Journal, 96(3), 601-607.

MARINETTO J. (1992) Influencia del corte de la parte aérea (pastoreo simulado) en la producción posterior de triticale. Tesis Doctoral. ETSIA de la Universidad de Córdoba.

MARK H. (1992) Qualitative Discriminant Analysis. En: "Handbook of Near Infrared Analysis." pp.329-363. Ed. Donald A. Burns y Emil W. Ciurczak. Marcel Dekker, Inc. New York.

MARK H. (2008) Qualitative discriminant analysis. In: Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd Ed.) Ed: D.A. Burns and E.W. Ciurczak. CRC Press, Boca Raton, U.S.A.

MARTENS H. Y NAES T. (1987) Multivariate Calibration by Data Compression. In: Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Ed. P. Willliams & K. Norris. American Association of Cereal Chemits, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

MARK H. Y TUNNELL D. (1985) Quantitative near-infrared reflectance analysis using Mahalanobis distances. Anal. Chem., 57, 1449-1456.

MARTINEZ-OCHOA B., GARCÍA DEL MORAL L.F., MARINETTO J. Y FERNANDEZ. A. (1989) Producción de grano en triticale pastoreado. Agricultura Mediterranea, 119, 109-118.

MASSART D.L., VANDEGINSTE B., BUYDENS L.M., DE JONG S.P., LEWI J. Y SMEYERS-VERBEKE S. (1997) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. En B.G.M. Vandeginste and S.C. rutan. Pp 1-20.

MEZZICH J. Y SOLOMON H. (1990). Taxonomy and behavioral science. Academic Press. London.

MGAP-IPA (1995) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca Uruguay, instituto Plan Agropecuario .

MONTGOMERY, D. y RUNGER, G. 1996. Probabilidad y Estadística aplicada a la ingeniería. Traducido por Urbina, E. México, D.F. Mc Graw-Hill. 895 p.

MOORE K.J. Y HATFIELD R.D. (1994) Carbohydrates and forage quality. En: Forage Quality, Evaluation, and Utilization. (eds) Fahey, G. C., Jr., Collins, M. C., Mertens, D. R. & Moser, L. E. pp. 229–280. American Society of Agronomy, Madison, WI.

MOORE J., UNDERSANDER D. (2002) Relative Forage Quality: An Alternative to Relative Feed Value and Quality Index. Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp 16-32.

MORCILLO J. 1974. Espectroscopía infrarroja. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. Departamento de Asuntos Científicos. 74 p.

MORLEY F.H.W. (1975) Estudio de la utilización de los recursos de pastoreo. Actas del Seminario Internacional dado en el CRIDA. Badajoz.

MULDOON D.K, (1985) Simulation of the Effect of Forage Cutting on Subsequent Grain Yields on Temperate Cereals. Agricultural Systems. 17, 231-242.

MURRAY I. (1986) Near infrared reflectance análisis of forages. En: Recent advances in animal nutrition. Pp 141-156. W. Heresign and D. J A. Cole Eds. London: Butterworths.

MURRAY I. (1988) Aspects of the interpretation of near infra red spectra. Food.

MURRAY I. (1993) Forage analysis by near infrared reflectance spectroscopy. En: Davies, A., Baker, R., Grant, S. and Laidlaw, A. (eds). Sward Management Handbook. British Grassland Society. pp. 285-312. UK. Science and Technology Today. 2(2), 135-140.

NAES T., ISAKSSON T., FEARN T. Y DAVIES T. (2002) A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK. 344 p.

NAYDENOVA Y., TOMOV P. Y DARDENNE, P. (1998) Near infrared spectroscopy estimation of feeding value of forage perennial grasses in breeding programmes by global and specific calibrations.

NORRIS K., BARNES R., MOORE J. Y SHENK J. (1976) Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. J. Animal Science. 43, 889- 897. Chemical composition and digestibility. J. Near Infrared Spectroscopy. 6, 153-165.

NORTON, B. W. (1981) Differences between species in forage quality in Hacker, J. B.1981. Nutritional Limits to Animal Production. Proc. Int Symp. St. Lucia, Queensland, Australia. CAB, UK.

OLEA L., PAREDES J. Y VERDASCO P. (1987) Los pastos de la dehesa del S.O. de la Península Ibérica: mejora y utilización. SIA. Junta de Extremadura. Badajoz.

OLEA L., PAREDES J. Y VERDASCO M.P. (1989) Caracteristicas productivas de los pastos de la dehesa del S.O. de la Peninsula Iberica. II Reunion iberica de pastos y forrajes. Badajoz-Elvas. Pastos, forrajes y produccion animal en condiciones extensivas. pp. 147-172.

OSBORNE B., FEARN T. Y HINDLE P.H. (1993) Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. 2 th. (ed) Longmann Scientific and Technical. pp. 227.

OTTAVIAN M., FACCO P., BAROTO M., BERZAGHI., SEGATO S., NOVELLI E. Y BALZAN S. (2012) Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'allevo cheese. Journal of Food Engineering. 113, 289-298.

PARRA F. (1988) La dehesa y el olivar. Enciclopedia de la Naturaleza de España. (ed) Debate. Madrid.

PARSI J., GODIO L., MIAZZO R., MAFFIOLI R.., ECHEVARRIA A. Y PROVENSAL P. (2001) Valoración nutritiva de los alimentos y formulación de dietas. Cursos de Producción Animal, FAV UNRC.

PINHEIRO N., POBLACIONES M.J. COUTINHO J., RODRIGO S., OLEA L., MACAS B. Y SANTAMARIA O. (2009) Producao de biomassa para producao animal em regime extensivo. Vida Rural. 1749, 30-33.

POBLACIONES M.J., RODRIGO S., OLEA L., SIMÕES N. Y TAVARES-DE-SOUSA M.M. (2008) aplicación de la tecnología NIRs para el análisis de calidad de las gramíneas del s.o. de la península ibérica. Pastos, clave en la gestión de los territorios: Integrando disciplinas Sociedad Epañola para el Estudio de los Pastos (SEEP) pp 323-328.

POLO I. (2010) Evaluación de variedades de triticale para distintos aprovechamientos: grano, forraje y biomasa energética y estudio comparativo con variedades de trigo. Tesis doctoral. Departamento de Producción agraria (Área de producción vegetal). Universidad Pública de Navarra.

PRIETO N., ANDRÉS S., GIRÁLDEZ F.J., MANTECÓN A.R.Y LAVÍN P. (2006) Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRs) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. Meat Science, 74, 487-496.

PULIDO F. Y ESCRIBANO M. (1994) Análisis de los recursos de pastoreo aportados por el medio en dos dehesas características del S.O. de la provincia de Badajoz (España). Arch. Zootec. 43, 239-249.

PULIDO F. (2002) Libro Blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. pp. 143-149.

QUEIPO N. Y PINTOS S. (2001) Fundamentos de data mining y sus aplicaciones. Instituto de Cálculo Aplicado. Universidad del Zuila, Venezuela.

REBOLÉ A., TREVIÑO J., BARRO C., ALZUETA C. Y CABALLERO C. (1996) Chemical changes associated with the field drying of oat forage. Field Crops Research. 47, 221-226.

REEVES J.B. (1985) Lignin composition and vitro digestibility of feds. Journal of Animal Science. 60, 316-325.

REEVES J.B. (1988) NIRs analysis of lignin components in sodium chlorite-treated and untreated forages and forage by products. Journal of Dairy Science. 71, 388-397.

REEVES J., BLOSSER T., BALDE A., GLENN B. Y VANDERSAL J. (1991) Near infrared spectroscopy analysis of forage samples digested in situ (nylon bag). J. Dairy Science. 74, 2664-2673.

REEVES J. (2000) Use of near infrared reflectance spectroscopy. En: D'Mello, J. (ed) Farm Animal Metabolism and Nutrition. pp. 185-207. CABI. Wallingford, UK.

RINEHART L. (2008) Nutrición para rumiantes en pastoreo. Servicio Nacional de Información de Agricultura Sostenible (ATTRA).

ROBINSON P., DAN P. Y SHANNON M. (1998) Interpreting Your Forage Test Report, in California. Alfalfa and Forage Review, Vol 1, No 2. Universidad de California.

RODRIGUEZ P.L., CRIADO M.A., PASCUAL M.R. Y GARRIDO, M.A. (1996) Utilización de la técnica NIRs para el control de calidad de la alfalfa deshidratada. Acatas de las XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.

ROHWEDER D.A., BARNES R.F. Y JORGENSEN N. (1978) Proposed hay grading standards based on laboratory analyses for evaluating quality. Journal of Animal Science. 47, 747-759.

ROYO C. (1992) El Triticale: bases para el cultivo y aprovechamiento. (ed) Mundi Prensa. España.

ROYO C., INSA J.A., BOUJENNA A., RAMOS J.M., MONTESINOS E. Y GARCÍA DEL MORAL L.F. (1994) Yield and quality of spring triticale used for forge and grain as influenced by sowing date and cutting stage. Field Crops Research. 37. pp. 161 168.

SANTAMARIA O., POBLACIONES M.L., OLEA L., RODRIGO S., VIGUERA F.K. Y GARCÍA-WHITE T. (2009) Influencia de nuevos fertilizantes sobre la producción de biomasa y los parámetros de calidad en pastos de dehesa del S.O. de España. La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas. pp. 581-587.

SANTIVERI F., ROYO C. Y ROMAGOSA I. (2004) Growth and yield responses of spring and winter triticale cultivated under Mediterranean conditions. European Journal of Agronomy. 20, 281-292.

SAROFF C., PAGLIARICCI H. Y FERREIRA, V. (2003) Efecto de la defoliación sobre la dinámica del crecimiento de triticale. Agricultura Técnica, 63, 266-276.

SHENK J. Y WESTERHAUS M. (1992) Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. Crop Science. 31, 469-474.

SHENK J. Y WESTERHAUS M. (1994) The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRs) to forage analysis. In: Fahey, G. (eds). Forage Quality, Evaluation and Utilization. National Conference on Forage Quality, Evaluation and Utilization. Lincoln. pp 406- 449. Nebraska.

SINNAEVE G., DARDENNE P. Y AGNEESSENS R. (1994) Global or local. A choice for NIR calibrations in analyses of forage quality. J. Near Infrared Spectroscopy 2(3), 163-176.

SOSULSKI K. (2000) Ethanol Production from Triticale Grain. Editorial Resource Seeds, Inc.

SPSS (2012). Statistical Package for Social Sciences. User Manual. IBM-Spss. United States of America.

TEJERINA D., LÓPEZ-PARRA M.M., GARCÍA-TORRES S. (2009) Potential used of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat physico-chemical composition of guinea fowl (Numida meleagris) reared under different production systems. Food Chemistry, 113, 1290-1296.

TRUJILLO A. URIARTE G. (2005) Valor Nutritivo de las Pasturas. 19.

UNDERSANDER D. (2001) Does forage quality pay? En: Proc. Am. For. Grsld. Coun. April 22-25, Springdale, AR. AFGC, Georgetown, TX. pp. 120-125

VAN SOEST P. J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant. 2d. Edition. Cornell University Press. Ithaca and London.

VANDEN K., HUBERT M. (2005) Robust classification in high dimensions based on the SIMCA method. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 79, 10-21.

VERAS G., ARUJO A., CAMILO A., BIZERRA A., ALVES P. Y PAULO E. (2010) Classification of biodiesel using NIR spectrometry and multivariate techniques. Talanta 83, 565-568.

VERY G. (2006) Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRs) en el análisis cuantitativo y cualitativo de carne de cordero. Tesis doctoral. Universsidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Graduados. Valdivia, Chuile.

VIGUERA F.J., SANTAMARIA O., POBLACIONES M.J., OLEA L. Y FERRERA M.E. (2007) Calidad nutritiva de los pastos de dehesa en el sur-oeste de Extremadura. En Los sistemas forrajeros entre la Produccion y el Paisaje. SEEP XLVII Reunion cientifica. pp. 521-526. Vitoria-Gasteiz (Alava), Spain.

WALPOLE R., MYERS R. Y MYERS S. (1999) Probabilidad y estadística para ingenieros. Traducido por Cruz, R. 6 th. (ed) México D.F. Prentice-Hall. pp. 752.

WATERS CJ. Y. GIVENS D.I (1992) Nitrogen degradability of fresh herbage: effect of maturity and growth type, and prediction from chemical composition and by near infrared reflectance Spectroscopy. Animal Feed Science and Technology, 38,335-349.

WESTERHAUS M.O. (1989) Near infrared reflectance spectroscopy (NIRs): analysis of forage quality. En: G. C. Marten, J. S. Shenk, and F. E. Barton, editors US Department of Agriculture Handbook. Pp 38-49

WILLIAMS P.C., SOBERING D.C. Y NORRIS K.H. (1992) Comparison of PLS software for NIR analysis of oat bran. In: Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy. Ed. I. Murray & A. Cowe. VCH, Chichester, U.K.

WILMAN D., WRIGHT P.T., (1983) Some effeets of applied N on the growth and cheminal composition of températe grasses. Herb. abst. 53(8), 387-93.

WOLD S. (1976) Reconocimiento de patrones por medio de modelos disjuntos componentes principales. Pattern Recognition. 8, 127-139.

WORKMAN J.J. (2009) NIR Spectroscopy, calibration basics. In: Handbook of Near Infrared Analysis (3rd ed.). Ed. D. A. Burns & E.W. Ciurzak. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton. U.S.A.

YE CWE. DÍAZ S.H., LOZANO RAJ., ZAMORA VVM. Y AYALA OMJ. (2001) Agrupamiento de germoplasma de triticale forrajero por rendimiento, ahijamiento y gustosidad. Téc. Pecu. Méx. 39(1), 15-30.

ZADOKS J.C., CHANG T.T. Y KONZAK C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research. 14, 415-421.

3. Objetivos

El objetivo general del estudio para el desarrollo de esta Tesis Doctoral fue evaluar la influencia de determinados factores agronómicos en la calidad nutritiva del forraje de triticale de doble aptitud, así como evaluar la capacidad predictiva de la tecnología NIRS para la cuantificación de parámetros químicos de su composición y establecer modelos de clasificación cualitativa.

Para la consecución ordenada de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- **Determinar la calidad químico-nutritiva del forraje de triticale de doble aptitud,** estudiando la influencia de la densidad de siembra, número de aprovechamientos o cortes y dosis de abonado nitrogenado sobre el contenido de proteína bruta, fibra bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina.
- **Evaluar el uso potencial de la tecnología NIRS para la cuantificación de parámetros químicos de calidad del forraje de triticale,** estudiando la influencia del tipo de pretratamiento espectral inicial sobre la fiabilidad y robustez de los modelos de predicción para el contenido en proteína bruta, fibra bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina.
- **Establecer modelos de clasificación cualitativa del forraje de triticale mediante la tecnología NIRS,** mediante el uso de métodos supervisados y no supervisados sobre los distintos pretratamientos espectrales (sin pretratar, MSC y EMSC) de las muestras de origen y utilizando como factores de agrupación la densidad de siembra, el número de aprovechamientos o cortes y la dosis de abonado nitrogenado.

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales y métodos agronómicos

4.1.1. Duración y localización del ensayo

El ensayo se llevó a cabo durante las campañas agrícolas 2009/2010 y 2010/2011 en una parcela de la finca La Orden perteneciente al Centro de Investigación Científica y Tecnológica de Extremadura (CICYTEX) del término municipal de Guadajira (Badajoz), cuyas coordenadas son: 38° 51' 33.213" (N) y 6° 39' 57.3192" (O), con una elevación media sobre el nivel del mar de 185 m.

4.1.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado fue el triticale de doble aptitud cv. `Verato´, obtenido por el Departamento de Cultivos Extensivos del Instituto de Investigación Agraria Finca "La Orden-Valdesequera" del CICYTEX.

En la tabla 1, González *et al*. (2012) indican las características de la variedad `Verato`.

Tabla 1. Características de la variedad Verato (Catálogo de Semillas obtenidas en el Centro de Investigación la Orden-Valdesequera) (González *et al*., 2012)

Identificación y características morfológicas	
Inscripción en el registro	2007
Origen	CIMMYT (Méjico)
Tipo	Completo de doble aptitud (forraje y grano)
Aspecto de la planta	Planta de aproximadamente 115 cm de altura, de tallo ½ macizo, espiga laxa 20-30, de color claro y barbas de tamaño entre 50 y 80 mm.
Características agronómicas	
Precocidad	Ciclo intermedio.
Resistencia a enfermedades	Resistente a Oídio (*Erysiphe graminis*) y tolerante a Septoria (*Septoria tritici*)
Resistencia al encamado	Resistente
Rendimiento	La producción invernal de forraje oscila entre 1500 y 2000 kg/ha de materia seca y la producción en grano superior a los 2500 kg ha^{-1}
Peso específico	Medio, 73.5 kg hl^{-1}
Recomendaciones para su cultivo	
Variedad resistente a la sequía, de alta producción forrajera (elevada capacidad de ahijamiento) y excelente capacidad de rebrote con un buen rendimiento posterior de grano. Adaptada a suelos ligeramente ácidos, siendo su máxima producción en suelos fértiles y profundos.	

4.1.3. Labores de cultivo

Las labores preparatorias del primer año de ensayo consistieron en un pase cruzado de grada de disco sobre un rastrojo de cereal y otro pase de rotovator. El segundo año se hizo un

pase de subsolador, uno de grada y por último, se pasó un rotovator. No se realizó ningún tipo de tratamiento fitosanitario.

Para la siembra se utilizó una sembradora de chorrillo con 6 botas separadas 20 cm y se sembró el 28/10/2009 y el 19/10/2010.

4.1.4. Clima.

El estudio climatológico se realizó con los datos obtenidos de la estación climática que posee la finca "La Orden". Para ello, se utilizaron las precipitaciones medias mensuales, temperaturas medias, medias de máximas y medias de mínimas, de una serie de 60 años (tabla 2).

Tabla 2. Precipitaciones, temperaturas medias, media de máximas y media de mínimas de 60 años en La Orden

Mes	Precipitaciones	T Medias	T M máximas	T M mínimas
Enero	47,91	8,59	14,02	2,70
Febrero	49,49	9,88	15,97	3,65
Marzo	43,46	12,51	19,23	5,66
Abril	45,50	14,60	21,65	7,51
Mayo	32,05	18,33	25,73	10,51
Junio	26,53	22,49	30,76	13,96
Julio	5,22	25,27	34,25	15,91
Agosto	6,09	24,79	33,81	15,61
Septiembre	29,62	21,95	30,16	13,59
Octubre	58,07	17,29	24,28	10,13
Noviembre	63,85	12,18	18,44	5,62
Diciembre	57,14	8,85	14,35	3,29
Media Anual	**464,93**	**16,39**	**23,55**	**9,01**

Para determinar gráficamente la existencia y duración de los períodos secos, se realizó el diagrama ombrotérmico de Gaussen, observándose la existencia de un único período seco, por lo que el clima se puede clasificar como monoxérico (figura 1).

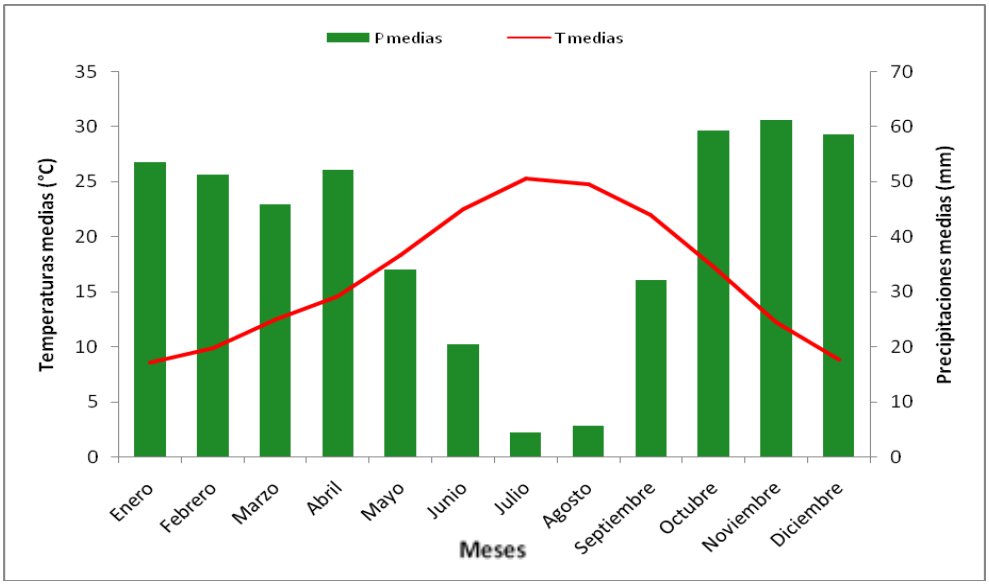


Figura 1. Diagrama ombrotérmico de Gaussen de "La Orden" (1951-2011)

En las figuras 2, 3 y 4 se muestran la comparación de los datos de las campañas de estudio con respecto a la campaña media y la comparativa entre ambas campañas, respectivamente.

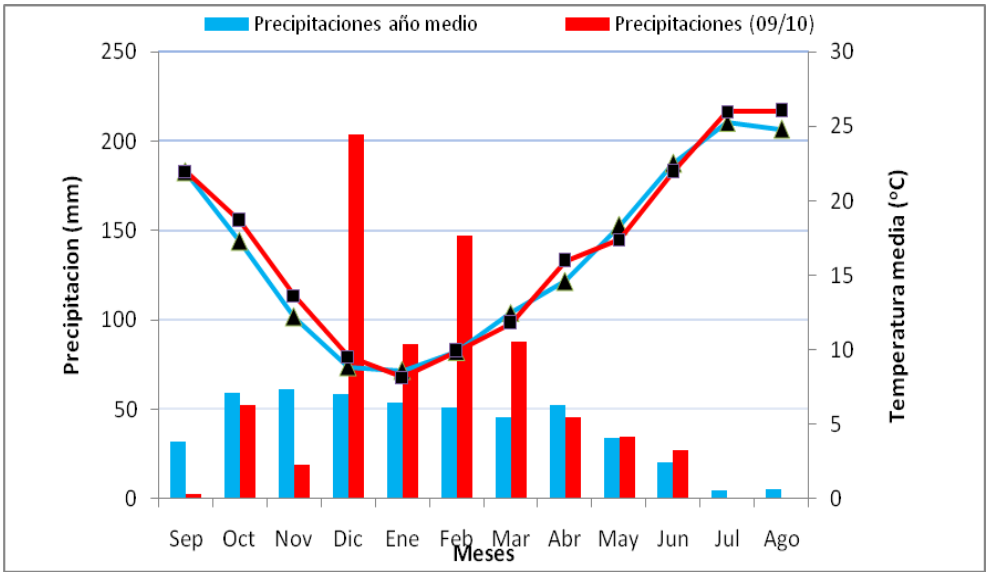


Figura 2. Temperatura media (º C) y precipitaciones (mm) durante la campaña 2009/2010 y comparación con los datos de referencia (1951-2011) en "La Orden"

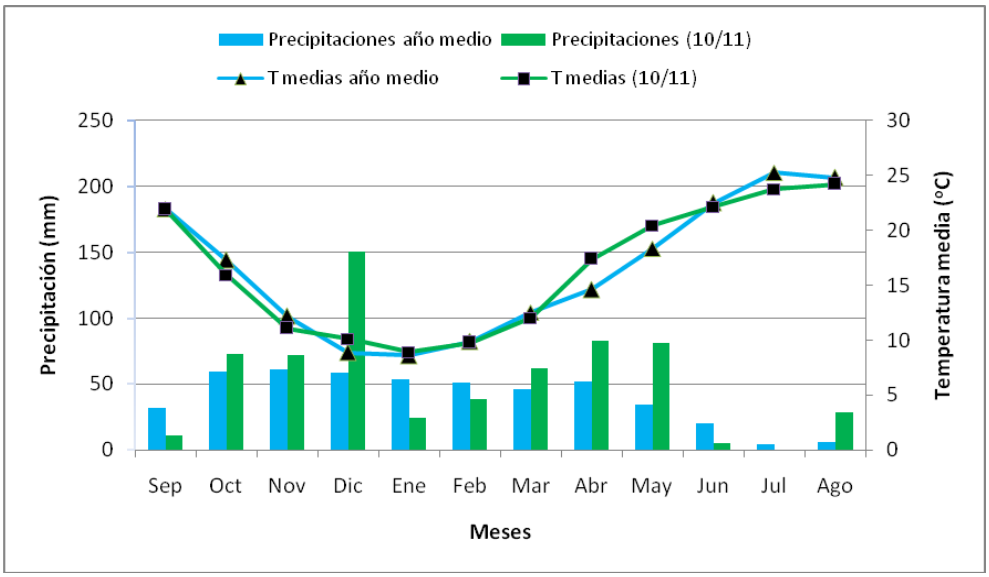


Figura 3. Temperatura media (ºC) y precipitaciones (mm) durante la campaña 2010/2011 y comparación con los datos de referencia (1951-2011) en "La Orden"

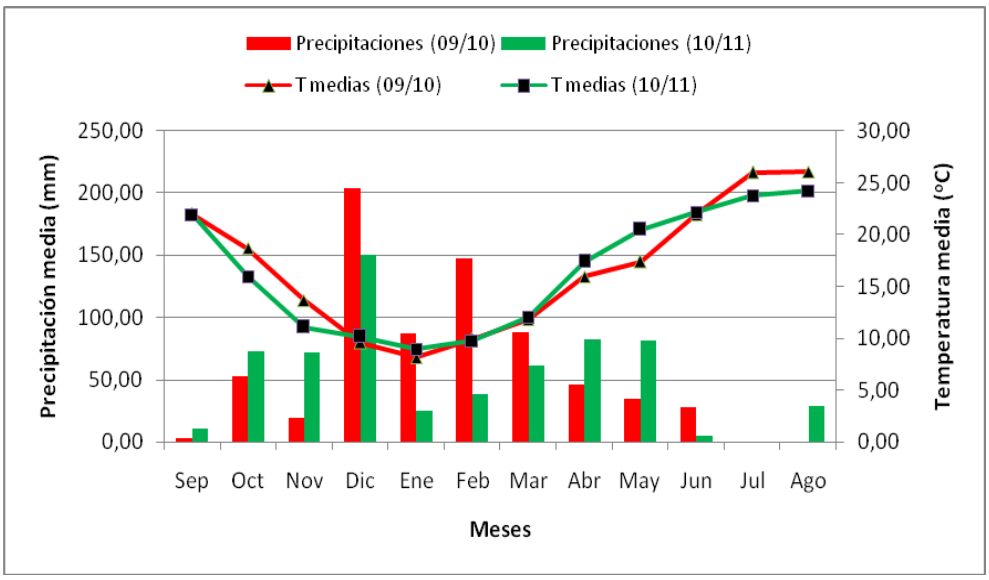


Figura 4. Temperatura media (ºC) y precipitaciones (mm) durante la campaña 2009/2010 y 2010/2011 en "La Orden"

Para determinar la viabilidad climática de los cultivos se realizó la clasificación de Papadakis (1966). La clasificación climática para la finca "La Orden" es:

Tabla 3. Clasificación climática de "La Orden"

Tipo de invierno	Citrus (Ci)
Tipo de verano	Gossypium cálido (G).
Régimen térmico	Subtropical cálido (SU)
Régimen hídrico	Mediterráneo seco (Me)
Tipo climático	Mediterráneo subtropical

4.1.5. Grados Días Acumulados (GDA)

La metodología para la cuantificación de los Grados Día (GD), fue la de considerar la suma entre la temperatura máxima (TM) y mínima (Tm) diarias dividida entre 2 y restando la resultante de la temperatura base (Tb). Se tomó como temperatura base a la de 0 ºC, según Bauer *et al*. (1984):

$$GD = \frac{TM - Tm}{2} - Tb$$

Para la obtención de los Grados Días Acumulados (GDA), desde la siembra hasta la realización de los cortes, se realizó el sumatorio de los GD en el periodo correspondiente:

$$GDA = \sum_{i=1}^{n} GD$$

Los datos correspondientes a los Grados Día (GD) de nuestro ensayo se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Grados días desde siembra a 1º corte y desde 1º corte a 2º corte

	GDA Siembra-1º Corte	GDA 1º Corte-2º Corte
1º Campaña (2009/2010)	922	488
2º Campaña (2010/2011)	852	368

4.1.6. Caracterización del suelo

La finca "La Orden", por su emplazamiento en la margen izquierda del río Guadiana, determina una morfología en sus suelos típicamente cuaternaria, asentada sobre sedimentos terciarios.

Los suelos de la zona poseen horizontes argílicos con textura franca o franco-arcillosa. En la parte más abrupta de la finca se observan suelos de texturas más pesadas. Hay una gradación bastante acentuada entre los horizontes más superficiales y los subsuperficiales, pasando de franco-arenosa (o franca) a arcillosa.

Los ensayos fueron realizados en un suelo con clasificación: orden Alfisol, suborden Xeralf, gran grupo Haploxeralf y subgrupo Mollic Haploxeralf (Jiménez *et al*., 1978), de textura franco-arenosa con un bajo porcentaje en materia orgánica oxidable (0.59 %), pH próximo a la neutralidad (6.76), una CIC muy baja (6.02 meq/100 g) y un contenido normal en fósforo asimilable (12.89 ppm).

Para conocer las posibilidades de uso del suelo se ha utilizado el libro "Estudio edafológico de la finca "La Orden" de Jiménez *et al*. (1978), que utilizan los criterios de Riquier *et al*. (1970). Según esta clasificación, el suelo donde se realizó el ensayo tiene un coeficiente

cultivo herbáceo de 61.96, una evaluación potencial de cultivo herbáceo alta y una evaluación potencial agrológica alta (Jiménez *et al*., 1978).

4.1.7. Diseño experimental

El diseño estadístico fue un *split split plot* con cuatro repeticiones, siendo tres los factores experimentales:

1º Densidad de siembra:

- D1-400 plantas m^{-2} (160 kg ha^{-1}).
- D2-500 plantas m^{-2} (200 kg ha^{-1}).
- D3-600 plantas m^{-2} (240 kg ha^{-1}).

Se estudió la influencia de la densidad de siembra por ser la semilla uno de los principales gastos en las explotaciones agrícolas y por su interacción con la producción de hojas en el cereal y de éstas en la composición nutritiva.

2º Número de cortes (pastoreo simulado):

- C0-SIN corte.
- C1-Un corte.
- C2-Dos cortes.

Las fechas en las que se realizaron los cortes o aprovechamientos se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Fecha de realización de los cortes

1º Corte (1º Aprovechamiento)	18/01/2010
2º Corte (2º Aprovechamiento)	10/03/2010
1º Corte (1º Aprovechamiento)	17/01/ 2011
2º Corte (2º Aprovechamiento)	03/03/2011

Se realizaron dos aprovechamientos (pastoreos simulados) cuando la planta se encontraba en el estadio 30 de la escala Zadoks *et al.* (1974). En el primer corte se utilizó una segadora manual de peine frontal que realizaba el corte en la planta a una altura de 2-3 cm. Pasados dos meses aproximadamente, se realizó el segundo corte con la misma segadora manual

pero a una altura de 6-7 cm. Francia *et al*. (2006) comprobaron que no existían diferencias apreciables entre la simulación de pastoreo mediante siega mecánica y el pastoreo real con ganado ovino en cuanto a crecimiento y producción del cultivo se refiere.

El número de cortes (pastoreo simulado) está relacionado con la economía del ganadero, por no tener que depender de alimentos externos para los animales, y con la calidad nutritiva del forraje.

3º Dosis de nitrógeno aplicadas antes de la siembra, después del primer corte y después del segundo corte:

- N0-SIN nitrógeno (0-0-0).
- N1-75 kg N ha^{-1} (25-50-0).
- N2-125 kg N ha^{-1} (50-50-25).

Los distintos abonados realizados se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Cantidades y tipos de fertilizantes utilizados en el abonado de fondo y en el abonado de cobertera (kg ha^{-1})

Tratamiento	Abonado de Fondo			1ª Cobertera	2ª Cobertera
	N	P_2O_5	K_2O	N	N
	Sulfato amónico del 21%	Superfosfato cálcico del 18%	Cloruro potásico del 60%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%
N2 = 125 kg N ha^{-1}	50	42	90	50	25
N1 = 75 kg N ha^{-1}	25	42	90	50	0
N0 = 0 kg N ha^{-1}	0	42	90	0	0

Tabla 7. Fecha de aplicación del abonado

Abonados	Fechas	
Abonado de fondo	27/10/2009	18/10/2010
Abonado de cobertera	1º Cobertera (22/01/10)	1ª Cobertera (19/1/2011)
	2º Cobertera (11/03/10)	2ª Cobertera (03/03/2011)

La importancia de la aplicación de nitrógeno para llevar a cabo una agricultura más sostenible, requiere que éste se use más eficientemente. Desde hace varias décadas se ha venido induciendo a los agricultores a que intensifiquen el uso de fertilizantes. Este hecho, hace necesario un cambio de mentalidad en el uso de los fertilizantes. Hay que determinar las dosis de abonado que, manteniendo las producciones en unos niveles sostenibles, mejoren la calidad, reduzcan los costes de producción y conserven los recursos naturales (Llera, 1998).

La unidad experimental estaba constituida por dos parcelas de 1.5 m de ancho y 10 m de longitud, utilizando una de ellas para los muestreos destructivos, por lo que cada parcela elemental tuvo una superficie de 30 m^2 y se dejó una distancia de 2 metros entre bloques y 2 metros alrededor del ensayo. Con todo ello, la superficie total del ensayo fue de 4250 m^2 (figuras 5 y 6).

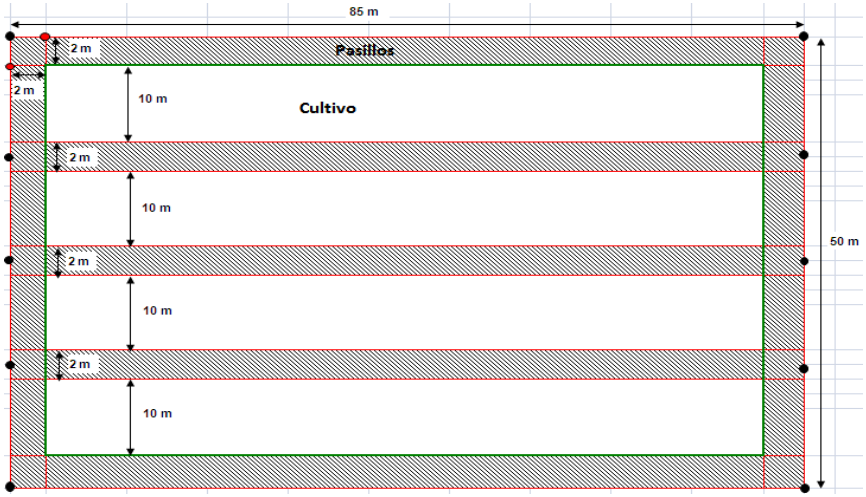


Figura 5. Esquema del ensayo

Figura 6. Ensayo en campo

En la figura 7 se muestra un ejemplo esquematizado de las tareas realizadas, las fechas correspondientes y las precipitaciones acumuladas (adaptado de Llera *et al*., 2011).

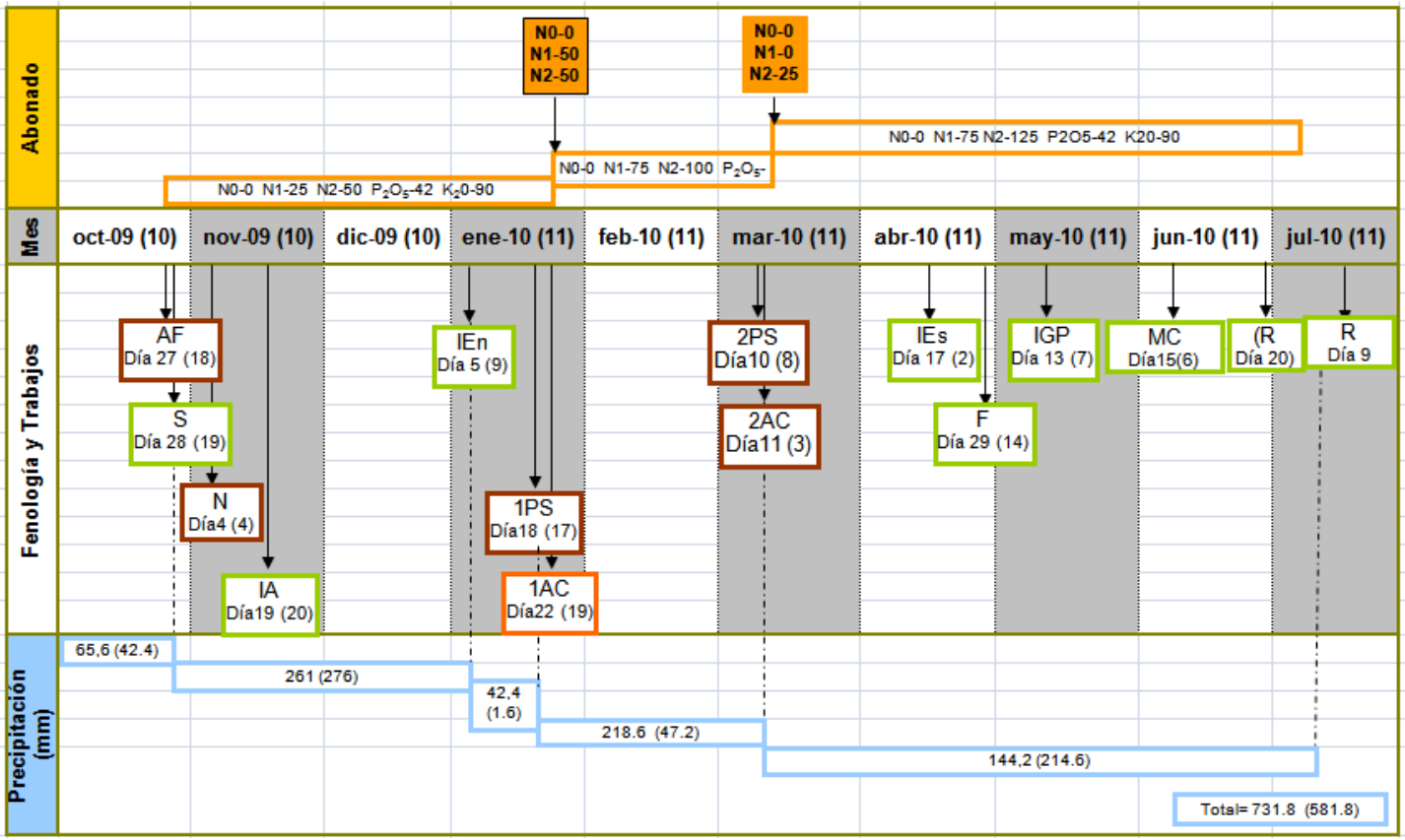


Figura 7. Cronología del Cultivo (Entre paréntesis datos del 2º año de ensayo) (adaptado de Llera *et al.*, 2011)

(AF= Abonado de Fondo**, S**= Siembra**, N**= Nascencia**, IA**= Inicio de Ahijado**, IEn**= Inicio de Encañado**, 1PS** = 1º Pastoreo simulado (1º Corte)**, 1AC**= 1º Abonado de Cobertera**, 2PS**= 2º Pastoreo simulado (2º Corte)**, 2AC**= 2º Abonado de Cobertera**, IEs** = Inicio de Espigado**, F**= Floración**, IGP**= Inicio Grano Pastoso**, MC**= Madurez Comercial**, R**= Recolección**).**

4.1.8. Muestreos

4.1.8.1. Campaña 2009/2010

En la primera campaña, el número total de muestreos fueron seis (18/01/2010, 25/02/2010, 10/03/2010, 12/04/2010, 10/05/2010 y 21/06/2010), donde se incluyen los dos pastoreos simulados (18/01/2010 y 10/03/2010). En cada muestreo se cortó la biomasa de forraje incluida en un cuadrado de 0.25 m^2 de superficie de las 108 parcelas que constituyen el diseño experimental. Esta biomasa se llevó al laboratorio del CICYTEX-La Orden para su análisis (MS, PB de todos los muestreos y FB, FND, FAD y LAD solamente para los dos pastoreos simulados).

4.1.8.2. Campaña 2010/2011

El segundo año sólo se tomaron muestras en dos ocasiones correspondientes a los dos pastoreos simulados (17/01/2011 y 03/03/2011). El número de muestras tomadas fueron de 72, correspondientes a las 36 parcelas elementales del primer pastoreo simulado y otras 36 del segundo (3 densidades de siembra x 1 parcela con dos pastoreos simulados x 3 dosis de abonado x 4 repeticiones). En estos muestreos se analizó la biomasa del forraje y se determinó la MS, PB, FB, FND, FAD y LAD de las 72 muestras.

4.1.9. Procesado de las muestras y análisis químicos

Las muestras fueron secadas en estufa (UNITHERM) a 105 ° C durante 48 horas para determinar el peso seco de la parte aérea de la planta y, posteriormente, fueron molidas y pasadas por un tamiz de 1 mm (molino con tamiz IKA MF 10 BASIC) para posteriormente obtener su contenido en proteínas y fibras.

Así, las determinaciones realizadas fueron:

- Proteína (LECO®/DUMAS AOAC 9689.06 (AOAC, 1969); apartado 4.1.9.1.)
- Fibra bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente (ANKOM A 2000 I; AOCS Ba 6a-05 (2003); apartado 4.1.9.2.)
- Valor Relativo del Forraje (Ver apartado 4.1.9.3.)

El instrumental gravimétrico utilizado se componía de:

- Balanza analítica Metter® AE166.
- Balanza granatario Precisa® 3000D

4.1.9.1. Proteína

El contenido de nitrógeno del forraje de triticale se obtuvo por el método LECO®/DUMAS AOAC 9689.06 (AOAC, 1969). El método Dumas mide el nitrógeno total mediante cuantificación del óxido nítrico generado tras la combustión completa de la muestra. Hay que indicar que el método de combustión de Dumas no es el método oficial de análisis establecidos para alimentos animales. Sin embargo, la facilidad que supone su automatización y la similitud de resultados obtenidos respecto al método Kjeldahl, (King-Brinky y Sebranek, 1993), hace que sea un método válido y utilizado habitualmente en laboratorios que procesan un gran volumen de muestras.

La conversión de nitrógeno total a proteína se calculó según la siguiente fórmula [N x 6.25], asumiendo que la proteína tiene en promedio un 16% de nitrógeno (Henneberg y Stohmann, 1985).

4.1.9.2. Fibra Bruta (FB), Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD) y Lignina Ácido Detergente (LAD)

Se utilizó un analizador de fibra ANKOM A 2000 I, cuyo procedimiento consta en el método oficial AOCS Ba 6a-05 (2003), para la determinación de compuestos fibrosos. Básicamente consiste en medir el residuo tras un ataque con ácido y base diluidos (FB) o medir el residuo tras el ataque con laurilsulfato sódico en medio neutro (FND) o con bromuro de trimetilcetilamonio en medio ácido (FAD).

4.1.9.3. Valor relativo del forraje (VRF)

Las referencias al concepto de VRF y las ecuaciones utilizadas para su cálculo, aparecen en numerosos documentos y libros de texto (Kellems y Church, 2002).

A pesar de que no se utiliza para la formulación de raciones, se ha optado por el VRF en vez de por las Unidades de Lastre (UL), ya que con el VRF es más fácil comparar los alimentos entre sí (Jeranyama y García, 2004).

En estudios previos (Dunham, 1998) indicó que el VRF está determinado por su contenido en FAD y FND. Así, se calcula a partir de la estimación de la Digestibilidad de la Materia Seca (MSD) y su consumo (CMS):

- MSD = 88.9 – (0.779 x %FAD) (%MS)
- CMS = 120 / %FND (% PV)
- VRF = (MSD x CMS) / 1.29

La Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA, 2004) también utiliza este índice, clasificando los forrajes en seis calidades (tabla 8).

Tabla 8. Calidad del forraje según el Valor Relativo del Forraje

Calidad del forraje	VRF
Excelente	>151
Primera	125-151
Segunda	103-124
Tercera	87-102
Cuarta	75-86
Quinta	<75

4.1.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos agronómicos se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza de modelo factorial (*split split plot*) con tres factores fijos experimentales (densidad de siembra, cortes y dosis de nitrógeno), el efecto de la campaña y uno de efecto aleatorio (repeticiones), utilizando el paquete estadístico SPSS-PC+ (2005). Mediante este diseño se determinó el efecto de los factores fijos (incluida la campaña) para cada una de las variables dependientes estudiadas. El test de Tukey se aplicó posteriormente para comparar las medias entre cada uno de los grupos cuando el ANOVA fue significativo ($p<0.05$).

En cada análisis se calculó el coeficiente de variación para estimar la magnitud del error experimental.

Para conocer las relaciones entre algunos de los parámetros estudiados se estudiaron las correlaciones bivariadas de Pearson y regresiones lineales simples y múltiples.

4.2. Tecnología NIRs

Para la consecución de los objetivos parciales 2 y 3, se empleó el análisis NIRs como herramienta de predicción cuantitativa y cualitativa del contenido en proteína bruta, fibra bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente; realizando las siguientes etapas para el desarrollo de modelos de calibración multivariables.

4.2.1. Selección del conjunto de muestras

El primer paso del ensayo NIRs fue crear un conjunto de muestras de calibración (tablas 9 y 10). En la selección de estos conjuntos es importante disponer de un número de muestras suficiente para la creación y validación interna del modelo. A su vez, un número menor de muestras con características similares se seleccionaron para la validación externa (tabla 10) del modelo que presente los mejores estadísticos de predicción, y así comprobar su exactitud y precisión.

Así, de acuerdo al número de muestreos reflejados en la tabla anterior, diferentes parámetros estarán definidos por un conjunto de muestras diferentes:

- Proteína bruta: se emplearon 648 muestras procedentes de todos los cortes de la primera campaña (108 muestras x 6 fechas de corte) para la calibración y creación del modelo predictivo NIRs. Y para la validación del mismo, fueron utilizadas 30 muestras seleccionadas al azar de entre las 72 muestras recogidas durante la segunda campaña de los cortes 1º (17/1/2011) y 3º (3/3/2011).

- Fibra bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente: se recogieron un total de 288 muestras, de las cuales 216 (108x2) corresponden al 1º y 2º corte del primer año y 72 (36x2) que corresponden al primer y segundo corte del segundo año. Para el conjunto de calibración y creación del modelo predictivo se utilizaron 258 muestras y para el set de validación externa fueron seleccionadas, aleatoriamente, 30 muestras del total.

Tabla 9. Distribución de los muestreos en las diferentes fechas de muestreo en cada campaña para las variables químicas estudiadas (n= nº de muestras)

Variables	1ª Campaña							2ª Campaña			
	18/1/2010	25/2/2010	10/3/2010	12/4/2010	10/5/2010	21/6/2010	n total	17/1/2011	3/3/2011	n total	n total campañas
	n por fecha de corte							n por fecha de cortes			
PB	108	108	108	108	108	108	**648**	36	36	72	**720**
FB	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**
FND	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**
FAD	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**
LAD	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**

Tabla 10. Distribución de muestras en calibración y validación externa en cada variable química de estudio.

Variables	Calibración			Validación externa		
	n	Origen de las muestras		n	Origen de las muestras	
		1ª Campaña	2ª Campaña		1ª Campaña	2ª Campaña
PB	648	648	-	30	-	30
FB	258	216	42	30	-	30
FND	258	216	42	30	-	30
FAD	258	216	42	30	-	30
LAD	258	216	42	30	-	30

Las muestras utilizadas para la construcción del modelo de calibración fueron representativas de la variabilidad debida al diseño experimental planteado, y también a los diferentes tratamientos utilizados. Así, las muestras, además de cubrir todo el intervalo de la propiedad a determinar, incorporaron la variabilidad debida a otras variables inherentes al propio diseño experimental. Para ello, se representaron gráficamente el conjunto de datos espectrales y se realizó un análisis de componentes principales (PCA), como herramienta para la selección de muestras, que además nos permitió una primera identificación de posibles muestras anómalas.

4.2.2. Procesado de las muestras

Tras la recolección de las muestras en los tiempos y forma descritos en el apartado 4.1.8.1, se procedió a la eliminación de su contenido en humedad, mediante el secado de las mismas en estufa (UNITHERM®) a 105 °C durante 48 horas, para posteriormente, ser molidas, tamizadas (molino con tamiz IKA® MF 10 BASIC de 1mm) y conservadas en oscuridad, en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición del CICYTEX-La Orden, hasta su análisis.

4.2.3. Obtención de datos espectrales

Previamente a la determinación de los parámetros químicos, se procedió a la obtención de la información espectral del conjunto de muestras, mediante el uso de un equipo LabSpec 2500 (ASD inc. ®) (figura 8) con un sensor UNIT5065, que realiza lecturas con una resolución espectral de 2 nm en un rango de 1000 a 2500 nm. Cada una de las muestras fue expuesta al infrarrojo cercano a través de la sonda ASD® Turntable, giradisco de 150 mm de diámetro, con una velocidad de giro de 22 rpm y fuente de luz halógena. Previo al registro NIRs de las muestras, se registró un espectro de referencia de una placa cerámica (blanco). El software utilizado para la obtención de los datos espectrales fue el IndicoPro® (Spectral Adquisition Software). El espectro final utilizado es el resultado del promedio de 20 lecturas de cada una de las dos repeticiones utilizadas por cada muestra, expresado en unidades de absorbancia (log 1/R) (R=reflectancia), ya que según Birth y Hecht (1987) reproduce una respuesta más lineal en función de la concentración del analito.

El conjunto de valores a diferentes longitudes de onda para una muestra constituye la "huella dactilar" o "espectro" típico o representativo de la muestra.

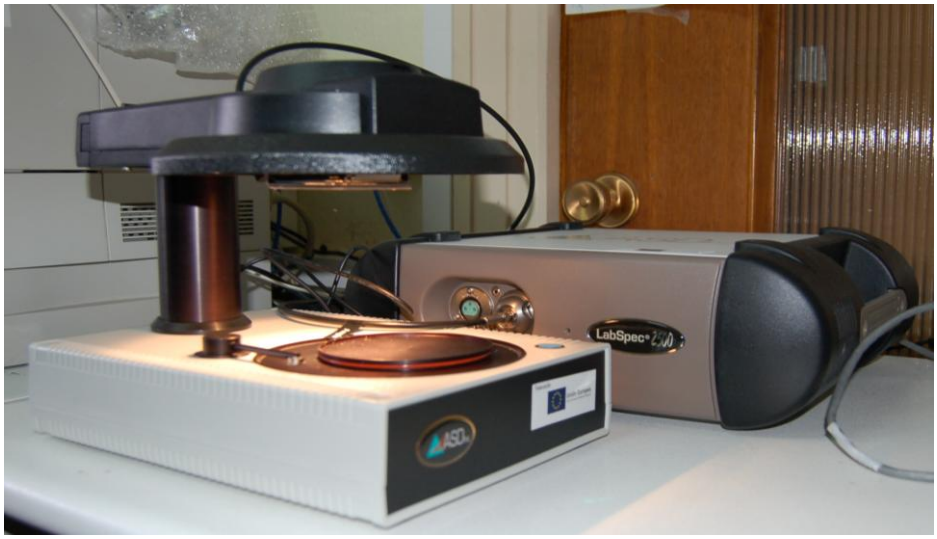


Figura 8. Equipo LabSpec 2500 (ASD inc. ®)

4.2.4. Pretratamiento espectral

Con el objetivo de obtener los mejores modelos de predicción para cada uno de los parámetros a determinar, se estudió el comportamiento de diferentes pretratamientos matemáticos (tabla 11) sobre el total de datos espectrales del conjunto de muestras de calibración:

- Sin pretratamientos, en absorbancia (log 1/R).
- Corrección multiplicativa de la señal extendida (EMSC) en absorbancia.
- Corrección dispersiva desviación estándar normalizada (SNV) en absorbancia.
- Derivación (1º y 2º) combinada con el EMSC y el SNV, variando el tamaño de los segmentos (5, 10 y 15) de alisamiento y gap (tamaño de derivación) (5, 10, 15). Primero se realizaban las derivadas y posteriormente los pretratamientos EMSC o SNV.
- Derivación (1º y 2º) variando el tamaño de los segmentos (5, 10 y 15) de alisamiento y gap (tamaño de derivación).

4.2.5. Métodos de referencia de las variables químicas

En el Laboratorio de Nutrición del CICYTEX-La Orden, se realizaron los análisis químicos de las muestras secas y molidas mediante las siguientes metodologías de referencia mencionadas en el apartado 4.1.9.1 y 4.1.9.2.

Para cada uno de los métodos de referencia utilizados se calculó el error estándar de

laboratorio (EEL) para conocer la variabilidad del método y así establecer la conveniencia o no del uso de los modelos de predicción obtenidos mediante NIRs.

$$EEL = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_1 - y_2)^2}{2n}}$$

donde y_1 e y_2 son el primer y segundo duplicado del valor de la propiedad a determinar para un misma muestra, y n es el número de muestras.

4.2.6. Análisis cuantitativo NIRs

4.2.6.1. Eliminación de *outliers*

Se definió un protocolo de detección y eliminación de muestras aberrantes (*outliers*), tanto de carácter espectral (H), como respecto de la magnitud de su desviación entre el valor predicho por NIRs y el valor de referencia (T), utilizando el programa Unscrambler V.10.2 de CAMO®. El valor crítico para muestras aberrantes de tipo H se fijó en 3, mientras que el valor crítico para eliminar muestras por diferencia residual de valores analíticos (T) se fijó en 2.5.

4.2.6.2. Modelos de predicción NIRs. Calibración y validación

Para la obtención de los mejores modelos predictivos, se relacionaron los diferentes conjuntos de datos espectrales de calibración con las variables químicas a través de una regresión multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS), con el software quimiométrico Unscrambler v.10.2 de CAMO® (2013). Según Bjorsvik y Martens (2008), la habilidad predictiva del método PLS (*Partial Least Squares*) es superior a la PCR (*Principal Components Regression),* por lo que en la práctica se ha impuesto como el sistema *de facto* para hacer modelos de regresión quimiométricos.

Pero en el desarrollo de cualquier modelo de calibración PLS se necesita de algún sistema que, aparte de saber si una calibración proporciona una capacidad predictiva apropiada, permita evaluar la conveniencia de utilizar más o menos componentes principales (valor *p*= número de términos de la ecuación). En cada modelo PLS, la selección del número de factores óptimo, se realizó basándose en el estadístico del error cuadrático medio (RMSE = *Root Mean Square Error*) (ver apartado 2.3.8).

En la construcción del modelo se utilizó la validación cruzada (*cross-validation*) como metodología para validar el modelo de calibración. Ésta utiliza muestras del propio bloque de

calibración para comprobar el modelo. Mediante este método el conjunto de muestras se divide en varios bloques o segmentos. En nuestro caso para el conjunto de muestras de calibración de la proteína bruta (n= 648), el número de segmentos utilizados fue de 25, con 26 muestras por segmento; y para el resto de parámetros (FB, FND, FAD y LAD) (n= 258), el número de segmentos utilizados fue de 16, con 16 muestras por cada uno. La selección de las muestras por segmentos se realizó aleatoriamente. Así, el modelo se construye tantas veces como número de segmentos hayamos elegido, utilizando un segmento como bloque de datos para comprobar los resultados y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deja un segmento fuera. Esto se realiza para cada factor, calculando el MSECV (*mean estándar error cross validation*) para cada segmento y acumulándolo de forma que se consiga una buena estimación del poder predictivo de las muestras de calibrado.

$$MSECV = \frac{\sum_{i=1}^{Ic}\left(y_i - y_i^{REF}\right)^2}{m_c}$$

donde m_c es el número de muestras de calibración, y_i es el valor calculado por el modelo e y^{REF} es el valor de referencia.

Para evitar el sobreajuste, limitar el número de términos y seleccionar las mejores ecuaciones, se utilizó una validación cruzada. En este proceso de validación se calculó un estimador de incertidumbre o error estándar (EE_{VC}) y uno de certidumbre o coeficiente de determinación (1-VR), los que finalmente se promediaron arrojando un valor de EE_{VC} y de 1-VR para la validación (Infrasoft International, 1992; Shenk y Westerhaus, 1994)

Las mejores ecuaciones de calibración se seleccionaron por su menor valor de EE_{VC}, mayor valor de 1-VR y la mayor relación entre la desviación estándar de los datos de referencia del set de calibración y el SECV, conocida como *ratio performance deviation* (RPD) (Ver apartado 2.3.9). Según Williams (2001), valores de RPD menores a 2.0 corresponden a ecuaciones poco confiables para propósitos de predicción. Con relaciones RPD entre 2.0 y 3.0 la calidad predictiva aumenta y la ecuación se puede aplicar con fines de aproximación o clasificación en rangos. Cuando el RPD es superior a 3.0 la calidad de la ecuación es aceptable para fines de predicción.

En caso de similitud en los valores de los estadísticos de selección de modelos (SECV y 1-VR), se seleccionará aquel que tenga menor número de Componentes Principales (CP).

Las ecuaciones de predicción son construidas en base a la siguiente fórmula:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \ldots\ldots\ldots + b_nx_n,$$

donde Y representa el valor del parámetro químico, b_0 es el intercepto, de b_1 a b_n son los coeficientes de regresión, x_1 a x_n las absorbancias a diferentes longitudes de onda.

Una vez seleccionado el modelo con mejor habilidad predictiva se comprobó su exactitud y precisión mediante una validación externa con un conjunto de muestras (n=30) para cada variable problema, utilizando como "y" de referencia los valores químicos previamente calculados por los métodos de convencionales indicados. Los estadísticos indicativos de la fiabilidad del modelo fueron el coeficiente de determinación (R^2), el error estándar en validación externa (EE_{VE}) y el índice RPD. Estos estadísticos fueron extraídos de la gráfica de correlación entre el valor real y el valor predicho por el modelo NIR seleccionado.

Tabla 11. Tratamientos matemáticos y valores estadísticos

PLS	n	CP	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN CRUZADA			RPD (DE/EE_{VC})
Tratamiento			r	EEC	1-VR	EEvc	DE	
Absorbancia								
EMSC								
1,10,5+EMSC								
1,10,10+EMSC								
1,10,15+EMSC								
1,15,5+EMSC								
1,15,10+EMSC								
1,15,15+EMSC								
SNV								
1,10,5+SNV								
1,10,10+SNV								
1,10,15+SNV								
1,15,5+SNV								
1,15,10+SNV								
1,15,15+SNV								
1,10,5								
1,10,10								
1,10,15								
1,15,5								
1,15,10								
1,15,15								
2,5,5								
2,5,10								
2,5,15								
2,10,5								
2,10,10								
2,10,15								

Tratamiento: tratamiento matemático aplicado a los espectros, donde el primer término es el orden de la derivada aplicada, el segundo hace referencia al GAP y el tercero a la longitud del segmento de suavizado; **EMSC**: pretratamiento matemático de los datos espectrales usando una corrección multiplicativa de la señal extendida ; **SNV**: pretratamiento matemático de los datos espectrales usando una corrección dispersiva desviación estándar normalizada; **PLS**: regresión multivariante por mínimos cuadrados parciales; **n**: número de muestras; **CP**: número de términos en la ecuación; **r**: coeficiente de correlación en calibración; **EEC**: error estándar de calibración; **1-VR**, coeficiente de determinación en validación cruzada; **EEvc**: error estándar de validación cruzada; **DE**: desviación estándar; **RPD**: cociente entre la desviación estándar (desviación estándar obteniendo la raíz cuadrada de la varianza, consiguiendo así, un valor similar a la desviación media) y el EE_{VC}.

4.2.7. Análisis cualitativo NIRs

Dada la naturaleza de las muestras y el objetivo del trabajo, además de un análisis cuantitativo, se ha realizado un análisis quimiométrico de tipo cualitativo, para tratar de agrupar y diferenciar las muestras en función de la densidad de siembra, la fecha de corte y la dosis de abonado nitrogenado, con muestras procedentes de la primera campaña.

Debido a la presencia de efectos dispersivos en los espectros de las muestras de forraje, se procedió a utilizar tres tratamientos espectrales, MSC y EMSC. De tal forma que se trabajó con 3 tipos de espectros: originales sin pretratar, MSC y EMSC.

Inicialmente se realizó un análisis de componentes principales, como indica Mark (2008), para estudiar la posible ordenación de las muestras en el espacio definido por los componentes principales, en función de la densidad de siembra, la fecha de corte y la dosis de abonado nitrogenado. Además, los resultados comparados de este primer análisis, podrían determinar cuál podría ser el mejor tratamiento espectral con el que seguir trabajando.

Posteriormente se realizaron los sistemas de clasificación no supervisada mediante un análisis de conglomerados (*cluster*) combinando diferentes sistemas de medida y agrupamiento, según figuran en la tabla 12.

Tabla 12. Combinación de métodos de agrupación y medidas de distancia utilizadas en el trabajo

Método de agrupación	Medida de distancia
K-means	Euclídea al cuadrado
K-medians	
Enlace jerárquico sencillo	
Enlace jerárquico completo	
Enlace jerárquico promedio	
Enlace jerárquico por mediana	
Enlace de Ward	

Los resultados de los procedimientos *K-means y K-medians*, sólo proporcionan el grupo en que cada muestra es incluida, sin que exista una relación visible de proximidad entre unas u otras muestras.

Sin embargo, los distintos modelos de enlace, sí proporcionan un dendrograma de distancias donde es fácil apreciar visualmente la proximidad real de las diferentes muestras. La calidad de la agrupación se evaluó mediante la apreciación de los grupos finales creados, así como por la complejidad del dendrograma generado. De esta manera, dendrogramas que agrupaban las distintas muestras de manera clara antes de la distancia relativa = 4 se entendieron como adecuados.

En todos los casos de agrupación no supervisada se sugirió al software una presencia de 3 grupos en función de la densidad, 6 grupos para la fecha de corte y 3 según la dosis de abonado.

A continuación se abordó la confección de sistemas de clasificación supervisados basados en el análisis SIMCA (*Soft Independent Modelling Class Analogy*), originalmente descrito por Wold (1976), Albano *et al.* (1978) y Sharaf *et al.* (1986) y la regresión discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), inicialmente descrita por Jöreskog y Wold (1983).

En el análisis SIMCA, cada grupo es modelado por separado, asignándose las muestras en función de sus distancias a cada modelo. Así, en este análisis se modela independiente cada uno de los grupos mediante un análisis de componentes principales, determinando con ello el centroide y la dispersión de las muestras para cada grupo. La dimensión del modelo individual viene dada por el número de componentes principales que se hayan considerado.

El modelo obtenido para cada grupo se define por la distancia de las muestras al centro del modelo (denominada laverage), informando sobre la colocación de la muestra proyectada sobre los CP, y por la distancia de la muestra al modelo definido por los CP (denominada estadístico S) (Martens y Næs, 1989).

Una muestra determinada puede ser clasificada en un grupo, en varios de ellos o bien no pertenecer a ninguno de los grupos. En este último caso, las muestras que no sean clasificadas en ningún grupo, podrían dar lugar a un nuevo grupo si se confirman sus diferencias con el resto de los modelos. Dada la estructura de las muestras disponibles, se hicieron los mismos grupos que se sugirieron en la agrupación no supervisada.

Para la evaluación del modelo se estudia el porcentaje de muestras que son clasificadas correctamente en su grupo. Las muestras se clasifican en uno, o varios, grupos en función de sus distancias *leverage* y *S*. Así, si una muestra pertenece a un grupo, se le clasifica como tal. Sin embargo, si una muestra pertenece a dos grupos o bien no es asignada a ningún grupo, se clasificaría en aquella clase de la que presente menores valores de distancias *leverage* y *S*. Siendo posible definir un error de clasificación, tanto para cada uno de los grupos (porcentaje de muestra mal clasificadas de un grupo respecto al total de muestras de dicho grupo) como un error de clasificación global (porcentaje total de muestras mal agrupadas respecto al total de muestras empleadas en el desarrollo de modelos).

Una vez obtenido los modelos se realizó una validación externa, se seleccionaron diez muestras aleatorias del grupo total de muestras (588 muestras para realizar la calibración y 60 para validación) y comprobar la validez del sistema para clasificar estas muestras. (Brereton, 2009).

El último método para la clasificación de las muestras es la regresión discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), que emplea un algoritmo generalmente usado en el análisis cuantitativo multivariante. Este algoritmo genera tantas variables discriminatorias como grupos existan. Si una muestra es clasificada en un grupo se le asigna un valor de 1 y de 0 si no está incluida. Aunque con este modelo una misma muestra puede estar clasificada en más de un

grupo a la vez. Para calcular el número óptimo de componentes principales se utilizó la validación cruzada.

Una vez obtenidas las ecuaciones para la regresión discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se hizo lo mismo que con el método SIMCA respecto a las muestras para la obtención del método y para la validación externa, como indica Brereton (2009). Dado que la PLS-DA es un análisis de modelado similar al análisis SIMCA, el método de evaluación es el mencionado anteriormente para el análisis SIMCA. Como indican Garrido *et al*. (2000), estos parámetros son juzgados por diferentes estadísticos, entre los que se encuentran como más generalizado, el error de clasificación, que corresponde al porcentaje de muestras incorrectamente clasificadas por el modelo y que será el utilizado en esta investigación.

Todos los desarrollos quimiométricos y transformaciones espectrales se han realizado mediante el software The Unscrambler ®10.2 de la empresa Camo Software AS (Norway), licenciado a la Unidad de Nutrición Animal del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la UEX.

BIBLIOGRAFÍA

ALBANO C., DUNN III W., EDLAND U., JOHANSSON E., NORDEN B., SJOSTROM M. Y WOLD S. (1978) 4 levels of Pattern Recognition. *Analytica Chimica Acta*, **103**, 429-433.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) (1969) Official Method 9689.06 Protein (Crude) In Animal Feed. Dumas Method.

AOAC (2003) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical 305 Chemists (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.

BAUER A., FRANCK A.B. Y BLACK A.L. (1984) Estimation of spring leaf growth rates and anthesis from air temperature. Agronomy Journal. 76, 829-835.

BIRTH G.S. Y HECHT H.G. (1987) The Physics of Near-Infrared Reflectance. En: P. Willliams & K. Norris (eds) Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. American Association of Cereal Chemits, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

BJORSVIK H.R. Y MARTENS H. (2008) Data analysis: calibration of NIR instruments by PLS regression. En: D.A. Burns and E.W. (eds) Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd Ed). Ciurczak. CRC Press, Boca Raton, U.S.A.

BRERETON R. (2009) Chemometrics for pattern recognition. John Willey & Sons, Ltd. Chichester, United Kingdom.

CAMO (2013) The Unscrambler methods. Camo Software AS. Oslo, Norway.

DUNHAM J.R. (1998) Relative feed value measures forage quality. Forage Facts, 41.

FRANCIA E., PECCHIONI N., LI DESTRI NICOSIA O., PAOLETTA G., TAIBI L., FRANCO V., ODOARDI M., STANCA A., DELOGU G. (2006) Dual-purpose barley and oat in a Mediterranean environment. Field Crops Res. 99, 158-166.

FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL (FEDNA) (2004) Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. S. Calsamiglia, A. Ferre, A. Bach. Madrid, pp 70.

GARRIDO A., GARCÍA-OLMO J. Y DE PEDRO E. (2000) Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRs). Una metodología para implementar en sistemas de aseguramiento de la calidad y trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. Sólo Cerdo Ibérico, 4, 39-44.

GONZÁLEZ F., GÍL A., LLERA F., GONZÁLEZ J.A. Y MAYA V. (2012) Catálogo de variedades de semillas obtenidas en el centro de investigación La Orden-Valdesequera del gobierno de Extremadura. Badajoz. Extremadura. Centro de Investigación La Orden-Valdesequera.

HENNEBERG W. Y STOHMANN F. (1985) Journal Landwirtschaft 3.

INDICO PRO (2013) Analytical Spectral Devices, Inc., dba ASD

INFRASOFT INTERNATIONAL (1992) Routine operation, calibration development and network system Management manual. 335p. Infrasoft International, Port Matilda, Pennsylvania, USA.

JERANYAMA, P.; GARCÍA, A.D. (2004). Understandig Relative Feed Value (RFV) and relative Forage Quality (RFQ). Cooperative Extension Service, South Dakota State University, ExEx8149.

JIMÉNEZ J., GONZÁLEZ A. Y LÁZARO F. (1978) Estudio edafológico de la finca "La Orden". Badajoz. Extremadura. Centro de Investigación La Orden-Valdesequera.

JÖRESKOG K.Y WOLD H. (1983) Systems Under Indirect Observations, Causality/Structure/Prediction, Vols. I y II, North-Holland, Amsterdam.

KELLEMS R.O. Y CHURCH D.C. (2002) Livestock Feeds and Feeding. 5th Edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

KING J. Y SEBRANEK J. (1993) Combustion method for determining crude protein in meat and meat products. J. AOAC Internat. 76,787.

LLERA F. (1998) Influencia del n fertilizante en el NO3- - N del suelo y en el crecimiento, rendimiento y calidad del trigo duro (triticum turgidum sbsp. durum) en condiciones de regadío mediterráneas. Tesis Doctoral. ETSIA de la Universidad de Córdoba.

LLERA F., RIVERA A. Mª., CRUZ V. Y RODRIGUEZ F. (2011) Estudio de la tasa de ahijamiento y el índice de supervivencia del triticale de doble aptitud (forraje y grano). En: Pastos, paisajes culturales entre entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI (ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 353-359. España.

MARK H. (2008) Data analysis: calibration of NIR instruments by PLS regression. Boca Raton, U.S.A. En: D.A. Burns and E.WCiurczak. CRC Press, Ediciones Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd Ed).

MARTENS H. Y NAES T. (1987) Multivariate Calibration by Data Compression. In: Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Ed. P. Willliams & K. Norris. American Association of Cereal Chemits, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

PAPADAKIS J. (1966) Climates 01the World and thei-r AgriculturalPottmtialities. Editado por el autor. Av. Córdoha 4564. Buenos Aites.

RIQUIER J., BRAMAO L. Y CORNET S.P. (1970) A new system or soil appraisal in terms of actual and potential productivity: FAO Soil Resources No 38. Rome. Italy.

SHARAF M., ILLMAN D. Y KOWALSKI B. (1986) Chemometrics. En Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, volume 82. (Eds) John Wiley & Sons, p. 242. Nueva York.

SHENK, J, Y M. WESTERHAUS. (1994). The application of near infrared reflectance spectrocopy (NIRs) to forage analysis. P. 406-449. In Fahey, G.C., et al. (eds.). Forage quality, evaluation and utilization. ASA, CSSA, SSSA. Madison, Wisconsin, USA.

SPSS.PC+. (2005) SPSS Trends 14.0. SPSS Inc. Chicago. EEUU.

ZADOKS J., CHANG T. Y KONZAK C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research. 14, 415-421.

WILLIAMS, Ph. (2001). Implementation of near infrared technology. P. 145-169. In Williams, Ph., and K. Norris (eds.) Near infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemist,. St. Paul, Minnesota, USA.

WOLD S. (1976) Pattern Recognition by means of disjoint Principal Components models. Pattern Recognition, 8, 127–139.

5. Resultados y discusión

5.1. CAPÍTULO I

Calidad del forraje de triticale de doble aptitud en función de la densidad de siembra, el número de aprovechamientos y la dosis de nitrógeno

CAPÍTULO I
CALIDAD DEL FORRAJE DE TRITICALE DE DOBLE APTITUD EN FUNCIÓN DE LA DENSIDAD DE SIEMBRA, EL NÚMERO DE APROVECHAMIENTOS Y LA DOSIS DE NITRÓGENO

RESUMEN

El triticale de doble aptitud (forraje y grano) es una opción ideal para cultivarlo en la dehesa, que ocupa el 51% de la superficie agraria útil en Extremadura. El conocimiento del valor nutritivo del forraje es fundamental cuando se trata de alimentar al ganado. En este trabajo se estudió la influencia durante dos campañas (2009/2010 y 2010/2011) de la densidad de siembra, número de cortes y dosis de nitrógeno en el contenido de proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD) y valor relativo del forraje (VRF) del triticale. Para ello, se diseñó un ensayo en *split-split-plot* donde la parcela principal fue la densidad de siembra (400, 500 y 600 plantas m^{-2}), la subparcela el número de aprovechamientos (un aprovechamiento y dos aprovechamientos) y la sub-subparcela la dosis de nitrógeno (0, 75 y 125 kg N ha^{-1}). Los resultados pusieron de manifiesto la influencia del ambiente en las variables estudiadas. La densidad de siembra no influyó en ninguna de estas variables. El número de aprovechamientos (cortes) influyó significativamente en el contenido de PB y FB, disminuyendo la PB (de 21.05 % a 16.02 %) y aumentando la FB (desde 23.87 % hasta 27.21 %) al aumentar el número de cortes. El abonado nitrogenado aumentó significativamente el contenido de PB (16.67 % con 0 kg N ha^{-1} y 19.58 % con 125 kg N ha^{-1}) y produjo un ligero incremento, que fue significativo, en la FND y FAD (50.31 % a 51.99 % de FND y 29.47 % a 30.95 % de FAD, para 0 kg N ha^{-1} y 125 kg N ha^{-1}, respectivamente), en la campaña 2009/2010, provocando una disminución significativa del VRF (122.19 para 0 kg N ha^{-1} y 116.06 para 125 kg N ha^{-1}).

Palabras claves: *X Triticosecale* Wittmack, proteína, fibra, valor relativo del forraje.

INTRODUCCIÓN

La práctica desaparición de la trashumancia y la intensificación de las explotaciones han provocado que el sistema de dehesa no pueda cubrir con recursos propios más de un 56 % de las necesidades de la ganadería doméstica (Pulido y Escribano, 1994), condicionando los sistemas productivos, la adecuación y el grado de dependencia de la ganadería hacia los recursos del medio externo. Las tremendas fluctuaciones que en los últimos años ha sufrido el precio de los cereales y, por consiguiente, el de los piensos (con incrementos hasta del 40 % en algunos casos), hace que la dependencia de recursos externos al sistema suponga un verdadero riesgo para la rentabilidad de las explotaciones ganaderas asentadas en este entorno (Gil *et al*., 2009). Una alternativa a la utilización de estos recursos puede ser la introducción de cultivos forrajeros para aprovechamiento a diente o bien mediante ensilado o henificado, para su posterior utilización en épocas en las que la producción de pastos naturales no cubra las necesidades de la explotación (Francia *et al*., 2006; Gil *et al*., 2009). Llera (1997), Gil *et al*. (2011), Llera *et al*. (2011a) y Llera *et al*. (2011b) pusieron de manifiesto el interés del triticale (X *Triticosecale* Wittmack) de doble aptitud (forraje y grano) como cultivo idóneo para la dehesa, con el fin de paliar la escasez de forraje verde en la época invernal y proporcionar una cosecha de grano y paja al final de su ciclo.

Un aspecto muy importante de la producción de los cereales en la dehesa es su calidad y valor nutritivo, ya que de esto dependerá en gran parte el comportamiento productivo de los animales. Éstos requieren de una dieta compuesta por seis elementos básicos para crecer: fibra, energía, proteína, minerales, vitaminas y agua. El grano de triticale, además de sus ventajas adaptativas, posee una composición nutricional óptima en cuanto a vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales se refiere (Lorenz *et al*., 1974) y posee un alto contenido en almidón, lípidos, fibra y proteína comparado con el trigo (Dyson, 2006).

La proteína bruta (PB) es importante no sólo para el crecimiento y producción de leche sino también para el mantenimiento del animal (Hall *et al*., 2011). Un déficit implica una limitación en la producción de los animales y una menor eficacia en la utilización de la ración (De la Roza, 1994). A mayor cantidad de proteína proveniente del forraje se necesita menor cantidad de suplemento. Algunos autores (Collins *et al*., 1981; Royo, 1992 y Rinehart, 2008) señalan que es preciso establecer con claridad los niveles de fertilización nitrogenada, la edad de la planta y la relación hoja/tallo, ya que afectan de forma clara a la concentración de proteína, digestibilidad de la pared celular, a la calidad y al consumo de la materia seca del forraje.

La fibra bruta (FB) se considera la fuente principal de energía del forraje ya que los rumiantes son capaces de digerirla. La fibra, representada por sus fracciones, fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD), tiene un efecto importante sobre la

digestibilidad de la biomasa (Kozloski *et al*., 2005), ya que la reduce, descendiendo también la cantidad de ingesta por parte de los animales. La lignina ácido detergente (LAD), que aumenta según avanza el desarrollo del cultivo, está asociada a una baja digestibilidad de la materia seca (Jung y Vogel, 1986). Las gramíneas al final del ahijado emiten nuevos tallos provocando una disminución de la calidad del forraje (aumenta la FB y disminuye la digestibilidad del forraje).

El valor relativo del forraje (VRF) fue desarrollado por la American Forage and *Grassland Council* (AFGC) (Rohweder *et al*., 1978). Para su cálculo no se tiene en cuenta el contenido en proteínas del forraje y dado que la proteína es importante para determinar la calidad, debe ser considerada junto con el VRF cuando se evalúa la calidad del forraje (Dunham, 1998).

La densidad de siembra influye en la calidad de los forrajes por su influencia en el desarrollo foliar y en el rendimiento, como ponen de manifiesto Hanbury y Siddique (1999), Elizondo y Boschini (2001) y Llera *et al*. (2011b). Cusicanqui y Lauer (1999) detectaron una disminución en la calidad del forraje de maíz al aumentar la densidad de siembra.

El número de cortes influye sobre la morfología de la planta y esta a su vez influye sobre el contenido de proteína y la digestibilidad del forraje. Desde que se siembra hasta que se realiza el primer aprovechamiento y desde éste hasta el segundo aprovechamiento, la planta va creciendo y por tanto variando sus hojas, tallos y la relación entre ellos. Khorasani *et al*. (1997), Romero *et al*. (1999) y Rojas *et al*. (2004) observaron que a medida que avanza el ciclo del cultivo se observa una disminución gradual del porcentaje de PB. A mayor relación hoja/tallo mayor cantidad de proteínas en el forraje, ya que las hojas contienen mas proteínas y los tallos mas fibra (Bolton, 1962). La relación hoja/tallo disminuye con el tiempo, ya que una vez formadas todas las hojas el tallo sigue creciendo hasta alcanzar su altura definitiva. La edad de la planta afecta al contenido de proteínas: a medida que la planta crece la proteína disminuye (curva de dilución de la proteína) y lo hace más rápidamente en el tallo que en las hojas (Lemaire *et al*., 1985; Luna, 1996 y Llera *et al*., 2013). La altura de corte también puede influir en el contenido de proteínas, pues modifica la relación hoja/tallo. Las condiciones ambientales (precipitación y temperatura) afectan al ritmo de crecimiento de las plantas e influyen, junto a otros factores, en el contenido de PB y FB.

La dosis de nitrógeno afecta al desarrollo vegetativo de la planta, afectando a la calidad del forraje. Wilman y Wright (1983) y Llera *et al*. (2011b) observaron variaciones en el contenido de PB y FB en los forrajes al variar la cantidad de nitrógeno aplicado. El nitrógeno influye en el rendimiento del forraje y éste a su vez afecta a la calidad del mismo, como estudiaron Llera (1998) y Muñoz-Guerra *et al*. (2006), ya que aumenta el índice de área foliar (IAF), modificando la relación hoja/tallo ocasionando un aumento de la PB (Llera, 1998).

El objetivo de este estudio ha consistido en establecer la influencia de la densidad de siembra, el número de cortes y la dosis de nitrógeno sobre el contenido de PB, FB, FND, FAD, LAD y VRF del triticale de doble aptitud (forraje y grano), cv `Verato´.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011, en una parcela de la finca La Orden perteneciente al CICYTEX, propiedad del Gobierno de Extremadura, del término municipal de Guadajira (Badajoz), en condiciones de secano. El suelo, clasificado como Alfisol, presentó una textura franco-arenosa con un bajo porcentaje en materia orgánica oxidable (0.61 %), un pH neutro (6.97), una CIC muy baja (6.12 meq 100 g^{-1}) y un contenido normal en fósforo asimilable (12.89 ppm).

El material vegetal utilizado fue un triticale de doble aptitud (forraje y grano), cv `Verato´, obtenido por el Departamento de Cultivos Extensivos del Instituto de Investigación Agraria "La Orden-Valdesequera". Las labores preparatorias del primer año de ensayo consistieron en un pase cruzado de grada de disco sobre un rastrojo de cereal y otro pase de rotovator. El segundo año se hizo un pase de subsolador, uno de grada y por último se paso un rotovator.

Para la siembra se utilizó una sembradora de chorrillo con 6 botas separadas 20 cm y se sembró el 28/10/2009 y el 19/10/2010.

No se realizó ningún tipo de tratamiento fitosanitario en ninguna de las dos campañas. Los distintos abonados realizados se resumen en la tabla 1.

Como los estudios realizados por Francia *et al*. (2006) pusieron de manifiesto que no existen diferencias significativas entre el pastoreo simulado (cortes) y el pastoreo directo del forraje, se realizaron dos pastoreos simulados (cortes), utilizando una segadora manual de peine frontal con cuchillas alternativas, que realizaba el corte en la planta a una altura de 2-3 cm para el primer corte y de 6-7 cm para el segundo.

Tabla 1. Cantidades y tipos de fertilizantes utilizados en el abonado de fondo y en el abonado de cobertera (kg ha^{-1})

	Abonado de Fondo			1ª Cobertera	2ª Cobertera
	N	P_2O_5	K_2O	N	N
Tratamiento	Sulfato amónico del 21%	Superfosfato cálcico del 18%	Cloruro potásico del 60%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%
N2 = 125 kg N ha^{-1}	50	42	90	50	25
N1 = 75 kg N ha^{-1}	25	42	90	50	0
N0 = 0 kg N ha^{-1}	0	42	90	0	0

El diseño estadístico fue un *split split plot* con cuatro repeticiones, siendo la parcela principal la densidad de siembra ((D1-400 plantas m^{-2} (160 kg ha^{-1}), D2-500 plantas m^{-2} (200 kg ha^{-1}) y D3-600 plantas m^{-2} (240 kg ha^{-1})), la subparcela el número de cortes (C1- Un corte y C2-Dos Cortes) y la sub-subparcela las dosis de nitrógeno aplicadas antes de la siembra, después del primer corte y después del segundo corte (N0-SIN nitrógeno (0-0-0), N1-75 kg N ha^{-1} (25-50-0) y N2-125 kg N ha^{-1} (50-50-25)). La unidad experimental estaba constituida por dos parcelas de 1.5 m de ancho y 10 m de longitud, utilizando una de ellas para los muestreos destructivos. Se tomaron dos muestras de forraje de 0.25 m^2, antes de los distintos aprovechamientos, como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Fechas en que se realizaron los aprovechamientos

Campaña	Aprovechamiento	Fecha
2009/2010	1º Aprovechamiento	18/01/2010
	2º Aprovechamiento	10/03/2010
2010/2011	1º Aprovechamiento	17/01/2011
	2º Aprovechamiento	03/03/2011

Las muestras tomadas se secaron en una estufa a 105 °C durante 48 horas (RD 2257/1994) para determinar el peso seco de la parte aérea de la planta y, posteriormente, fueron molidas para obtener la concentración de nitrógeno por el método LECO®/DUMAS (AOAC, 1969). La PB se calculó según la fórmula [N x 6.25].

Para la obtención de FB, FND, FAD y LAD se utilizó un analizador de fibra ANKOM, empleándose el método oficial AOCS (2003).

Linn *et al.* (1987) desarrollaron uno de los índices de calidad de forrajes más utilizado: el Valor Relativo de Forrajes (VRF), el cual es aceptado por la NFTA (Undersander *et al*., 1993) como el indicador oficial del valor nutritivo de los forraje en los Estados Unidos. El valor obtenido es un índice que no tiene unidades, pero permite comparar la calidad (entendida como la capacidad de un forraje de generar una respuesta productiva) de leguminosas, gramíneas y sus mezclas, bien sean en fresco, ensiladas o henificadas (Calsamiglia, 1997; Teixeira y De Andrade, 2001 y Moore y Undersander, 2002).

El VRF se calculó siguiendo el método propuesto por Dunham (1998), mediante la estimación de la materia seca digestible (MSD) y el consumo de materia seca (CMS) a partir de las siguientes ecuaciones:

- MSD = 88,9 – (0,779 x %FAD) (%MS)
- CMS = 120 / %FND (% PV)
- VRF = (MSD x CMS) / 1,29

Jeranyama y García (2004) advierten de la existencia de algunas limitaciones en el uso del VRF:

- CMS y MSD se asumen constantes para todos los forrajes.
- FND y FAD son los únicos valores de laboratorio usados para el cálculo.
- La proteína del forraje no se utiliza. Por esta razón se propone tenerla en cuenta y para ello se sugiere un valor del contenido en proteína del 15% para diferenciar una calidad de 1ª de una de 2ª. Se ha tomado este valor porque es el que se exige a la alfalfa para ser comercializada con destino a la alimentación animal (Art.3 Reglamento (CE) 382/2005).
- VRF no puede ser utilizado en la formulación de raciones o en su evaluación.

La Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA, 2004) utiliza este índice y clasifica la calidad del forraje en seis tipos (tabla 3).

Tabla 3. Calidad del forraje según el VRF

Calidad del forraje	VRF	Calidad del forraje	VRF
Excelente	>151	**Tercera**	87-102
Primera	125-151	**Cuarta**	75-86
Segunda	103-124	**Quinta**	<75

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza para determinar el efecto de la densidad de siembra, el número de aprovechamientos y la dosis de nitrógeno, así como el efecto campaña y uno de efecto aleatorio (repeticiones), sobre los contenidos de PB, FB, FND, FAD, LAD y VRF del forraje de triticale, utilizando el paquete estadístico SPSS-PC+ (2005). Mediante este diseño se determinó el efecto de los factores fijos (incluida la campaña) para cada una de las variables dependientes estudiadas. El test de Tukey se aplicó posteriormente para comparar las medias entre cada uno de los grupos, cuando el ANOVA fue significativo ($p<0.05$).

En cada análisis se calculó el coeficiente de variación para estimar la magnitud del error experimental. Para conocer las relaciones entre algunos de los parámetros estudiados se estudiaron las correlaciones bivariadas de Pearson y regresiones lineales simples.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Climatología

En la tabla 4 se presentan los principales datos climatológicos de las dos campañas.

Las precipitaciones totales de la campaña 2009/2010 superaron a las de la campaña 2010/2011 en 127 mm, aunque en ninguna de las dos campañas el agua caída supuso una limitación para el buen desarrollo del triticale.

Las precipitaciones en el periodo desde siembra hasta el 1º aprovechamiento fueron superiores en la campaña 2009/2010 en 27 mm y desde el 1º al 2º aprovechamiento también, pero en este periodo la diferencia fue mucho mayor, alcanzando los 171 mm.

Tabla 4. Principales variables climatológicas de las campañas 2009/2010 y 2010/2011

Campaña	Período	P.T. (mm)	P (mm)	GDT (ºC)	GD (ºC) (Tmedia ºC)
	Siembra-1 Corte		304		922 (11.24)
2009/2010		666		3629	
	1 Corte-2 Corte		218		488 (9.57)
	Siembra-1 Corte		277		852 (10.65)
2010/2011		539		3128	
	1 Corte-2 Corte		47		368 (8.17)

P.T. = Precipitación desde siembra a recolección, **P** = precipitación en el período considerado, **GDT** = Grados día desde siembra a recolección y **G.D.** = Grados día en el período.

Los grados día (GD) desde siembra hasta el 1º aprovechamiento y desde el 1º al 2º aprovechamiento fueron superiores en la campaña 2009/2010 en 70 ºC y 120 ºC respectivamente.

Se puede decir que las precipitaciones de las dos campañas estuvieron por encima de la media, aunque en la campaña 2009/2010 la precipitación entre los dos aprovechamientos fue muy superior a la de la campaña 2010/2011. También se aprecia que la campaña 2009/2010 fue mas cálida que la campaña 2010/2011, con una temperatura media en el período de siembra al 1º aprovechamiento y en el período del 1º al 2º aprovechamiento superior en 0.59 ºC y 1.4 ºC, respectivamente.

Proteína Bruta

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos para la proteína bruta. La densidad de siembra no influyó significativamente en el contenido de proteína bruta, mientras que la campaña, el número de aprovechamientos y la dosis de abonado nitrogenado sí influyeron significativamente. Ninguna de las interacciones estudiadas en el análisis resultó significativa.

El contenido de proteína muestra diferencias significativas entre las dos campañas del estudio, siendo superior en la campaña 2010/2011 con un 21.20 % frente a 15.87 % obtenido en la campaña 2009/2010. Terman *et al*. (1969), Robinson *et al*. (1979), García *et al*. (1985), Rao *et al*. (1993) y Satorre y Slafer (1999) indican que se produce un aumento de proteína cuando se reduce la cantidad de agua disponible para el cultivo. El estrés hídrico estimula la absorción y asimilación del nitrógeno del suelo, y la movilización del mismo en la planta.

Las precipitaciones en el periodo desde la siembra hasta el 1º aprovechamiento fueron superiores en la campaña 2009/2010 en 27 mm y desde el 1º al 2º aprovechamiento también, pero en este periodo la diferencia fue mucho mayor, alcanzando los 171 mm. Estas diferencias pudieron provocar una disminución del potencial productivo y un aumento de la calidad en la campaña 2010/2011 y podrían justificar el hecho de que en la campaña 2010/2011 los niveles de proteína fueran superiores a los de la campaña 2009/2010.

Otro factor a tener en cuenta es la temperatura. En la campaña 2009/2010, la temperatura media fue superior a la de la campaña 2010/2011 en los dos períodos estudiados, lo que pudo favorecer el aumento del contenido de FB, FND y LAD, variables que tienen una fuerte relación negativa con la PB. Soest (1998) indica que la celulosa y la lignina tienden a aumentar conforme aumenta la temperatura y la luz solar, lo que provoca un descenso de la PB debido a su relación negativa con la FND y sobre todo con la FB y LAD, con las que tiene una relación negativa altamente significativa (tabla 11).

Tabla 5.Análisis del contenido de PB en función de la densidad de siembra, número de aprovechamientos y dosis de abonado nitrogenado, por campaña y en la media de las dos campañas

	PB (%)		
	Campaña		
	2009/2010	2010/2011	Media
Densidad (plantas m^{-2})			
400	15.73 a	21.80 a	18.77 a
500	15.51 a	21.04 a	18.27 a
600	16.37 a	20.77 a	18.57 a
Aprovechamiento			
1 aprovechamiento	18.58 a	23.53 a	21.05 a
2 aprovechamientos	13.16 b	18.87 b	16.02 b
Nitrógeno (kg N ha^{-1})			
0	13.56 b	19.77 b	16.67 b
75	16.95 a	21.78 a	19.37 a
125	17.10 a	22.05 a	19.58 a
Media	15.87 b	21.20 a	18.54
C.V. (%)	9.94	14.42	14.22
Significación			
Campaña (C)			***
Densidad (D)	N.S	N.S	N.S
CxD			N.S
Apovechamiento (A)	***	***	***
CxA			N.S
DxA	N.S	N.S	N.S
CxDxA			N.S
Nitrógeno (N)	**	*	**
CxN			N.S
DxN	N.S	N.S	N.S
AxN	N.S	N.S	N.S
CxDxN			N.S
CxAxN			N.S
CxDxAxN			N.S
DxAxN	N.S	N.S	N.S

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.
N.S: no significativo

La densidad de siembra no provocó diferencias significativas en el contenido de PB. Autores como Elizondo y Boschini (2001) tampoco encontraron diferencias significativas en el contenido de PB al variar las densidades de siembra en otros cultivos forrajeros. El hecho de que no se hayan producido diferencias significativas entre las tres densidades de siembra ensayadas ha podido deberse a que las lluvias acaecidas en ambas campañas desde siembra hasta el primer aprovechamiento no fueron limitantes (304 mm en 2009/2010 y 277 mm en 2010/2011), permitiendo un buen desarrollo foliar en la densidad de siembra más baja. Hanbury

y Siddique (1999) indican que las densidades de siembra más bajas se pueden utilizar cuando las condiciones son más favorables (mayores precipitaciones), donde los entornos de las plantas tienen una mejor oportunidad de expresar su potencial de rendimiento individual; Fagnano *et al.* (1998) obtuvieron resultados muy similares. Otros autores como Regan *et al*. (2005) y Hanbury *et al.* (2005) también aconsejan menores densidades de siembra en regiones donde las plantas tienen mejor oportunidad de expresar su potencial productivo. En las mismas condiciones que en las del ensayo, Llera *et al*. (2011ª) no encontraron diferencias en el rebrote del triticale para las distintas densidades utilizadas, quizás debido a las mismas causas.

El aprovechamiento afectó de forma altamente significativa al contenido de proteína bruta. Del primer al segundo corte se produce una disminución importante, pasando de 18.58 % al 13.16 % en la campaña 2009/2010 y de 28.53 % al 18.87 % en la campaña 2010/2011. Estos valores de proteína son superiores a los citados por Delogu *et al*. (2002), Rojas *et al*. (2004) y Lithourgidis *et al*. (2006) y similares a los que indica Carrasco *et al*. (1999), Llera *et al*. (1999) y Morales (2011), en unas condiciones climatológicas similares a las del ensayo.

Fernández *et al*. (1991) estudiaron la influencia del número de aprovechamientos en la calidad nutritiva del pasto, concluyendo que a medida que aumenta el número de aprovechamientos disminuye la calidad del forraje, como consecuencia de la disminución del contenido de proteína bruta y el aumento de la fibra neutro detergente, que provoca la disminución de la digestibilidad del forraje.

Flipot *et al*. (1984), Droushiotis (1985), Khorasani *et al*. (1997), Romero *et al*. (1999), Rojas *et al*. (2004) y Hargreaves *et al*. (2009) observaron una disminución de la proteína en la biomasa del forraje a medida que avanzaba el ciclo del cultivo, debido probablemente a la diferenciación de sus órganos (hojas, tallo y espiga). Esta disminución de la concentración de proteína con el tiempo (aumento de la biomasa) se atriibuye a una disminución en la fracción de N total de la planta asociado con la fotosíntesis (hojas) y con un aumento de la fracción N de los constituyentes estructurales y de almacenamiento (tallos) lo que provoca que la relación hoja/tallo disminuya con la edad de la planta (Caloin y Yu, 1984 y Lemaire *et al.*, 1992).

Morales *et al.* (2010) comprobaron que el contenido en proteína de la biomasa en triticales y avenas se vio influido por el número de cortes, encontrando siempre mayor contenido en proteína cuanto más temprano se efectuaban los cortes. Llera *et al*. (2012) observaron que la producción de proteína disminuía a medida que aumentaba el número de cortes. También reconocieron la existencia de una relación negativa entre el porcentaje de proteína bruta y la producción de biomasa del cultivo, es lo que se denomina curva de dilución de la proteína. Estas curvas de dilución de la proteína se ven afectadas por las variaciones del ambiente (localización, climatología, etc) y las técnicas de cultivo (dosis de fertilización nitrogenada, número de cortes, etc.). Anslow (1966) y Saroff *et al*. (2003) estudiaron la tasa de

aparición y elongación de las hojas después del pastoreo y encontraron que éstas eran menores a medida que se producían más cortes. Esto lleva a pensar que en el segundo corte se puede producir una disminución del volumen de hojas y consecuentemente, una disminución del contenido de proteínas. Llera *et al.* (2011b) comprobaron que el número de hijos disminuía al aumentar el número de cortes y con ello la superficie foliar, lo que unido al estado más avanzado del cultivo provoca este descenso en el contenido de proteínas (Llera *et al*., 2013). Como las hojas son los órganos con mayor contenido de proteínas, es posible que si se aumentara el período entre cortes la relación hoja/tallo podría aumentar, y con ello el contenido de proteína, pero al ser un triticale de doble aptitud (forraje y grano) el pastoreo no debe realizarse después del estado 30 de la escala de Zadoks *et al*. (1974) (final del ahijado), ya que se vería comprometida la producción de espigas y por tanto, el rendimiento en grano.

La dosis de abonado nitrogenado influyó positiva y significativamente sobre el contenido de proteína bruta, pero sólo existieron diferencias entre la dosis testigo (0 kg N ha^{-1}) y las otras dos (75 y 125 kg N ha^{-1}), entre las que no se observaron diferencias significativas en ambas campañas (2009/2010 y 2010/2011) y en la campaña media. Nuñez *et al.* (2005) también encontraron una relación directa entre la cantidad de abonado nitrogenado aplicado y el contenido de proteína en el triticale para forraje. Llera *et al*. (2011ª) señalan que para una rápida regeneración del área foliar y para que se produzca un buen rebrote es imprescindible la aplicación de nitrógeno después del corte.

Collins *et al*. (1981) indican que el nitrógeno aumenta la cantidad y calidad de la materia seca del pasto como los carbohidratos no estructurales, fósforo, potasio y magnesio. Wilman y Wright (1983) en Inglaterra, utilizando los valores medios de 32 ensayos, comprobaron que al pasar de 0 a 100 kg N ha^{-1} se producía un aumento del porcentaje de proteína y de 100 a 200 kg N ha^{-1}, el aumento fue mayor. En este trabajo de investigación se puede comprobar que por encima de 75 kg N ha^{-1}no se obtiene un aumento estadísticamente significativo en el contenido de proteína bruta. Llera *et al*. (2011ª) determinaron, en estas mismas condiciones, que al incrementar la dosis de nitrógeno de 0 kg N ha^{-1} a 75 kg N ha^{-1} aumentaba la capacidad de rebrote del cultivo, lo que mejoraba la relación hoja/tallo y por tanto, el contenido en PB del forraje, mientras que al pasar de 75 kg N ha^{-1} a 125 kg N ha^{-1} no encontraron diferencias significativas en el rebrote.

Es un hecho repetidamente observado que en los cereales de invierno existe una respuesta positiva a la aplicación de nitrógeno hasta un cierto límite (Llera, 1998 y Muñoz-Guerra *et al*., 2006), ya que en determinadas zonas por encima de éste no se consigue aumentar el rendimiento, incluso disminuye en muchos de los casos (González y Salas, 1993; Llera, 1998 y Pérez *et al*., 2008).

Fibra

El contenido de FB, FND, FAD y LAD obtenidos son ligeramente inferiores a los conseguidos por Bejar y Ammar (2007) o Morales (2011), pero próximos a los obtenidos por Mergoum *et al*. (1999) y Llera *et al*. (2013).

Fibra Bruta

El porcentaje de FB de la primera campaña (2009/2010) no mostró diferencias significativas para la densidad de siembra, nº de aprovechamientos y dosis de nitrógeno, y tampoco fueron significativas ninguna de las interacciones. Sin embargo, en la segunda campaña (2010/2011), el análisis es significativo para la densidad de siembra, el nº de aprovechamientos y su interacción. En la campaña media resultaron significativos la campaña, la densidad, el aprovechamiento y la interacción campaña por aprovechamiento. Hay que destacar que la dosis de nitrógeno no tuvo ninguna influencia en el porcentaje de FB en ninguna de las campañas ni en la media (tabla 6).

El ambiente también resultó significativo para la FB. En la primera campaña se obtuvo un valor de FB superior (26.61 %) al de la segunda campaña (24.48 %), justo lo contrario que sucedió con la concentración de proteína, con la que tiene una relación negativa y altamente significativa, como se puede observar el la figura 1 y tabla 11. Cuando se supera la temperatura óptima de un cultivo, éste utiliza mecanismos estructurales para reducir los efectos del estrés por altas temperaturas, aumentando el contenido de la pared celular, es decir la fibra y en especial el contenido de lignina.

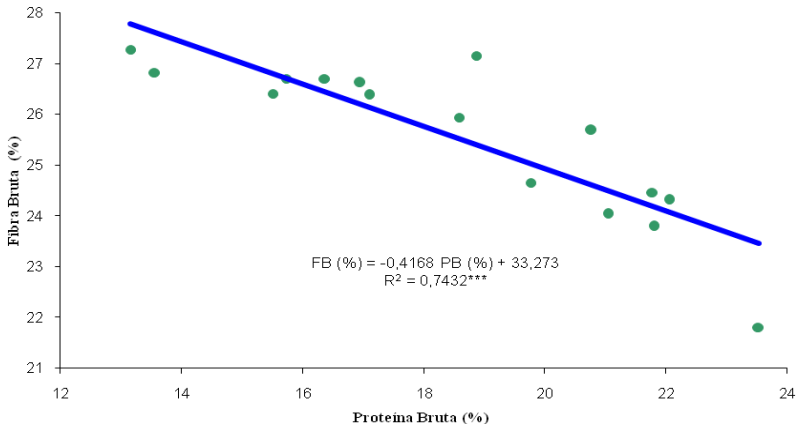


Figura 1. Relación entre la FB (%) y la PB (%) del forraje de triticale

Tanto en la campaña 2010/2011 como en la campaña media, el porcentaje de FB fue inferior significativamente en las densidades menores (400 y 500 plantas m^{-2}) respecto al obtenido con la densidad mayor (600 plantas m^{-2}). Esto pudo deberse a que en la densidades

más bajas (400 y 500 plantas m^{-2}) la relación hoja/tallo fue mayor provocando un mayor contenido en PB y en consecuencia, un menor porcentaje de FB. En densidades altas, cuando el cultivo se cierra, la iluminación de las hojas inferiores es menor y suele provocar caída de hojas, modificando la relación hoja/tallo en sentido negativo, es decir, disminuyéndola y en consecuencia aumentando la cantidad de fibra del forraje.

Elizondo y Boschini (2001) no encontraron diferencias en el porcentaje de FB al variar las densidades de siembra. Funaro y Paccapelo (2005) encontraron una mejor respuesta forrajera en la densidad más baja, donde se obtuvo un mayor rendimiento de planta completa y de hojas. Sin embargo, Cusicanqui y Lauer (1999) detectaron aumentos en el contenido de FB y reducciones de la digestibilidad al aumentar la densidad de siembra en un forraje de maíz.

El número de aprovechamientos en la campaña 2010/2011 y en la campaña media afectó significativamente al porcentaje de FB. Las parcelas que se aprovecharon una sola vez tienen un porcentaje de FB inferior a las que se aprovecharon dos veces (tabla 6). Esto pudo ser debido la influencia de la edad de la planta, pues en el primer aprovechamiento las plantas apenas tienen tallos y la relación hoja/tallo es mayor. A medida que avanza el desarrollo del cultivo la planta comienza a desarrollar los tallos y la relación hoja/tallo disminuye favoreciendo el aumento de la FB, que se encuentra en mayor porcentaje en los tallos. Además, después del primer aprovechamiento se produce el rebrote del cultivo y este rebrote está constituido por hojas y tallos, pero con mayor proporción de tallos, ya que para que la planta elabore nuevas hojas es necesario que estén formados los tallos, implicando que en el segundo aprovechamiento la relación hoja/tallo es menor, provocando un aumento de la FB.

En la figura 2 se muestra la interacción campaña por aprovechamiento. Se observa que en el primer aprovechamiento el valor de la FB de la campaña 2009/2010 es superior significativamente al de la campaña 2010/2011. En el segundo aprovechamiento no parece tener influencia la campaña, ya que los valores obtenidos son prácticamente iguales. En las dos campañas los valores del segundo aprovechamiento son superiores y significativamente distintos de los del primer aprovechamiento.

Tabla 6. Análisis del contenido de FB en función de la densidad de siembra, número de aprovechamientos y dosis de abonado nitrogenado, por campaña y en la media de las dos campañas

	FB (%)					
	Campaña					
	2009/2010		2010/2011		Media	
Densidad (plantas m^{-2})						
400	26.70	a	23.71	b	25.21	b
500	26.41	a	24.04	b	25.23	b
600	26.70	a	25.69	a	26.20	a
Aprovechamiento						
1 aprovechamiento	25.94	a	21.81	b	23.87	b
2 aprovechamientos	27.27	a	27.15	a	27.21	a
Nitrógeno (kg N ha^{-1})						
0	26.82	a	24.65	a	25.74	a
75	26.62	a	24.46	a	25.54	a
125	26.38	a	24.32	a	25.35	a
Media	26.61	a	24.48	b	25.54	
C.V. (%)	7.27		6.84		8.92	
Significación						
Campaña (C)					***	
Densidad (D)	N.S		***		*	
CxD					N.S	
Apovechamiento (A)	N.S		***		***	
CxA					***	
DxA	N.S		**		N.S	
CxDxA					N.S	
Nitrógeno (N)	N.S		N.S		N.S	
CxN					N.S	
DxN	N.S		N.S		N.S	
AxN	N.S		N.S		N.S	
CxDxN					N.S	
CxAxN					N.S	
CxDxAxN					N.S	
DxAxN	N.S		N.S		N.S	

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.
N.S: no significativo

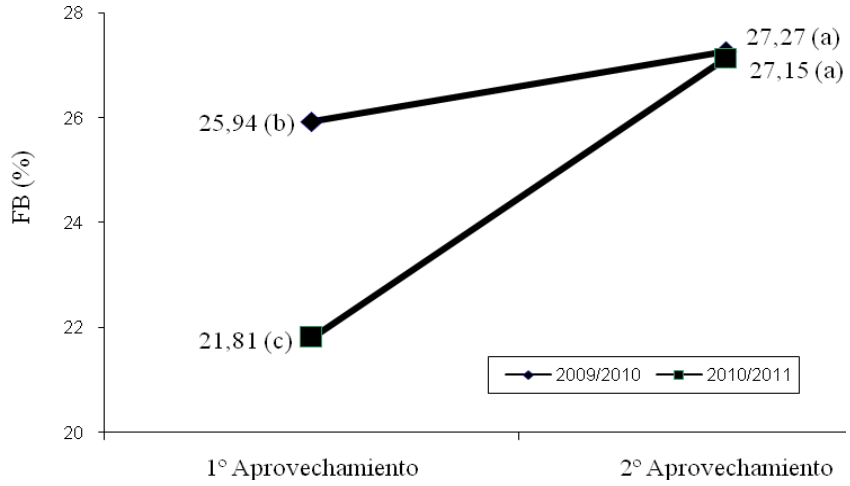


Figura 2. Influencia de la interacción campaña por aprovechamiento en el contenido de FB (%) del forraje de triticale

En la figura 3 se observa que en el primer aprovechamiento no existen diferencias significativas entre las tres densidades de plantas. En el segundo aprovechamiento, la densidad de 600 plantas m^{-2} obtiene un valor superior a las otras dos densidades, entre las que no se observaron diferencias significativas. Los valores de la FB del segundo aprovechamiento para las tres densidades de plantas son superiores significativamente a los del primer aprovechamiento. Esto pone de manifiesto que a medida que la planta se desarrolla la FB aumenta, debido al crecimiento del tallo y a que la superficie foliar crece en menor cuantía, como se ha indicado anteriormente. El hecho de que en el segundo aprovechamiento la densidad mayor (600 plantas m^{-2}) obtenga un valor de FB superior se debe, como ya se ha explicado, a que la relación hoja/tallo es inferior, debido a la caída de hojas producida por una iluminación deficiente de las hojas inferiores.

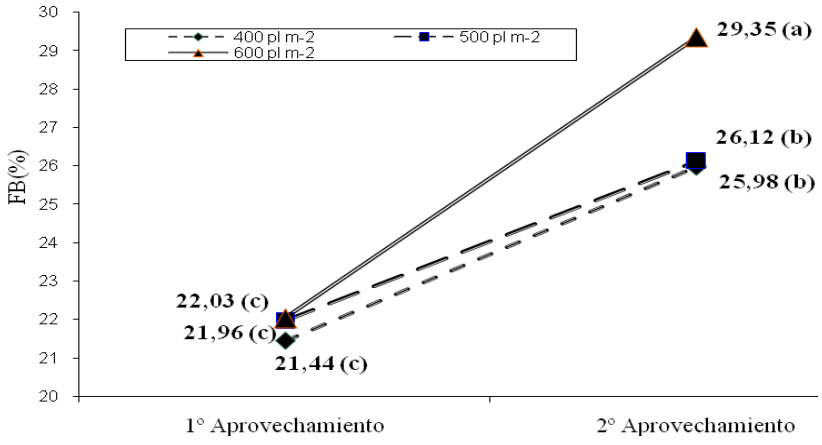


Figura 3. Influencia de la interacción densidad de plantas por aprovechamiento en el contenido de FB (%) del forraje de triticale

Fibra Neutro Detergente

Los resultados de la FND se muestran en la tabla 7. En la campaña 2009/2010 solo es significativa la dosis de nitrógeno, observándose que el tratamiento sin nitrógeno fue significativamente inferior a los otros dos. En la campaña 2010/2011 no se observó ninguna significación. La campaña media mostró un efecto significativo del ambiente y del aprovechamiento, obteniéndose un valor superior en la primera campaña y en el primer aprovechamiento.

El efecto del ambiente influyó significativamente en el contenido de FND, siendo superior en la primera campaña (2009/2010), debido posiblemente a las mismas razones que se han esgrimido para la FB.

La densidad de siembra no resultó significativa. Llera *et al*. (2013) tampoco encontraron influencia significativa de la densidad de siembra en el contenido de FND en el triticale.

La dosis de nitrógeno provocó un aumento significativo al pasar de 0 a 75 kg N ha^{-1}, para disminuir después en la dosis de 125 kg N ha^{-1}, aunque este descenso no fue significativo. Algo similar le ocurrió a Wilman y Wright (1983) que observaron un ligero aumento en los componentes de la fracción fibra al pasar de 0 a 80 kg N ha^{-1} para posteriormente disminuir en la dosis más elevada de 120 kg N ha^{-1}.

Caballero y Goicoechea (1980) en otros forrajes observaron que la fracción fibra no parece estar influida por la fertilización nitrogenada.

Sólo en la campaña media se observan diferencias significativas entre los dos aprovechamientos, siendo el contenido de FND superior en el primero. Contrariamente a los resultados obtenidos, Jung y Deetz (1993) comprobaron que la concentración de FND aumenta en forrajes obtenidos al final del ciclo del cultivo. Sánchez (2010) utilizando distintas fechas de corte (febrero, abril y mayo) encontró diferencias significativas en el contenido de FND entre los tres cortes, incrementándose de 38.70 % a 42.90 % y 48.80 %, respectivamente. Morales (2011) con diferentes variedades de triticale forrajero observó esta misma tendencia.

Tabla 7. Análisis del contenido de FND en función de la densidad de siembra, número de aprovechamientos y dosis de abonado nitrogenado, por campaña y en la media de las dos campañas

	FND (%)					
	Campaña					
	2009/2010		2010/2011		Media	
Densidad (plantas m^{-2})						
400	51.01	a	48.90	a	49.96	a
500	51.45	a	49.50	a	50.45	a
600	51.88	a	50.20	a	51.04	a
Aprovechamiento						
1 aprovechamiento	51.76	a	50.60	a	51.17	a
2 aprovechamientos	51.14	a	48.50	a	49.80	b
Nitrógeno (kg N ha^{-1})						
0	50.31	b	49.30	a	49.82	a
75	52.04	a	49.70	a	50.89	a
125	51.99	a	49.50	a	50.73	a
Media	51.45	a	49.52	b	50.48	
C.V. (%)	3.40		5.10		5.63	
Significación						
Campaña (C)					***	
Densidad (D)	N.S		N.S		N.S	
CxD					N.S	
Aprovechamiento (A)	N.S		N.S		*	
CxA					N.S	
DxA	N.S		N.S		N.S	
CxDxA					N.S	
Nitrógeno (N)	*		N.S		N.S	
CxN					N.S	
DxN	N.S		N.S		N.S	
AxN	N.S		N.S		N.S	
CxDxN					N.S	
CxAxN					N.S	
CxDxAxN					N.S	
DxAxN	N.S		N.S		N.S	

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.
N.S: no significativo

Fibra Ácido Detergente

En la tabla 8 se muestran los resultados para la FAD. El ensayo sólo fue significativo para la dosis de nitrógeno en la primera campaña y en la media y para la interacción número de aprovechamiento por dosis de nitrógeno en la primera campaña. La campaña, la densidad de siembra y el nº de aprovechamientos no fueron significativos.

Tanto en la campaña 2009/2010 como en la campaña media, la influencia de la dosis de nitrógeno sobre la concentración de la FAD es positiva, es decir, aumenta al aumentar la dosis

de nitrógeno y solo se observan diferencias significativas entre el tratamiento sin nitrógeno (0 kg N ha^{-1}) y la dosis mayor (125 kg N ha^{-1}).

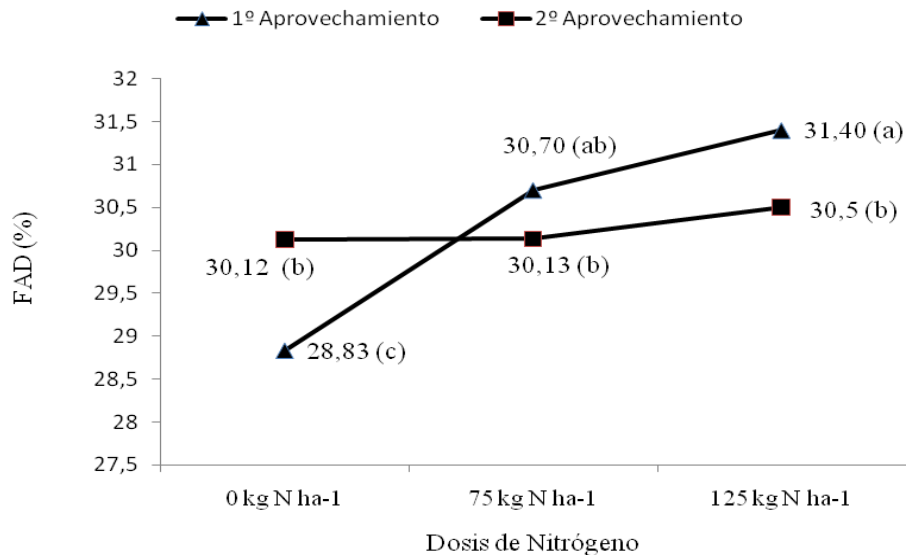


Figura 4. Influencia de la interacción aprovechamiento por dosis de nitrógeno sobre el contenido de FAD del forraje de triticale. Campaña 2009/2010

La figura 4 muestra la interacción entre el nº de aprovechamientos y la dosis de nitrógeno. Se observa que en el primer aprovechamiento las dosis de nitrógeno superiores (75 kg N ha^{-1}y 125 kg N ha^{-1}) muestran diferencias significativas respecto al tratamiento sin abonado. En el segundo aprovechamiento no se observan diferencias entre las tres dosis de nitrógeno aplicadas. Analizando las dosis de nitrógeno se aprecia que en la dosis sin abonado nitrogenado, la FAD es significativamente mayor en el segundo aprovechamiento, mientras que en las otras dos dosis de nitrógeno sucede lo contrario, aunque sólo se muestran diferencias significativas en la dosis más alta (125 kg N ha^{-1}). El hecho de que en el segundo aprovechamiento no se observen diferencias significativas entre las tres dosis de nitrógeno puede ser debido a que la materia orgánica del suelo ha comenzado a mineralizarse y a liberar nitrógeno y por tanto, la planta ya no se encuentra desabastecida de nitrógeno.

Tabla 8. Análisis del contenido de FAD en función de la densidad de siembra, número de aprovechamientos y dosis de abonado nitrogenado, por campaña y en la media de las dos campañas

	FAD (%)					
	Campaña					
	2009/2010		2010/2011		Media	
Densidad (plantas m^{-2})						
400	30.01	a	29.78	a	29.89	a
500	30.48	a	29.74	a	30.11	a
600	30.34	a	29.65	a	29.99	a
Aprovechamiento						
1 aprovechamiento	30.31	a	30.51	a	30.41	a
2 aprovechamientos	30.25	a	28.93	a	29.59	a
Nitrógeno (kg N ha^{-1})						
0	29.47	b	29.69	a	29.58	b
75	30.41	ab	29.34	a	29.87	ab
125	30.95	a	30.14	a	30.54	a
Media	30.28		29.72		29.99	
C.V. (%)	6.40		6.75		7.91	
Significación						
Campaña (C)					N.S	
Densidad (D)	N.S		N.S		N.S	
CxD					N.S	
Aprovechamiento (A)	N.S		N.S		N.S	
CxA					N.S	
DxA	N.S		N.S		N.S	
CxDxA					N.S	
Nitrógeno (N)	*		N.S		*	
CxN					N.S	
DxN	N.S		N.S		N.S	
AxN	**		N.S		N.S	
CxDxN					N.S	
CxAxN					N.S	
CxDxAxN					N.S	
DxAxN	N.S		N.S		N.S	

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.
N.S: no significativo

Lignina Ácido detergente

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para LAD. En la segunda campaña muestra significación el número de aprovechamientos y la interacción densidad de plantas por número de aprovechamientos. En la campaña media resulta significativa la campaña y las interacciones campaña por aprovechamiento y densidad de plantas por aprovechamiento, aunque esta última interacción no muestra diferencias significativas entre sus medias.

Tabla 9. Análisis del contenido de LAD en función de la densidad de siembra, número de aprovechamientos y dosis de abonado nitrogenado, por campaña y en la media de las dos campañas

	LAD					
	Campaña					
	2009/2010		2010/2011		Media	
Densidad (plantas m^{-2})						
400	9.39	a	7.24	a	8.32	a
500	9.67	a	7.78	a	8.73	a
600	9.64	a	7.59	a	8.61	a
Aprovechamiento						
1 aprovechamiento	9.73	a	6.41	b	8.07	a
2 aprovechamientos	9.40	a	8.67	a	9.03	a
Nitrógeno (kg N ha^{-1})						
0	10.07	a	7.32	a	8.70	a
75	9.20	a	7.30	a	8.25	a
125	9.43	a	799	a	8.71	a
Media	9.56	a	7.54	b	8.55	
C.V. (%)	28.71		15.66		25.98	
Significación						
Campaña (C)					***	
Densidad (D)	N.S		N.S		N.S	
CxD					N.S	
Aprovechamiento (A)	N.S		**		N.S	
CxA					***	
DxA	N.S		***		*	
CxDxA					N.S	
Nitrógeno (N)	N.S		N.S		N.S	
CxN					N.S	
DxN	N.S		N.S		N.S	
AxN	N.S		N.S		N.S	
CxDxN					N.S	
CxAxN					N.S	
CxDxAxN					N.S	
DxAxN	N.S		N.S		N.S	

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.
N.S: no significativo

Como ya ha ocurrido al estudiar la FB y FND, el efecto del ambiente es significativo también para la LAD y en el mismo sentido que en los casos anteriores, es decir la campaña 2009/2010 alcanza un valor superior a la campaña 2010/2011.

El aprovechamiento muestra diferencias significativas al pasar de uno a dos aprovechamientos, aumentando el contenido de LAD de 6.41 % a 8.67 % en la segunda campaña. Este incremento podría ser debido a que uno de los mecanismos de defensa a las agresiones físicas en los vegetales, como el aprovechamiento del forraje por herbívoros, es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas, como indica Madriz

(2002), y una de estas sustancias puede ser la lignina que se acumula en grandes cantidades y de forma localizada en los tejidos atacados.

En la figura 5 se muestra la interacción campaña por aprovechamiento. En el primer aprovechamiento la diferencia entre las dos campaña es significativa siendo superior el valor de la campaña 2009/2010, sin embargo en el segundo aprovechamiento, aún siendo superior el valor de LAD en la campaña 2009/2010, no se observan estas diferencias. Analizando el contenido de LAD por campañas se aprecia que en la campaña 2009/2010 no existen diferencias significativas, Sánchez (2010) obtuvo resultados próximos a los obtenidos en este estudio entre los valores de los dos aprovechamientos, no observando un incremento significativo en el contenido de LAD, concluyendo que el hecho de realizar más de un aprovechamiento no afecta a los niveles de lignina de la planta. Sin embargo, en la campaña 2010/2011 el contenido de LAD es superior en el segundo aprovechamiento, siendo esta diferencia significativa. Este aumento del contenido de lignina concuerda con lo explicado por Sinclair y Senligman (1995), quienes indican que a menor cantidad de lluvia en el periodo de desarrollo se acelera el ciclo y la relación hoja/tallo disminuye, aumentando por tanto la lignificación del cultivo.

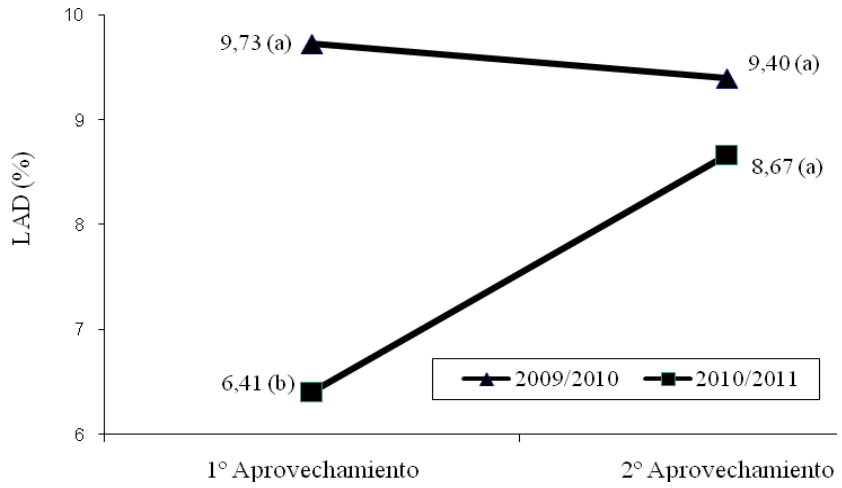


Figura 5. Influencia de la interacción campaña por aprovechamiento en el contenido de LAD del forraje de triticale. Campaña media

En la figura 6 se muestra la interacción densidad de planta por aprovechamiento. Se observa que en el segundo aprovechamiento los valores de la LAD son superiores a los del primer aprovechamiento aunque sólo se advierten diferencias significativas en las densidades de 400 y 500 plantas m^{-2}. Se observa que con la densidad de 500 plantas m^{-2} se obtiene el menor valor de la LAD en el primer aprovechamiento y el mayor, en el segundo aprovechamiento. Entre las densidades de 400 y 600 plantas m^{-2} no se aprecian diferencias significativas ni en el primer ni en el segundo aprovechamiento.

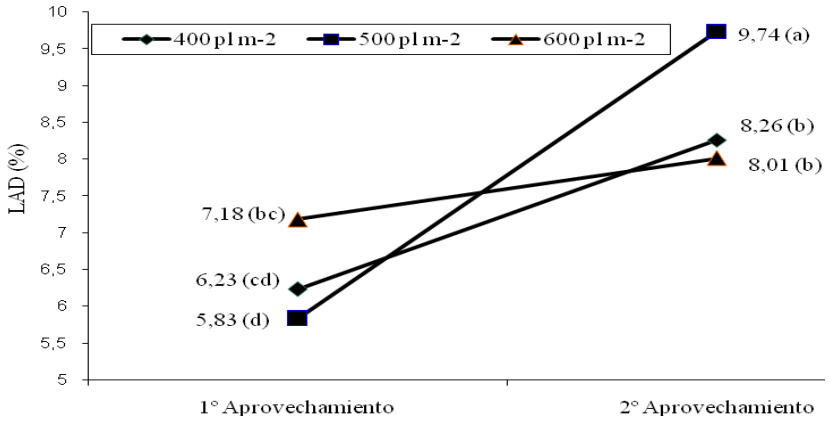


Figura 6. Influencia de la interacción densidad de plantas por aprovechamiento, en el contenido de LAD del forraje de triticale. Campaña 2010/2011

Valor Relativo del Forraje

En la tabla 10 se muestran los valores del VRF obtenidos en este trabajo. En la campaña 2009/2010 solamente la dosis de nitrógeno es significativa. En la campaña 2010/2011 se observa significación en la interacción densidad de plantas por aprovechamiento, pero no se observan diferencias significativas entre sus valores medios. En la campaña media es significativo el ambiente y el número de aprovechamientos.

El VRF es una estimación relativa de la calidad nutritiva de los alimentos y forrajes: valores iguales o mayores a 100 indican buena calidad nutritiva. Los valores obtenidos en este trabajo de investigación están en consonancia con los de Béjar y Ammar (2007) y Lozano *et al.* (2002) y son ligeramente superiores a los de Polo (2010), lo que significa que la calidad forrajera del triticale está dentro de los rangos de forrajes de calidad, como el de la alfalfa.

En ambas campañas y en la campaña media, pero especial y significativamente en la campaña 2009/2010, al aumentar la dosis de abonado nitrogenado disminuye el VRF. Esto puede tener una explicación en la influencia positiva, aunque no siempre significativa, del nitrógeno sobre la FND y FAD que son los dos tipos de fibra que intervienen en el cálculo del VRF.

El segundo aprovechamiento muestra valores de VRF (123.30) superiores a los del primer aprovechamiento (119.20), contrariamente a lo descrito por Lozano *et al*. (2002) que encontraron una disminución del VRF al aumentar el número de cortes. Este aumento del VRF puede ser debido, probablemente, a que la FND y FAD disminuyen al pasar del primero al segundo aprovechamiento.

El efecto del ambiente sobre el VRF viene condicionado igualmente por la influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre la FND y FAD, que al ser menores en la campaña 2010/2011, provocan un aumento del VRF.

Tabla 10. Análisis del VRF en función de la densidad de siembra, número de aprovechamientos y dosis de abonado nitrogenado, por campaña y en la media de las dos campañas

	VRF					
	Campaña					
	2009/2010		2010/2011		Media	
Densidad (plantas m^{-2})						
400	119.73	a	125.74	a	122.73	a
500	118.02	a	124.25	a	121.13	a
600	117.26	a	122.52	a	119.89	a
Aprovechamiento						
1 aprovechamiento	117.65	a	120.76	a	119.20	b
2 aprovechamientos	119.02	a	127.76	a	123.30	a
Nitrógeno (kg N ha^{-1})						
0	122.19	a	124.78	a	123.48	a
75	116.76	b	123.92	a	120.34	a
125	116.06	b	123.81	a	119.93	a
Media	118.34	b	124.17	a	121.25	
C.V. (%)	5.35		5.65		7.68	
Significación						
Campaña (C)					***	
Densidad (D)	N.S		N.S		N.S	
CxD					N.S	
Aprovechamiento (A)	N.S		N.S		*	
CxA					N.S	
DxA	N.S		*		N.S	
CxDxA					N.S	
Nitrógeno (N)	*		N.S		N.S	
CxN					N.S	
DxN	N.S		N.S		N.S	
AxN	N.S		N.S		N.S	
CxDxN					N.S	
CxAxN					N.S	
CxDxAxN					N.S	
DxAxN	N.S		N.S		N.S	

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.
N.S: no significativo

Relaciones entre variables

En la tabla 11 se muestran los coeficientes de correlación entre las distintas variables estudiadas.

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre la PB, FB, FND, FAD, LAD y VRF (n = 16)

	PB	FB	FND	FAD	LAD
FB	-0.86***				
FND	-0.55*	0.41^{NS}			
FAD	-0.19^{NS}	-0.01^{NS}	0.80***		
LAD	-0.89***	0.87***	0.63**	0.28^{NS}	
VRF	0.53*	-0.38^{NS}	-0.99***	-0.85***	-0.61**

*, ** y *** significativo al 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente. N.S: no significativo

Se puede observar que la PB tiene una relación negativa y significativa con la FB, FND y LAD, pero no con la FAD. A medida que aumenta la PB disminuyen todos los tipos de fibra y especial y significativamente la LAD (R^2 = 0.7946***). Esta relación confirma los resultados obtenidos por González *et al*. (2007) que, en las gramíneas forrajeras maralfalfa y elefante enano, al aumentar la PB disminuye la FND y la FAD. Para Correa (2006) mientras disminuyen las concentraciones de PB, extracto etéreo y carbohidratos no estructurales, aumenta la FND y se mantienen sin cambios las concentraciones de lignina y cenizas.

La FB también se relaciona con la LAD y esta relación es positiva y altamente significativa (R^2 = 0.7574***), ya que la lignina forma parte de la FB.

La FND está relacionada positiva y significativamente con la FAD y LAD, pero es con la FAD con la que se alcanza un mayor coeficiente de determinación (R^2 = 0.6434***). Esto se debe a que la FND está formada por la FAD y la LAD, aunque en mayor medida por FAD (celulosa y cutina principalmente).

Entre las relaciones observadas del VRF, destaca el que mantiene con la FND (R^2 = 0.9829***). El VRF está relacionado positiva y significativamente con la PB. Con la FAD y LAD tiene una relación negativa y significativa también, mientras que con la FB la relación aunque negativa no es significativa.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC (1969) Official Method 9689.06 Protein (Crude) In Animal Feed. Dumas Method.

AOAC (2003) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical 305 Chemists (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.

ANSLOW R.C. (1966) The rate of appearance of leaves on tillers of the Gramineae. Herb. Abst., 36, 149-155.

BEJAR M. Y AMMAR K. (2007) Triticale, una alternativa para el norte de México. CIMMYT. El Batán. México. En http://www.engormix.com

BOLTON J.L. (1962) Alfalfa. Botany cultivation and utilitation. Londom. UK: Leonard Hill Ltd. London.

CABALLERO R. Y GOICOECHEA E. (1980) Efecto de la fertilización nitrogenada sobre los rendimientos, composición y valor nutritivo del ray-grass italiano (Lolium multiflorum, variedad Westerwoldicum). Pastos, 10 (1), 114-133.

CALOIN M. Y YU O. (1984) Analysis of the time course change in nitrogen content of Dactylis glomerata L. using a model of plant growth. Ann. Bot., 54, 69-76.

CALSAMIGLIA S. (1997) Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. En: XIII curso de especialización FEDNA. (ed) Fundación Española para el Desarrollo de la Alimentación Anima, pp. 3-19. Madrid. España.

CARRASCO J.M., AYUSO A. Y LLERA F. (1999) El triticale. Posibilidades del cultivo para grano, forraje y doble aptitud. En: Jornadas Ibéricas sobre Triticale. (ed) Junta de Extremadura, pp. 63-67. Extremadura. España.

COLLINS N.E., WILLIAMS T.H., Y KEMBLE L.J. (1981) Measured machine energy requirements for grain production systems. ASAE Publ. 4(81), 407-411.

CORREA H. J. (2006) Calidad Nutricional del pasto Maralfalfa (Pennisetum sp) cosechado a dos Edades de Rebrote. Fac. Cienc. Agrop, UNC. Medellin. http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd18/6/corr18084.htm.

CUSICANQUI J. Y LAUER J.G. (1999) Plant density and hybrid influence corn forage yield and quality. Agronomy J. 91, 911-915.

DE LA ROZA B. Y MARTÍNEZ A. (1994) Alimentos para el ganado. parametros de calidad y normas de recogida de muestras para analisis. Serie informes técnicos, 2(94). Principado de Asturias, Consejería de Medio Rural y Pesca.

DELOGU G., FACCINI N., FACCIOLI P., REGGIANI F., LENDINI M., BERNARDO N. Y ODOARDI M. (2002) Dry matter yield and quality evaluation at two phenological stages of triticale grown in the Po Valley and Sardinia, Italy. Field Crop Res. 74, 207-215.

DROUSHIOTIS D.N. (1985) Effect of variety and harvesting stage on forage production of vetch in a low rainfall environment. Field Crops Research, 10, 49-55.

DUNHAM J.R. (1998) Relative feed value measures forage quality. Forage Facts 41.

DYSON C. (2006) Triticale grain for feed - Nutritional information. Alberta Government Agriculture and Food.

ELIZONDO J. Y BOSCHINI C. (2001) Efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento y calidad del forraje de maíz. Agronomía Mesoamericana, 12(2), 181-187.

FAGNANO M., CARONE, F. Y MORI, M. (1998) Sowing time and density influence on grain legumes behaviour. En: Opportunities for high quality, healthy and added value crops to meet European demands. (ed) 3th European Conference on Grain Legumes. pp. 158. Valladolid, España.

FEDNA. Fundación para el desarrollo de la nutrición animal (2004) Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. S. Calsamiglia, A. Ferre, A. Bach. Madrid, pp 70.

FERNÁNDEZ R., CHÁVEZ M., VIRGÜEZ D. Y GARCÍA M. (1991) Efecto de la frecuencia de corte sobre el rendimiento y valor nutritivo del pasto estrella (Cynodon nlemfuensis) en la unidad agroecologica 3e 144 del valle de aroa. Zootecnia tropical. Zootecnia Trop. 9(2), 165-179.

FLIPOT P., WESLEY M. Y LALANDE G. (1984) Chemical composition and animal performance of grass forage of varying maturity stored as hay or silage. Animal Feed Sciencie and Technology, 11, 35-44.

FRANCIA E., PECCHIONI N., LI DESTRI NICOSIA O., PAOLETTA G., TAIBI L., FRANCO V., ODOARDI M., STANCA A. Y DELOGU G. (2006) Dual-purpose barley and oat in a Mediterranean environment. Field Crops Res. 99, 158-166.

FUNARO D.O. Y PACCAPELO H.A. (2005) Efecto de la densidad de plantas y distancia entre surcos sobre el rendimiento de materia seca de maíces forrajeros en Santa Rosa, La Pampa. Fac. Agioiwmia, 16(1/2), 15-22.

GARCIA DEL MORAL L.F., RAMÓN J.M. Y RECALDE L. (1985) Relationship between vegetative growth, ranin yield and grian protein content in six Winter barley cultivar. Canadian Journal of Plant Science, 65, 523-532.

GIL A., LLERA F., GARCÍA A.M. Y RUFO, S. (2009) Nuevas oportunidades de alimentación en la dehesa: el triticale. La agricultura y la ganadería extremeñas, informe 2008. 54-59.

GIL A., LLERA F. Y ESPEJO M. (2011) Utilización de triticale de doble aptitud para la alimentación del ganado bovino. Ganadería, 72, 54-59.

GONZÁLEZ R. Y SALAS, M.L. (1993) Nitrogen use efficiency by winter barley under different climatic conditions. J. Plant Nutr., 16 (7), 1249-1261.

GONZÁLEZ B., GONZÁLEZ J. Y FARÍA J. (2007) Edad de corte y valoración productiva de los pastos Maralfalfa Pennisetum spp y Elefante enano Pennisetum purpureum. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15(1).

HALL J., SEAY W. Y BAKER S. (2011) Essential Nutrients, Feed Classification and Nutrient Content of Feeds. Virginia Cooperative Extension.

HANBURY C. Y SIDDIQUE K. (1999) Crop Updates : Pulses. Lathyrus development, Centre for Legumes in Mediterranean Agricultural. Department of Agriculture, Western Australia.

HANBURY C., SIDDIQUE K., SEYMOUR, M., JONES, R. Y MACLEOD, B. (2005) Growing Ceora (Lathyrus sativus) in Western Australia. Farmnote 58.

HARGREAVES A., HILL J. Y LEAVER, J.D (2009) Effect of stage of growth on the chemical composition, nutritive value and ensilability of whole-crop barley. Animal Feed Science and Technology, 152, 50-61.

JERANYAMA P. Y GARCIA A. (2004) Understanding Relative Feed Value (RFV) and Relative Forage Quality (RFQ). Cooperative Extension service. College of agriculture and biological sciences. South Dakota state University, 1-3.

JUNG H.G. Y VOGEL K.P. (1986) Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. J. Anim. Sci. 62, 1703-1712.

JUNG H.G. Y DEETZ D.A. (1993) Cell wall lignifications and degradability. En: Jung H.G. et al. (ed) Forage Cell Wall Structure and Digestibility, pp, 315-339. Madison, WI.

KHORASANI G.R., JEDEL P.E., HELM J.H. Y KENELLY J.J. (1997) Influence of stage madurity on yield components and chemical composition of cereal grain silages. Can. J. Anim. Sci., 77, 259-267.

KOZLOSKI G.V., PEROTTONI J. Y SÁNCHEZ L.M.B. (2005) Influence of regrowth age on the nutritive value of dwarf elephant grass hay (Pennisetum purpureum Schum. Cv. Mott) consumed by lambs. Animal Feed Science and Technology, 119, 1-11.

LEMAIRE G., CRUZ P., GOSSE G. Y CHARTIER M. (1985) Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d'azote et la dynamique de croissance en matière d'un peuplement de luzerne (Medicago sativa L.). Agronomie, 5(8), 685-692.

LEMAIRE G., KHAITY M., ONILLON B., ALLIRAND J., CHARTIER M. Y GOSSE G.. (1992). Dynamics of accumulation and partitioning of nitrogen in leaves, Stems and roots of Lucerne in a dense canopy. Annals of Botany, 70, 429-435.

LITHOURGIDIS A.S., VASILAKOGLOU I.B., DHIMA K.V., DORDAS C.A. Y YIAKOULAKI M.D. (2006) Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seeding ratios. Field Crops Research, 99, 106-113.

LINN J.G., MARTIN N.P., HOWARD W.T. Y ROHWEDER D.A. (1987) Relative feed value as a measure of forage quality. En: Minnesota Forage UPDATE (ed) Minnesota Forage and Grassland Council. 12(4). pp 2-4. Minnesota, Estados Unidos.

LLERA F. (1997) Production of double aptitude Triticale (forage and grain) in the Ecossystem of the Dehesa in Extremadura. Triticale topic. 15, 2-5.

LLERA F. (1998) Influencia del n fertilizante en el NO3- - N del suelo y en el crecimiento, rendimiento y calidad del trigo duro (triticum turgidum sbsp. durum) en condiciones de regadío mediterráneas. Tesis Doctoral. ETSIA de la Universidad de Córdoba.

LLERA F., CARRASCO J.M., PÉREZ F., Y AYUSO A. (1999) Selección y producciones del triticale de doble aptitud (forraje y grano) en condiciones mediterráneas. En: Jornadas Ibéricas sobre Triticale. (ed) Junta de Extremadura, pp. 68-76. Extremadura. España.

LLERA F., CRUZ V., RIVERA A.Mª. Y RODRIGUEZ, F., (2011a) Capacidad de rebrote del triticale de doble aptitud (forraje y grano): Influencia de la densidad de siembra y la dosis de nitrógeno. En: Pastos, paisajes culturales entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI. (ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 347-352. España.

LLERA F., RIVERA A. Mª., CRUZ V. Y RODRIGUEZ F. (2011b) Estudio de la tasa de ahijamiento y el índice de supervivencia del triticale de doble aptitud (forraje y grano). En: Pastos, paisajes culturales entre entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI. (ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 353-359. España.

LLERA F., DE SANTIAGO A., RIVERA A.Mª., GALLEGO R.A. Y CRUZ, V. (2012) Curvas de dilución de la proteína en un triticale de doble aptitud: influencia de la densidad de siembra, la dosis de nitrógeno y el número de cortes. En: Canals R. y San Emeterio L. (Eds) Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extinción, pp. 417-423. Pamplona, España: Sociedad Española para el estudio de los pastos (SEEP).

LLERA F., CRUZ V. Y GALLEGO R.A. (2013) Calidad del forraje de triticale de doble aptitud en función de la densidad de siembra, el número de cortes y la dosis de nitrógeno. En: Los pastos: nuevos retos, nuevas oportunidades. (ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 235-242. España.

LORENZ K., REUTER F. Y C. SIZER. (1974) The mineral composition of triticales and triticale milling fractions by X-ray fluorescence and atomic absorption. Cereal Chemistry. 51, 534.

LOZANO A.J. RODRIGUEZ S. A. DÍAZ H. FUENTES J.M. FERNÁNDEZ J.M. NARVÁEZ J.M.F. Y ZAMORA V.M. (2002) Producción de forraje y calida nutritiva en mezclas de triticale (X Triticosecale Wittmack) y ballico anual (Lolium multiflorum L.) en Navidad. N.L. BALLICO ANUAL MEX, 40(1), 17-35.

LUNA L. (1996) Efecto de la altura y frecuencia de corte sobre la producción de forraje, la calidad y la movilización de las reservas de la alfalfa cv. 'Aragón' Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza (España).

MADRIZ K. (2002) Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), 63(2), 2-32.

MERGOUM M., PFEIFFER W.H., PENA R.J., LOZANO A.J., SAYRE K. Y HEDE A. (1999) Triticale: Adaptation, End-uses and Challenges. En: Jornadas Ibéricas sobre Triticale. (ed) Junta de Extremadura, pp. 26-49. Extremadura. España.

MOORE J.E. Y UNDERSANDER D. J. (2002) Relative Forage Quality: An alternative to relative feed value and quality index. En: Proc. Florida Ruminant Nutrition Symposium. (ed) University of Florida, pp. 16-31. Florida, Gainesville.

MORALES S., POBLACIONES M.J., PINHEIRO N., OLEA L., MAÇAS B., SANTAMARÍA O. Y GARCÍA-WHITE T. (2010) Dinámica productiva de forrajes de diferentes cultivares de triticales y avenas como suplemento de los pastos de dehesa y pastizales del s.o. de la península ibérica. En: Pastos: fuente natural de energía (ed) Sociedad Española para el estudio de los Pastos. pp. 183-188. España.

MORALES S. (2011) Dinámica productiva de forrajes de diferentes cultivares de triticales y avenas como suplemento de los pastos de dehesa y pastizales del S.O. de la península ibérica. Tesis doctoral. Escuela de Ingenierías Agrárias. Universidad de Extremadura. Badajoz.

MUÑOZ L., DIEZ J., LÓPEZ A., PÉREZ M. Y SÁNCHEZ M. (2006) Nutrición nitrogenada de cereales utilizando abonos con el inhibidor de la nitrificación DMPP. Vida Rural. 241, 22-27.

NÚÑEZ G., SOTO J. Y VALENCIA C. (2005) Production alternative of high nutritional winter forages under limitations of irrigation water and nitrogen fertilizers. Agrofaz, 5(3), 5-13.

PÉREZ Mª.A., DEL CURA S., SANZ E., MARTÍN J. Y CALVO M. (2008) Efecto de la fertilización en cereales de invierno en siembra directa. Tierras, 149.

POLO I. (2010) Evaluación de variedades de triticale para distintos aprovechamientos: grano, forraje y biomasa energética y estudio comparativo con variedades de trigo. Tesis doctoral. Departamento de Producción agraria (Área de producción vegetal). Universidad Pública de Navarra.

PULIDO F. Y ESCRIBANO M. (1994) Análisis de los recursos de pastoreo aportados por el medio en dos dehesas características del S.O. de la provincia de Badajoz (España). Arch. Zootec. 43, 239-249.

RAO A.C.S., SMITH J.L., JANDHYALA V.K., PAPENDICK R.I. Y PARR J.F. (1993) Cutivar and climatic effects on the protein content of soft white winter wheat. Agronomy Journal. 85, 1023-1028.

REAL DECRETO 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueba los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias.

REGAN K., HANBURY C. Y WHITE P. (2005) Growing lathyrus. En: Producing pulses in the Southern Australia. (eds) P. White, M. Seymour, P. Burgess and M. Harries. Department of Agricultural of Government of Western Australia. GRDC Project DAW712. Bulletin 4645. pp 75-78. Australia.

REGLAMENTO (CE) No 382/2005 DE LA COMISIÓN de 7 de marzo de 2005 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no1786/2003 del Consejo sobre la organización común de mercado de los forrajes desecados.

RINEHART L. (2008) Nutrición para rumiantes en pastoreo. Servicio Nacional de Información de Agricultura Sostenible (ATTRA).

ROBINSON F.E., CUDNEY D.W., Y LEHMAN W.F. (1979) Nitrogen fertilizer timing, irrigation, protein and yellow berry in durum wheat. Agronomy Journal, 71, 304-308.

ROHWEDER D.A., BARNES R.F. Y JORGENSEN N. (1978) Proposed hay grading standards based on laboratory analyses for evaluating quality. Journal of Animal Science. 47, 747-759.

ROJAS C., CATRILEO A., MANRIQUEZ M. Y CALABI F. (2004) Evaluación de la época de corte de Triticale (Triticosecale X Wittmack) para ensilaje. Agricultura Tecnica., 64, 34-40.

ROMERO O., ROJAS C., BUTENDIECK N. Y HAZARD S. (1999) Produccion de materia seca y calidad nutritiva de tres especies de cereales: Avena, cebada y triticale para ensilaje. En: XXIV Reunion anual de la Sociedad Chilena de Produccion Animal (SOCHIPA). (ed) Sociedad Chilena de Produccion Animal (SOCHIPA). pp. 49-50. Temuco, Chile.

ROYO C. (1992) El Triticale: bases para el cultivo y aprovechamiento. (ed) Mundi Prensa. España.

SÁNCHEZ J. (2010) Dinámica productiva de iferentes cultivares de triticales y avenas como suplemento de los pastos de dehesa y pastizales del s.o. de la provincia de badajoz (extremadura). Trabajo fin de carrera. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. Badajoz.

SATORRE M.H. Y SLAFER G.A. (1999) Wheat ecology and physiology of yield determination. Foods Products Press. 85-120.

SAROFF C., PAGLIARICCI H. Y FERREIRA V. (2003) Efecto de la defoliación sobre la dinámica del crecimiento de triticale. Agricultura Técnica, 63, 266-276.

SINCLAIR T.R. Y SELIGMAN, N.A.G. (1995) Global environment change and simulated forage quality of wheat. I. Nonstressed conditions. Field Crops Research, 40, 19-27.

SOEST P.J. (1998) Calidad del forraje y valor nutritivo de la alfalfa y pastos. En: Cuarto ciclo de conferencias internacionales sobre nutrición y manejo. (ed) Grupo LALA. pp. 31. Torreón, Coahuila, México.

SPSS.PC+. (2005) SPSS Trends 14.0. SPSS Inc. Chicago. EEUU.

TEIXEIRA J.C. Y DE ANDRADE G. (2001) Carboidratos na alimentação de ruminantes. En: II Simpósio de Forragicultura e Pastagens. (ed) UFLA. pp. 165-210. Lavras, Anais.

TERMAN G.L. RAMING R.E., DRELER A.F. Y OLSON R.A. (1969) Yield-protein relationships in wheat grain, as affected by nitrogen and water. Agronomy Journal, 61, 755-759.

UNDERSANDER D., MERTENS D.R. Y THIEX N. (1993) Forage analyses procedures. Omaha, NE. National Forage Testing Association.

WILMAN D. Y WRIGHT P.T., (1983) Some effeets of applied N on the growth and cheminal composition of températe grasses. Herb. abst. 53(8), 387-93.

ZADOKS J.C., CHANG T.T. Y KONZAK C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research, 14, 415-421.

5.2. CAPÍTULO II

Uso potencial de la tecnología NIRs para la cuantificación de parámetros químicos de calidad del forraje de triticale de doble aptitud

CAPÍTULO II

USO POTENCIAL DE LA TECNOLOGÍA NIRs PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS DE CALIDAD DEL FORRAJE DE TRITICALE DE DOBLE APTITUD

RESUMEN

La utilización simultánea del triticale para forraje y grano tiene gran interés para el sector ganadero, ya que su modelo de aprovechamiento encaja con la curva de producción de pastos de secano. Conocer su valor nutritivo, principalmente el contenido en proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD), requiere numerosas analíticas en laboratorio, lo que ralentiza y encarece el proceso. Así, el objetivo de este estudio fue la obtención de un modelo predictivo fiable, mediante tecnología NIRs, para cuantificar el contenido en PB, FB, FND, FAD y LAD del forraje de triticale de doble aptitud a lo largo su ciclo de desarrollo. Para ello, se tomaron los datos espectrales NIR (1000 a 2500 nm) de cada muestra y se relacionaron con los valores químicos de referencia para cada propiedad mediante el programa Unscrambler®. Así, se seleccionaron las mejores ecuaciones de predicción, considerando como criterios discriminantes el coeficiente de determinación de validación cruzada (1-VR), error estándar de validación cruzada (EE_{VC}) y el *ratio performance deviation* (RPD). Los resultados revelaron que el pretratamiento espectral con mayor capacidad predictiva para el contenido en PB fue el EMSC (*Extended Multiplicative Scatter Correction*) sobre los datos de absorbancia, mostrando un RPD= 7.71; 1-VR= 0.98 y EE_{VC} = 0.79. Sin embargo, para la FB el mejor pretratamiento fue el 1,10,15 con un valor RPD= 1.52; 1-VR= 0.69 y EE_{VC}=1.61. En el caso de la FND, fue el 2,10,15, con RPD=5.99; 1-VR= 0.78 y EE_{VC}=1.46. Para la FAD, fue el 1,10,15+SNV que mostró un RPD=1.85; 1-VR= 0.76 y EE_{VC}=1.11 y para la LAD el 2,10,15 con RPD=1.68; 1-VR= 0.72 y EE_{VC}= 1.17. Tras la validación externa de estos modelos, se observa que los mejores estadísticos predictivos corresponden al contenido en PB, FND y FAD, por lo que la tecnología NIRs podría ser usada como técnica de análisis alternativa a los métodos de referencia. Sin embargo, los modelos obtenidos para FB y LAD no fueron tan exactos y fiables para el análisis del triticale de doble aptitud.

Palabras clave: *X Triticosecale* Wittmack, proteína, fibras, NIRs cuantitativo.

INTRODUCCIÓN

La dehesa ha basado su gestión, tradicionalmente, en la autosuficiencia del sistema, con aportes mínimos de energía del exterior, principalmente para el ganado que pastaba en ella (Gil *et al*., 2009). De hecho, estudios realizados en Extremadura (Llera *et al.*, 1997; Llera y Cruz, 2012) ponen de manifiesto el uso del cultivo de triticale (X *Triticosecale* Wittmack) de doble aptitud (forraje y grano) cv `Verato´ como alternativa de gran interés para la optimización del rendimiento de estos agrosistemas, ya que permite paliar la escasez de forraje verde en la época invernal y proporcionan una cosecha aprovechable al final de su ciclo. El principal valor nutritivo del triticale en alimentación animal, tanto de monogástricos como de poligástricos, es su aporte proteico (Royo, 1992). Para el ganadero, un elevado nivel de proteínas en los productos para alimentación animal es de gran importancia para el desarrollo, engorde y rendimiento del animal y así evitar la suplementación externa (Martínez, 2002).

Como para cualquier producto destinado a alimentación, es necesario realizar una serie de controles de calidad y caracterización de su composición nutritiva. Así, en los últimos años, el sector ha optado por el uso de nuevas metodologías que economicen estos procesos analíticos y permitan ofrecer una información fiable a tiempo real de la calidad del producto. Estudios previos han demostrado que la tecnología NIRS ha sido ampliamente utilizada en diversos productos como forrajes (García *et al*., 1977; 1978 y Gallego *et al*., 2013), maíz forrajero (Campo *et al*., 2007), así como en carne y productos cárnicos (Tejerina *et al*., 2009), ya que permite obtener resultados de forma rápida, económica, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente. Sólo requiere de una serie de tratamientos quimiométricos para su calibración, con el fin de obtener las mejores ecuaciones de predicción, con el mínimo error y que aseguren la repetibilidad, precisión y exactitud de los resultados (Deaville y Flinn, 2000). De hecho son numerosos los trabajos en los que se hace referencia a la predicción del contenido en nutrientes mediante NIRS (De Boever *et al*., 2004; García *et al*., 1988).

Se trata de una técnica espectrofotométrica, en la región del infrarrojo cercano (1000-2500 nm) (Murray, 1993; Deaville y Flinn, 2000), donde la absorción de energía por la muestra provoca que los enlaces C-H, O-H y N-H vibren en distintas formas (Givens y Deaville, 1999), con mayor o menor intensidad de señal. Así, las regiones del espectro más relacionadas con el contenido de PB son, entre otras: 1000-1100 nm, 1420-1620 nm y 1800-2200 nm (Miller, 2001; Shenk *et al*., 1992). Para el contenido de fibras, la longitud de onda más relacionada es 1666 nm para la lignina (Bran+Luebbe, 1989, Russel *et al*., 1989) y para la digestibilidad de los forrajes lignocelulósicos (Guzmán *et al*., 1996), o los 2270 nm y 2358 nm vinculadas a la celulosa (Bran+Luebbe, 1989, Williams y Norris, 1987).

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue la creación de modelos de predicción para el contenido de PB, FB, FND, FAD y LAD del forraje de triticale de doble aptitud cv `Verato´ sometido a diferentes tratamientos agronómicos, mediante la utilización de la tecnología NIRS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas de Cultivo

El ensayo se llevó a cabo durante las campañas agrícola 2009-2010 y 2010-2011, en una parcela de la fina "La Orden", perteneciente al CICYTEX (Gobierno de Extremadura) en el término municipal de Guadajira (Badajoz), en condiciones de secano.

El material vegetal utilizado fue el triticale de doble aptitud cv `Verato´. No se realizó ningún tipo de tratamiento fitosanitario. Los distintos abonados realizados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1.Fertilizantes y dosis utilizados en el abonado de fondo y coberteras (kgha^{-1})

	Abonado de Fondo			**1ª Cobertera**	**2ª Cobertera**
	N	P_2O_5	K_2O	N	N
Tratamiento	Sulfato amónico del 21%	Superfosfato cálcico del 18%	Cloruro potásico del 60%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%
125 kg N ha^{-1}	50	42	90	50	25
75 kg N ha^{-1}	25	42	90	50	0
0 kg N ha^{-1}	0	42	90	0	0

Se realizaron dos pastoreos simulados con una segadora manual de peine frontal con cuchillas alternativas, con una altura de 2-3 cm para el primer corte y de 6-7 cm para el segundo.

Diseño experimental

El diseño estadístico fue un *split split plot* con cuatro repeticiones, siendo la parcela principal la densidad de siembra (400 plantas m^{-2}, 500 plantas m^{-2} y 600 plantas m^{-2}), la subparcela el número de cortes (sin cortar, un corte y dos cortes) y la sub-subparcela las dosis de nitrógeno aplicadas antes de la siembra, después del primer corte y después del segundo corte (SIN nitrógeno (0-0-0), 75 kg N ha^{-1} (25-50-0) y 125 kg N ha^{-1} (50-50-25)). La unidad experimental estaba constituida por dos parcelas de 1,5 m de ancho y 10 m de longitud, utilizando una de ellas para los muestreos destructivos (0.25 m^2).

Muestreos. Conjunto de muestras de calibración y validación

El número de muestras recogidas a los tiempos previstos en cada uno de los años se observan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Distribución de los muestreos en las diferentes fechas de cada campaña de estudio para las variables químicas estudiadas

Variables	1ª Campaña							2ª Campaña			
	18/1/2010	25/2/2010	10/3/2010	12/4/2010	10/5/2010	21/6/2010	n total	17/1/2011	3/3/2011	n total	n total campañas
	n (nº muestras) por fecha de cortes							n por fecha de cortes			
PB	108	108	108	108	108	108	**648**	36	36	72	**720**
FB	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**
FND	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**
FAD	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**
LAD	108	-	108	-	-	-	**216**	36	36	72	**216**

Tabla 3. Distribución de muestras en calibración y validación externa en cada variable química de estudio

Variables	Calibración			Validación externa		
	n	Origen de las muestras		n	Origen de las muestras	
		1ª Campaña	2ª Campaña		1ª Campaña	2ª Campaña
PB	648	648	-	30	-	30
FB	258	216	42	30	-	30
FND	258	216	42	30	-	30
FAD	258	216	42	30	-	30
LAD	258	216	42	30	-	30

En la primera y segunda campaña sólo se determinó el contenido de FB, FND, FAD y LAD en los cortes correspondientes a la simulación del pastoreo, mientras que la PB se analizó en todos los cortes de ambas campañas. De las muestras tomadas en la segunda campaña, se separaron 30 muestras del grupo de calibración para realizar la validación externa de todas las variables.

Procesado de las muestras y análisis químicos de referencia

Las muestras fueron secadas en estufa a 105 °C durante 48 horas para eliminar el contenido de humedad, molidas, tamizadas (1 mm de poro) y conservadas en oscuridad hasta su análisis en el Laboratorio de Nutrición del CICYTEX- La Orden.

El contenido en PB fue realizado por el método LECO®/DUMAS AOAC 9689.06 (AOAC, 1969). Para la determinación del contenido en FB, FND, FAD y LAD se utilizó un analizador de fibra ANKOM A 2000 I, cuyo procedimiento consta en el método oficial AOCS Ba (2003) para la determinación de compuestos fibrosos.

En cada uno de los métodos de referencia utilizados se calculó el error estándar de laboratorio (EEL), que de acuerdo con Osborne *et al.* (1993) tiene una gran influencia en la precisión de la ecuación NIRS.

$$EEL = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_1 - y_2)^2}{2n}}$$

donde y_1 e y_2 son el primer y segundo duplicado del valor de la propiedad a determinar para un misma muestra, y n es el número de muestras. En este trabajo el EEL (% PB) = 0.36; EEL (% FB) = 0.15; EEL (% FND) = 0.58; EEL (% FAD) = 0.71 y EEL (% LAD) = 0.77.

El análisis estadístico de los resultados analíticos fue realizado mediante el programa SPSS-PC+ (2005).

Obtención de datos espectrales

Previamente a la determinación de los parámetros químicos, se procedió a la obtención de la información espectral del conjunto de muestras, mediante el uso de un equipo LabSpec 2500 (ASD inc.®) con un sensor UNIT5065, que realiza lecturas con una resolución espectral de 2 nm en un rango de 1000 a 2500 nm. Cada una de las muestras fue expuesta al infrarrojo cercano a través de la sonda ASD Turntable, giradisco de 150 mm de diámetro, con una velocidad de giro de 22 rpm y fuente de luz halógena. El software utilizado para la obtención de los datos espectrales fue el IndicoPro® (Spectral Adquisition Software). El espectro final utilizado es el resultado del promedio de 20 lecturas y dos repeticiones para cada muestra, expresado en unidades absorbancia (log 1/R) (R=reflectancia), ya que según Birth y Hecht (1987) reproduce una respuesta más lineal en función de la concentración del analito.

Calibración de la composición química y espectros NIR

En primer lugar se eliminaron los *outliers* o muestras aberrantes. Para ello se definió un protocolo de detección y eliminación de muestras aberrantes, tanto de carácter espectral (H) como respecto de la magnitud de su desviación entre el valor predicho por NIRS y el valor de referencia (T), utilizando el programa Unscrambler V.10.2 de CAMO®. El valor crítico para muestras aberrantes de tipo H se fijó en 3, mientras que el valor crítico para eliminar muestras por diferencia residual de valores analíticos (T) se fijó en 2.5.

El análisis quimiométrico de los datos espectrales y químicos se realizó mediante el método de regresión multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS), usando el software Unscrambler de CAMO® (2013), por el cual se obtuvieron las ecuaciones de predicción para el análisis cuantitativo del contenido en PB, FB, FND, FAD Y LAD de las muestras.

Con el fin de obtener modelos predictivos fiables se evaluó el comportamiento de diferentes pretratamientos espectrales a partir de los datos de origen (log 1/R): 1ª y 2ª derivada (con varios intervalo de sustracción o GAP y segmento de suavizado), corrección multiplicativa de la señal extendido (EMSC), corrección dispersiva desviación estándar normalizada (SNV) y combinación de derivadas con EMSC y SNV (Tabla 5, 8, 11, 14 y 17).

La elección del número de componentes principales (CP) o número de términos de la ecuación se realizó basándose en el error cuadrático medio (RMSE= *Root Mean Square Error*). La determinación del número de factores o componentes se llevó a cabo utilizando como criterios de decisión el análisis de la ganancia en varianza explicada al añadir un nuevo componente al modelo y a través de la comparación de la representación gráfica del RMSE frente al número de componentes, tanto para calibración (RMSEC) como para validación (RMSEP), tratando de obtener el modelo más simple con la mejor capacidad predictiva.

La validación del modelo predictivo se realizó, inicialmente, mediante validación cruzada seleccionando aleatoriamente muestras del conjunto de calibración, con un número de segmento de 25 y un número de variables por segmento de 26 para la PB y de 16 segmentos con 16 muestras por segmento para el resto de parámetros (FB, FND, FAD y LAD).

La habilidad predictiva del modelo se analizó en base al mayor valor del coeficiente de determinación (1-VR), el menor error estándar de validación cruzada (EE_{VC}) (Osborne *et al.*, 1993) y la relación entre desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada (DE/EE_{VC}), conocido como índice RPD (Williams, 2001), ya que son considerados los estadísticos de mayor peso en la precisión de una ecuación NIRS.

Validación externa del modelo predictivo NIR

El pretratamiento con mejores estadísticos de predicción NIRS fue seleccionado para la validación con las muestras externas de referencia, y así evaluar su fiabilidad y solidez mediante

el ajuste lineal entre el valor predicho frente al real. De este modo, si existe un elevado coeficiente de determinación (R^2), un bajo error estándar de predicción (EEP) y valor RPD>3 (Williams, 2001), se puede considerar como adecuado. Es importante que el EEP no sea muy superior al EEL, para considerarlo como método alternativo de análisis químico.

Análisis Estadístico

El estudio estadístico de los parámetros químicos de referencia se basó en un análisis descriptivo (media, mínimo, máximo, desviación estándar y coeficiente de variación), que fue realizado mediante el programa SPSS-PC+ (2005), mientras que para el estudio quimiométrico se utilizó el Unscrambler V.10.2 de CAMO®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en este estudio para la predicción cuantitativa NIRS de la PB, FB, FND, FAD y LAD.

Proteína bruta (PB)

En la tabla 4 se muestran los estadísticos descriptivos del conjunto de muestras de calibración de los valores químicos de PB de las muestras de triticale, determinados por el método de referencia.

Tabla 4. Estadísticos descriptivos del conjunto de calibración del contenido en PB

Parámetro (g $100g^{-1}$ MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	CV (%)
PB	648	2.69	27.38	15.03	6.18	0.41

Así, se puede observar el amplio rango existente entre el conjunto de muestras (2.69-27.38 g $100g^{-1}$ MS), que podría ser debido a la variabilidad del contenido proteico en las diferentes fases del ciclo vegetativo del cultivo. Esto está en concordancia con lo observado por Llera *et al.* (2012) en estudios previos sobre forrajes de triticale en las dehesas de Extremadura. Esta variabilidad es una característica deseable en el desarrollo de ecuaciones de predicción, ya que representa una distribución más uniforme a lo largo de todo el rango de la propiedad, por lo que el modelo predictivo resultante permitirá una mayor reproducibilidad de las condiciones reales (Murray, 1988).

En la figura 1 se observa el conjunto de espectros de calibración (n= 648), en el cual existe una clara similitud entre las muestras, lo cual podría ser debido, a que al tratarse de

muestras secas y molidas, aumenta su uniformidad y permite una señal más homogénea en la región del infrarrojo cercano, al igual que ocurre para la FB, FND, FAD y LAD.

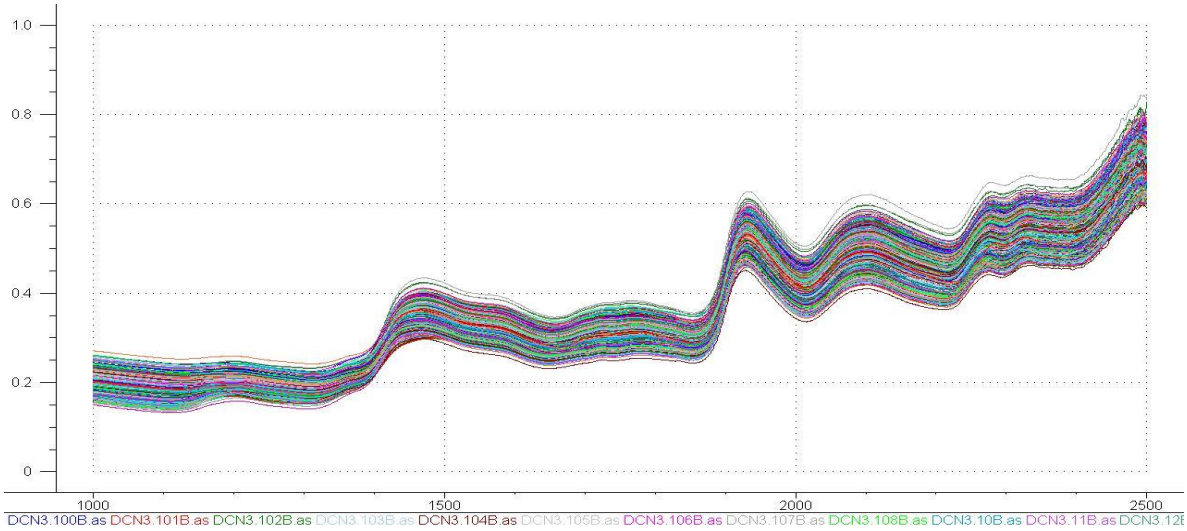


Figura 1. Conjunto de espectros en absorbancia de las 648 muestras de PB

Tras la valoración de los datos espectrales y de referencia, se ha observado la ausencia de posibles muestras aberrantes (*outliers*), lo cual contribuye a aumentar la solidez del modelo.

Los estadísticos correspondientes a los modelos de predicción del contenido en PB de las muestras de triticale, para cada pretratamiento espectral realizado, se muestran en la tabla 5, donde se ha resaltado el modelo que presenta los mejores estadísticos de predicción (1, 10, 15+SNV); con un EE_{VC} más bajo y un 1-VR y RPD más alto que el resto (0.7965; 0.9835; 7.71, respectivamente). Aunque cabe destacar el buen comportamiento de la mayoría de los modelos. Esto pone de manifiesto la calidad de la calibración, apreciándose que supera ampliamente el criterio propuesto por Kennedy *et al*. (1995) y Wlliams (2001), quienes señalan que una ecuación de calibración apropiada será aquella donde el EE_{VC} sea inferior o igual a un tercio de la desviación estándar, es decir, valores de RPD superiores a 3. Igualmente, Saeys *et al*. (2004) afirmaron que para valores de RPD menores que 1.5, el incremento en la precisión es mínimo comparado con la utilización de la medida de los resultados y la calibración no sería útil. Si están comprendidos entre 1.5 y 1.75 sólo existe la posibilidad de distinguir entre valores altos y bajos, entre 1.75 y 2.0 pueden hacerse predicciones cuantitativas aproximadas. La predicción cuantitativa que puede realizarse cuando RPD está comprendida entre 2.0 y 3.0 es buena, porque el error de predicción es reducido a menos de la mitad del error cometido cuando utilizamos el valor medio de la composición, y por encima de 3.0, el error de predicción es reducido por un factor mayor que tres y las calibraciones son aceptables.

Tabla 5. Estadísticos del conjunto de muestras para la calibración de PB

PLS Tratamiento	n	CP	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN CRUZADA			RPD (DE/EE_{VC})
			R^2	EEC	1-VR	EE_{VC}	DE	
Absorbancia	648	3	0.9672	1.1202	0.9668	1.1296	6.0944	5.47
EMSC	648	3	0.9807	0.8580	0.9801	0.8720	6.1892	7.09
1,10,5+EMSC	648	3	0.9810	0.8336	0.9808	0.8586	6.1310	7.14
1,10,10+EMSC	648	3	0.9813	0.8451	0.9806	0.8634	6.1310	7.10
1,10,15+EMSC	648	3	0.9813	0.8449	0.9809	0.8572	6.1360	7.15
1,15,5+EMSC	648	3	0.9816	0.8380	0.9808	0.8575	6.1305	7.14
1,15,10+EMSC	648	3	0.9813	0.8458	0.9807	0.8593	6.1350	7.13
1,15,15+EMSC	648	3	0.9814	0.8437	0.9808	0.8580	6.1366	7.15
SNV	648	3	0.9706	1.0606	0.9704	1.0669	6.1045	5.72
1,10,5+SNV	648	3	0.9837	0.7891	0.9827	0.8131	6.1395	7.55
1,10,10+SNV	648	3	0.9837	0.7904	0.9831	0.8046	6.1382	7.62
1,10,15+SNV	**648**	**3**	**0.9839**	**0.7839**	**0.9835**	**0.7965**	**6.1432**	**7.71**
1,15,5+SNV	648	3	0.9838	0.7881	0.9831	0.8048	6.1388	7.62
1,15,10+SNV	648	3	0.9838	0.7875	0.9833	0.8012	6.1437	7.66
1,15,15+SNV	648	3	0.9841	0.7805	0.9826	0.7997	6.1433	7.63
1,10,5	648	3	0.9733	1.0105	0.9713	1.0313	6.1090	6.00
1,10,10	648	3	0.9732	1.0120	0.9726	1.0260	6.1124	5.95
1,10,15	648	3	0.9736	1.0055	0.9730	1.0179	6.1115	6.00
1,15,5	648	3	0.9733	1.0110	0.9722	1.0318	6.1089	5.92
1,15,10	648	3	0.9735	1.0071	0.9728	1.0220	6.1106	5.97
1,15,15	648	3	0.9738	1.0023	0.9731	1.0180	6.1117	6.00
2,5,5	648	3	0.9265	1.6783	0.9200	1.7549	5.9671	3.40
2,5,10	648	3	0.9539	1.3294	0.9515	1.3642	6.0439	4.43
2,5,15	648	3	0.9578	1.2720	0.9563	1.2951	6.0587	4.67
2,10,5	648	3	0.9550	1.3131	0.9514	1.3655	6.0375	4.42
2,10,10	648	3	0.9575	1.2759	0.9559	1.3020	6.0579	4.65
2,10,15	648	3	0.9625	1.1979	0.9615	1.2168	6.0676	4.98

EMSC: corrección multiplicativa extensivas de la señal; **SNV**: corrección dispersiva desviación estándar normalizada; **(1,10,5) y (2,10,5)**: donde el primer término es el orden de la derivada aplicada, el segundo hace referencia al intervalo de sustracción o GAP y el tercero a la longitud del segmento de suavizado; **n**: número de muestras; **P**: número de términos en la ecuación; **R^2**: coeficiente de determinación en calibración; **EEC**: error estándar de calibración; **1-VR**: coeficiente de determinación en validación cruzada; **EE_{VC}**: error estándar de validación cruzada; **DE**: desviación estándar; **RPD**: cociente entre la DE del grupo de validación y el EE_{VC}.

Estos resultados están en concordancia que lo observado en estudios previos por Cuevas (2005), quién afirmó que la combinación de SNV y derivación de los espectros de orden 1 mostraba buenos estadísticos de predicción de PB en muestras de praderas. Así, encontraron los mejores resultados realizando un pretratamiento 1,12,12+SNV ($R^2 > 0.98$, un EE_{VC}=0.785 y un RPD= 8.651). Sin embargo, Pasini (2009) afirmó que un pretratamiento que combinaba la primera derivada con MSC se obtenían los mejores resultados de predicción ($R^2 > 0.94$ y un EE_{VC}=0.47) en muestras de triticale. En praderas multivarietales Castro *et al*. (2010) obtuvieron un $R^2 > 0.96$, EE_{VC}=0.88 y RPD= 5.02; Garcia *et al*. (1988) consiguieron un $R^2 > 0.98$ y un EE_{VC}=0.45, sin utilizar pretratamientos.

Por otra parte, en la figura 2, se puede observar el conjunto de datos espectrales aplicando el pretratamiento con mejor comportamiento predictivo (1,10,15+SNV), donde queda de manifiesto la simplificación espectral que supone el tratamiento.

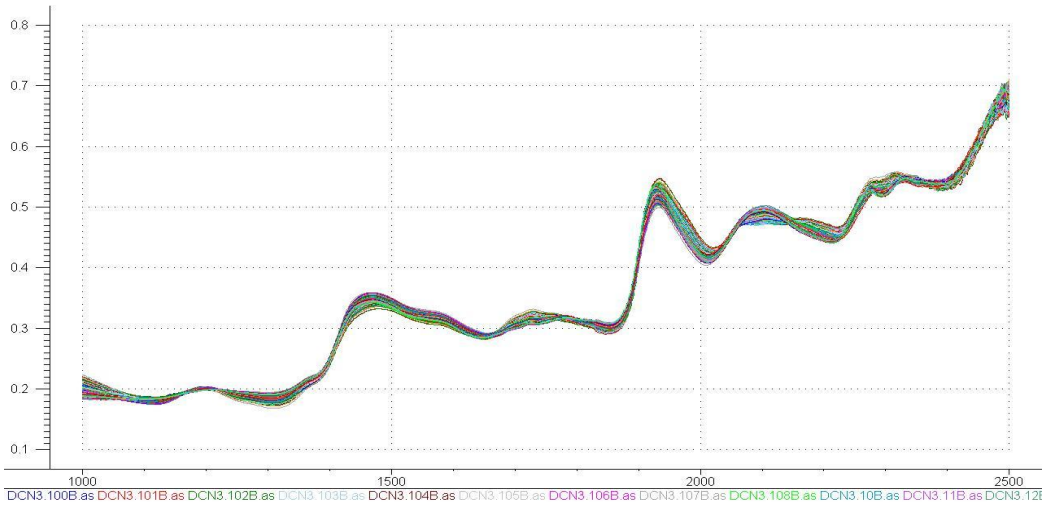


Figura 2. Conjunto de los espectros con tratamiento 1,10,15,SNV de las 648 muestras de PB

Por otra parte, la figura 3 muestra gráficamente el excelente ajuste lineal entre los datos predichos NIRS y los valores reales del método de referencia. Se observa además una distribución homogénea a lo largo de todo el rango de la propiedad.

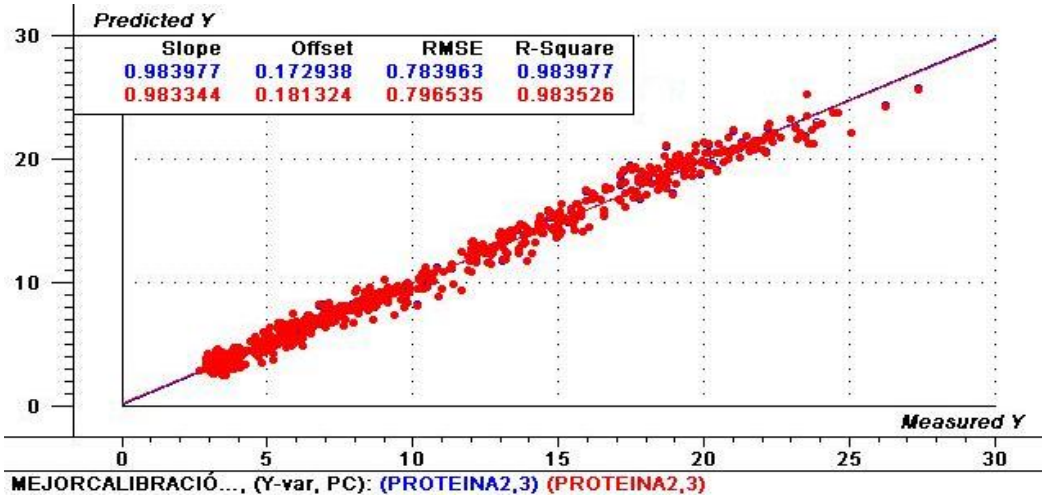


Figura 3.Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la PB, con pretratamiento 1,10,15+SNV en validación cruzada

En la figura 4 se observan las zonas espectrales más importantes según su coeficiente de regresión en la cuantificación del contenido de PB. Cabe destacar, desde nuestro conocimiento, la ausencia de información científica en la interpretación de las longitudes de onda implicadas en las determinaciones químicas para el triticale. Así, se establecerán comparaciones con otro tipo de productos agroalimentarios, que en mayor o menor medida, deben guardar similitud espectral con el triticale.

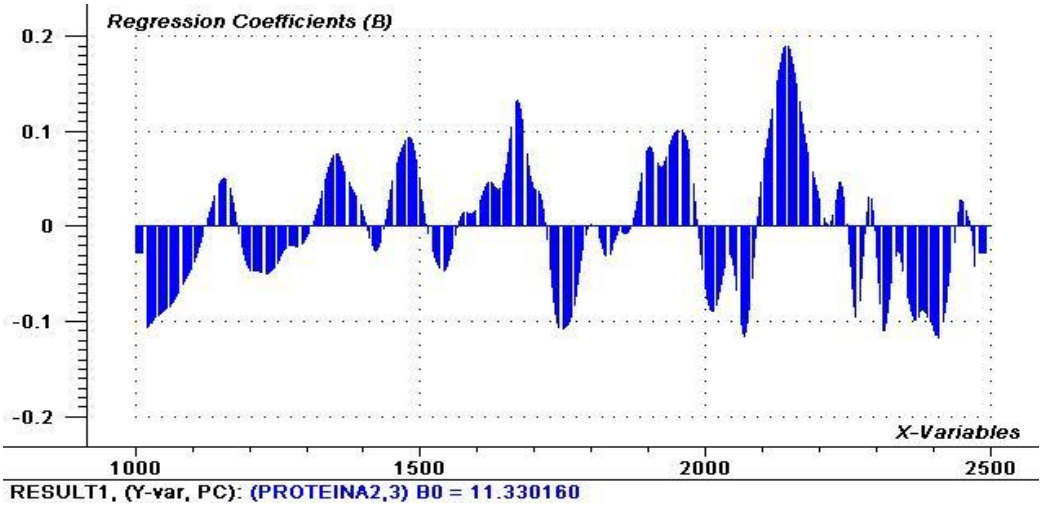


Figura 4. Coeficientes de regresión para la determinación de PB con corrección 1,10,15+SNV, altos valores absolutos = zonas espectralmente relevantes en la ecuación de predicción

Los mayores valores de coeficiente de regresión aparecen a los 2150 nm, que están claramente asociados a la presencia de nitrógeno orgánico en la muestra (función amida 2ª ó 3ª), al igual que los 2190 nm (Bran+Lüebbe, 1989, Williams y Norris, 1987). A su vez, se distingue un elevado valor de coeficiente de regresión en los 1738 nm, asociado al 1ª sobretono del enlace S-H, característicos de aminoácidos azufrados (Bran+Lüebbe, 1989) y, por lo tanto, de la presencia de proteína (Williams y Norris, 1987). Estos datos están en concordancia con los observados por otros autores en trabajos previos de determinación de proteína bruta en forrajes (Lippke y Barton II, 1988) o en la medida de degradabilidad del nitrógeno de hierba (Waters y Givens, 1992). Por otra parte, García *et al*. (1988) encontraron que los 2476 nm fue la longitud de onda más estrechamente correlacionada con la predicción de proteína en pastos polivarietales, seguida de las 1252, 2324, 1676, 2060 y 1812 nm, en orden decreciente de importancia relativa. Norris *et al*. (1976), para forrajes de *Cynodon Dactylon*, proponen una combinación de longitudes de onda en las que, entre otras, incluyen como más próximas a las de este estudio, las siguientes: 2084, 1610 y 1818 nm. Otros como Marten *et al*. (1983), en forrajes de avena, trigo y triticale y O´Keffe *et al*. (1987), en ensilados, destacan las longitudes 1680, 1822 y 2490 nm. Esto indica que las longitudes de onda más influyentes en la predicción de la PB en forrajes y pastos coinciden con las observadas en nuestro estudio, y por tanto, tienen importancia en las ecuaciones de predicción seleccionadas.

Para asegurar la fiabilidad y robustez del modelo seleccionado, se realizó una validación con muestras externas (conjunto de muestras de validación; n=30) de características similares a las utilizadas en calibración.

En la tabla 6 se pueden observar los estadísticos descriptivos del valor químico de referencia (PB) del conjunto de muestras de validación externa, así como los valores de R^2_{VE}, EEP y $RPD_{VE,}$ obtenidos tras la predicción de las muestras con el modelo seleccionado

(1,10,15+SNV). Se utilizó el valor "y" de referencia para estudiar la relación entre el valor predicho y el real (figura 5).

Tabla 6. Estadísticos de predicción de la validación externa del modelo para PB

Parámetro (g $100g^{-1}$ MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	R^2_{VE}	EEP	RPD (DE/EEP)
PB	30	17.31	31.56	24.44	3.28	0.898	1.042	3.150

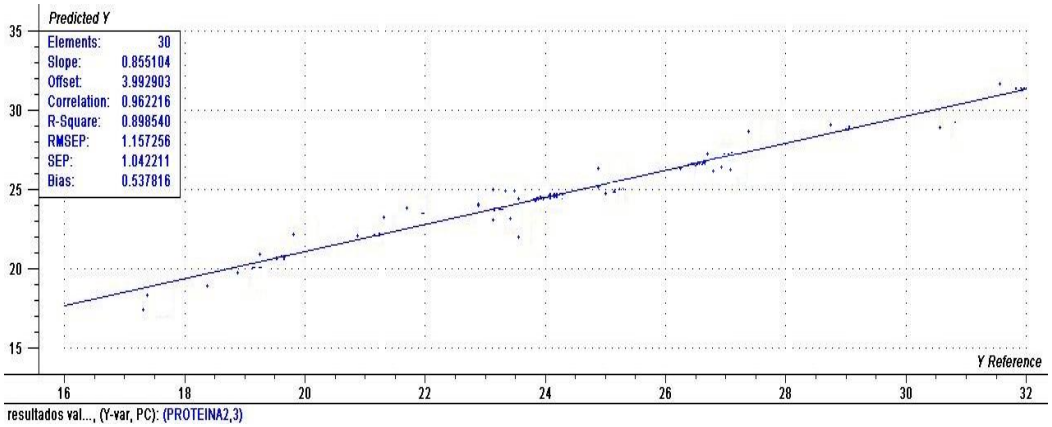


Figura 5.Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho de la PB, con pretratamiento 1,10,15+SNV en validación externa

Se observa un buen comportamiento en la predicción del contenido en PB en las muestras externas, ya que el coeficiente de determinación fue elevado (R^2= 0.898), el error estándar de validación externa (EEP= 1.042) fue aceptable, aunque superior al EEL, y el índice RPD fue superior a 3. Castro *et al*. (2010) obtuvieron valores similares en estudios en praderas, con $R^2 > 0.96$, un EEP=0.80 y un RPD= 5.17. Estudios previos en triticale y especies forrajeras (Calderón *et al*., 2009), pastos polivarietales (García *et al.*, 1988) y muestras de forrajes monoespecíficas (Shenk *et al*., 1981; Templeton *et al*., 1983 y Marten *et al*., 1983), también mostraron buenos estadísticos de predicción para el contenido en PB.

Además, el número de términos de la ecuación es reducido (*p*= 3), lo cual da robustez al modelo, ya que, otros autores, como Cuevas (2005) obtienen ecuaciones con 11 términos.

Fibra bruta (FB)

En la tabla 7 se pueden observar los valores de los estadísticos descriptivos del conjunto de muestras de calibración del contenido en FB, obtenidos por el método de referencia. El rango de distribución de concentración del analito (36.50-18.60 g 100 g^{-1} MS), aunque es amplio, no lo es tanto como en el caso de la PB. En cualquier caso representa valores típicos de forrajes de triticale para las dehesas de Extremadura en épocas de aprovechamiento animal (Polo, 2010).

Tabla 7. Estadísticos descriptivos del conjunto de calibración del contenido en FB

Parámetro (g 100 g^{-1} MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	CV (%)
FB	248	18.60	36.50	27.55	3.09	0.11

En la figura 6 se puede observar el conjunto de espectros de calibración (n= 258), utilizados en la construcción de los modelos para determinar FB, FND, FAD y LAD. Igual que en el caso del conjunto de calibración utilizado para PB, existe una similitud espectral entre las muestras que es indicativo de la homogeneidad inicial de las mismas.

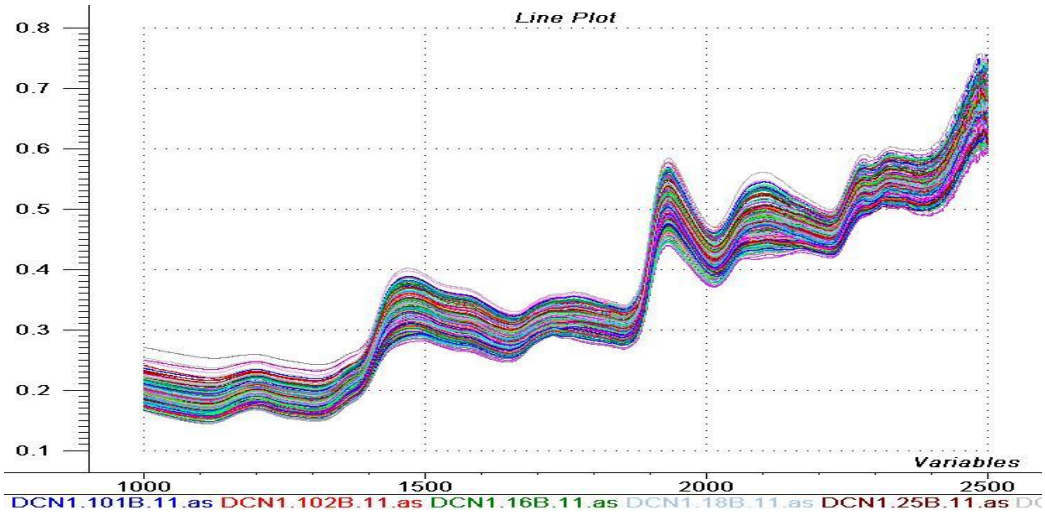


Figura 6. Conjunto de espectros en absorbancia de las 258 muestras de FB, FND, FAD Y LAD iniciales

Tras una primera evaluación de los modelos de predicción, se procedió a la eliminación de las muestras con comportamiento anómalo (outliers), para así mejorar la fiabilidad de los modelos.

Los estadísticos correspondientes a los modelos de predicción para el contenido en FB de las muestras de triticale, en cada pretratamiento espectral realizado, para calibración y validación cruzada, se muestran en la tabla 8. En ellos se puede observar un ajuste razonable, a pesar de que el parámetro FB es muy genérico y está más sujeto al error analítico, permitiendo una tolerancia superior al resto de parámetros.

Los estadísticos predictivos en validación cruzada (tabla 8) más satisfactorios se obtuvieron con el pretratamiento de derivación de orden 1 (1, 10, 15), que mostró un valor de 1-VR= 0.6949, un EE_{VC}= 1.6181 y un RPD = 1.516. Por tanto, sólo podrían hacerse predicciones cuantitativas aproximadas, ya que la ecuación no es aceptable para fines de predicción (Williams 2001).

Tabla 8. Estadísticos del conjunto de muestras para la calibración de FB

PLS	n	CP	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN CRUZADA			RPD (DE/EE_{VC})
Tratamiento			R^2	EEC	1-VR	EE_{VC}	DE	
Absorbancia	255	6	0.6255	1.8888	0.5724	2.0220	2.3946	1.184
EMSC	255	5	0.6671	1.7810	0.5851	1.9936	2.4664	1.237
1,10,5+EMSC	255	4	0.6658	1.7845	0.6056	1.9500	2.4984	1.281
1,10,10+EMSC	255	4	0.6472	1.8333	0.6037	1.9480	2.4807	1.273
1,10,15+EMSC	255	4	0.6387	1.8350	0.6062	1.9211	2.5020	1.302
1,15,5+EMSC	255	4	0.6550	1.8129	0.6000	1.9581	2.4790	1.266
1,15,10+EMSC	255	4	0.6438	1.8422	0.6065	1.9459	2.4760	1.272
1,15,15+EMSC	255	4	0.6352	1.8644	0.6020	1.9584	2.4601	1.256
SNV	255	5	0.6258	1.8882	0.5839	1.9974	2.4392	1.221
1,10,5+SNV	255	4	0.6655	1.7851	0.5873	1.9900	2.4922	1.252
1,10,10+SNV	255	4	0.6468	1.8343	0.6039	1.9493	2.4688	1.266
1,10,15+SNV	255	4	0.6386	1.8351	0.6072	1.9187	2.5089	1.307
1,15,5+SNV	255	4	0.6550	1.8129	0.6002	1.9637	2.4918	1.268
1,15,10+SNV	255	4	0.6429	1.8446	0.5931	1.9762	2.4658	1.247
1,15,15+SNV	255	4	0.6353	1.8640	0.6016	1.9588	2.4545	1.253
1,10,5	255	5	0.6566	1.8087	0.5992	1.9612	2.5115	1.280
1,10,10	255	5	0.6362	1.8618	0.5932	1.9737	2.4487	1.241
1,10,15	**245**	**5**	**0.7264**	**1.5246**	**0.6949**	**1.6181**	**2.4535**	**1.516**
1,15,5	255	5	0.5923	1.9708	0.5920	1.9756	2.3609	1.195
1,15,10	255	5	0.5983	1.9563	0.5827	1.9986	2.2998	1.150
1,15,15	255	5	0.6511	1.8231	0.6078	1.9467	2.4729	1.270
2,5,5	255	6	0.6573	1.8069	0.5113	2.1635	2.4495	1.132
2,5,10	255	4	0.6320	1.8725	0.5590	2.0546	2.4459	1.190
2,5,15	255	4	0.6327	1.8706	0.5803	2.0101	2.4426	1.215
2,10,5	255	4	0.6405	1.8507	0.5498	2.0769	2.4220	1.166
2,10,10	255	4	0.6314	1.8739	0.5807	2.0066	2.4311	1.211
2,10,15	255	4	0.6253	1.8894	0.5805	2.0085	2.4416	1.215

EMSC: corrección multiplicativa extensivas de la señal; **SNV**: corrección dispersiva desviación estándar normalizada; **(1,10,5) y (2,10,5)**: donde el primer término es el orden de la derivada aplicada, el segundo hace referencia al intervalo de sustracción o GAP y el tercero a la longitud del segmento de suavizado; **n**: número de muestras; **CP**: número de términos en la ecuación; **R^2**: coeficiente de determinación de la calibración; **EEC**: error estándar de calibración; **1-VR**: coeficiente de determinación de la validación cruzada; **EE_{VC}**: error estándar de validación cruzada; **DE**: desviación estándar; **RPD**: cociente entre la DE del grupo de validación y el EE_{VC}.

Ibáñez y Alomar (2007), en ensilajes de pradera, con un pretratamiento que consistió en derivadas de orden 2 (2,4,4) obtuvieron datos ligeramente mejores para 1-VR > 0.99 y RPD= 3.94, aunque con un error superior (EE_{VC}= 9.96). Villamarín *et al*. (2002) consiguieron un superior RPD= 4.5 también en muestras de praderas. Otros autores obtienen resultados ligeramente inferiores, como López (1997) en piensos, con 1-VR= 0.914 y EE_{VC}= 1.568. Igualmente ocurre a los datos de Hărmănescu *et al.* (2010) en forrajes, con 1-VR =0.7355 y EE_{VC}= 3.2764.

En la figura 7 se muestra la simplificación espectral que supone este tratamiento y en la figura 8, el ajuste lineal obtenido entre el valor real y el predicho con el modelo seleccionado.

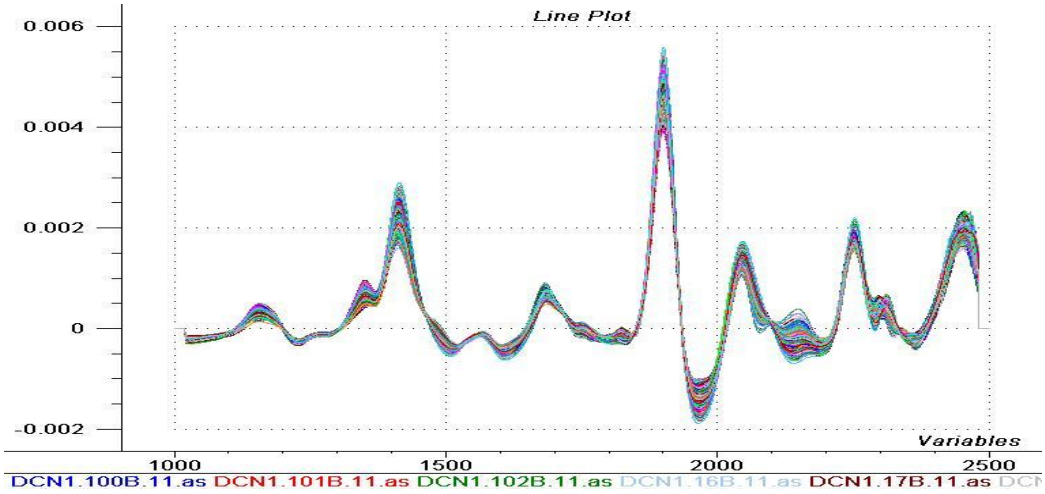


Figura 7. Conjunto de los espectros con tratamiento 1,10,15 de las 245 muestras de FB

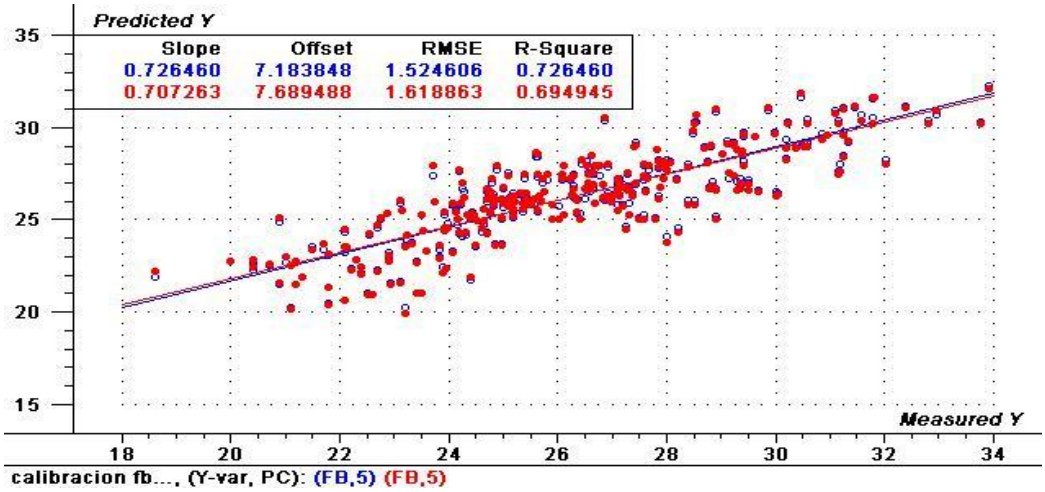


Figura 8.Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la FB, con pretratamiento 1,10,15 en validación cruzada

En la figura 9 se aprecia la gran variabilidad de longitudes de onda con influencia en las ecuaciones de predicción. Así, los altos coeficientes de regresión a los 1153 y 1335 nm se relacionan con el mayor nivel de absorbancia en forrajes con alto nivel de fibra (Norris *et al*., 1976). Valores próximos a los 1700 nm, se asocian a estructuras de tipo aromático, entre las que puede incluirse la lignina (Bran+Luebbe, 1989, Russel *et al*., 1989) y las cargas negativas están asociadas al almidón (1448 nm, Bran+Luebbe, 1989). Se observa además que a 1732 nm se produce el estiramiento y primer sobretono del enlace C-H, que al igual que a los 1744 nm parecen relacionarse con la presencia de otros componentes en la muestra (Williams y Norris, 1987); habiéndose identificado previamente esta última como asociada a la medición de fibra bruta (López, 1997). Entre los 2200 y 2300 nm se encuentran zonas espectrales con peso la determinación de celulosa (Bran+Luebbe, 1989, Williams y Norris, 1987). De hecho, Givens *et al*. (1992), encuentran importante los 2236 nm en pruebas para determinar el contenido en energía metabolizable de distintos pastos, siendo bien conocido que es el contenido en fibra el

factor que más afecta el nivel energético de alimento (McDonald *et al*., 2002). Los 2298 nm se encuentran centrados en una señal asociada al almidón (2280nm) (Bran+Luebbe, 1989, Williams y Norris, 1987). De esta manera puede comprobarse cómo todas las cargas positivas se asocian directa o indirectamente a la presencia de material fibroso en el triticale.

A pesar de la complejidad de las cargas espectrales, la modelización de la fibra bruta se encuentra asentada sobre bandas directamente relacionadas con estructuras de pared celular, junto con otras zonas espectrales indirectamente relacionadas con las propiedades de la muestra.

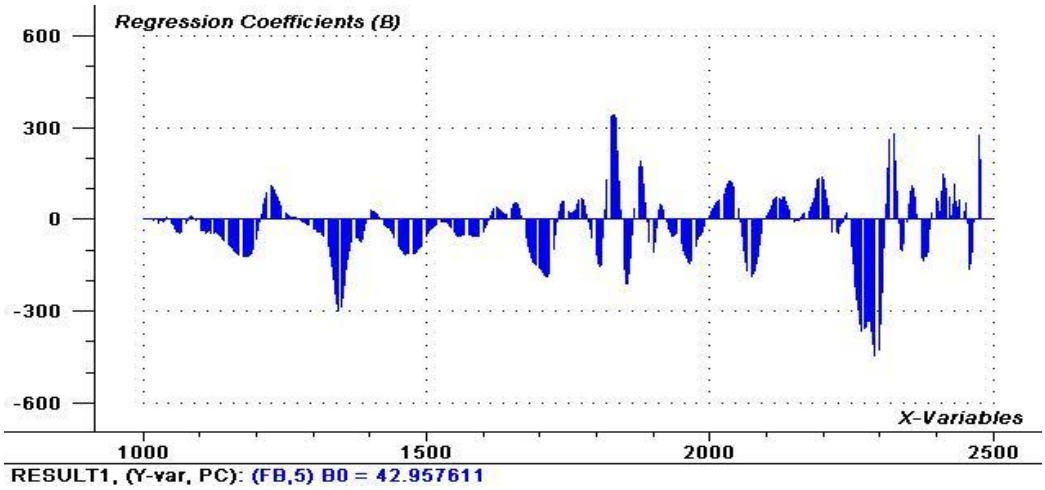


Figura 9. Coeficientes de regresión de las longitudes de onda para la determinación de la FB, con el pretramiento 1, 10, 15

Los estadísticos descriptivos del conjunto de muestras de validación externa y los relacionados con la habilidad predictiva del modelo, se muestran en la tabla 9. No se observa un buen comportamiento en la predicción del contenido en FB en muestras externas, ya que el coeficiente de determinación (R^2_{VE} =0.6689) y el RPD fueron bajos, aunque el error estándar de predicción en validación externa (EEP= 1.574) fue aceptable. Otros estudios anteriores (Castro *et al*., 2010; Dale *et al.*, 2013; Maslovaric *et al.*, 2011) obtuvieron valores superiores en muestras de praderas (R^2_{VE} > 0.96; EE_{VC}=0.80 y RPD= 5.17), alfalfa (R^2_{VE} > 0.96; EEP=1.058 y RPD= 3.97) y piensos (R^2_{VE} > 0.93, EEP=0.043 y RPD= 7.44). Es por esto que es necesario mejorar el modelo.

Tabla 9. Estadísticos de predicción de la validación externa del modelo para FB

Parámetro (g 100g^{-1} MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	R^2_{VE}	EEP	RPD (DE/ EEP)
FB	30	21.10	32.39	26.75	2.75	0.6689	1.554	1.749

La correlación entre el valor real y el predicho de las muestras externas, con el modelo seleccionado, así como los estadísticos del ajuste, se muestran en la figura 10:

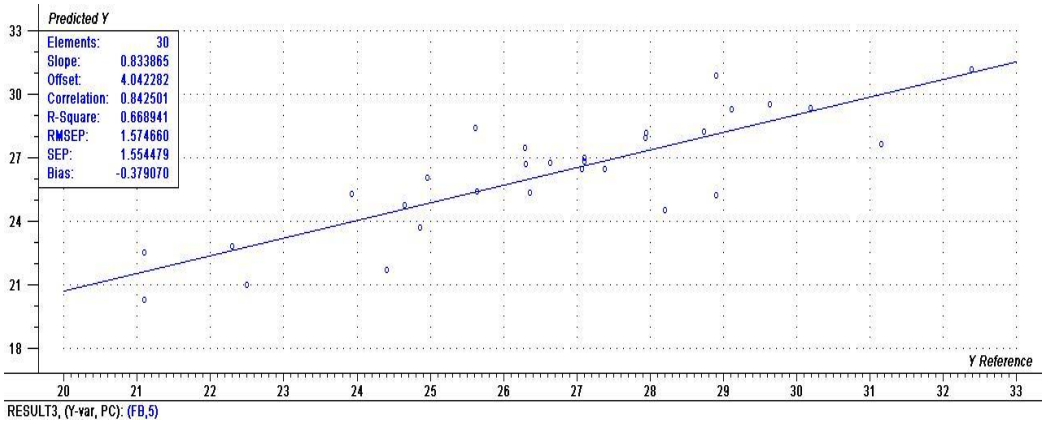


Figura 10.Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la FB, con pretratamiento 1+10+15 en validación externa

Fibra Neutro Detergente (FND)

El protocolo de análisis para la determinación del contenido en FND fue similar al de la FB y PB. Los resultados estadísticos descriptivos del valor de la propiedad se muestran en la tabla 10; donde se observa el rango de distribución tras la eliminación de muestras aberrantes, que coincide con el rango típico de forrajes de triticale en época de pastoreo para las dehesas de Extremadura (Polo, 2010, Sánchez, 2010; Fulkerson *et al*., 2007).

Tabla 10. Estadísticos descriptivos del conjunto de calibración del contenido en FND

Parámetro (g 100 g^{-1} MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	CV (%)
FND	249	40.00	61.55	50.78	3.35	0.07

Tras evaluar las capacidades predictivas (tabla 11) de los diferentes pretratamientos utilizados, se observa que el mejor comportamiento coincide con la aplicación de la 2ª derivada (2, 10, 15) (Figura 11); ya que en validación cruzada se obtiene un 1-VR=0.7842, EE_{VC}=1.4573 y un RPD=5.994 (Figura 12). Por lo que, al estar el RPD por encima de 4, la calibración es excelente según Saeys *et al*. (2004).

Tabla 11. Estadísticos del conjunto de muestras para la calibración de FND

PLS	n	CP	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN CRUZADA			RPD
Tratamiento			R^2	EEC	1-VR	EE_{VC}	DE	(DE/EE_{VC})
Absorbancia	249	10	0.8614	1.1775	0.7724	1.5191	7.9331	5.222
EMSC	249	8	0.7584	1.5324	0.7269	1.6338	2.7101	1.658
1,10,5+EMSC	249	5	0.8062	1.3724	0.7401	1.5950	2.7777	1.741
1,10,10+EMSC	249	5	0.7972	1.4042	0.7602	1.5324	2.7810	1.814
1,10,15+EMSC	249	5	0.7914	1.4238	0.7567	1.5460	2.7757	1.795
1,15,5+EMSC	249	5	0.7788	1.4663	0.7485	1.5707	2.7298	1.737
1,15,10+EMSC	249	5	0.7939	1.4156	0.7562	1.5454	2.7847	1.801
1,15,15+EMSC	249	5	0.7888	1.4339	0.7654	1.5185	2.7807	1.831
SNV	249	8	0.7909	1.4256	0.7457	1.5775	2.7810	1.762
1,10,5+SNV	249	5	0.7809	1.4595	0.7391	1.6022	2.7618	1.723
1,10,10+SNV	249	5	0.7786	1.4670	0.7473	1.5738	2.7627	1.755
1,10,15+SNV	249	5	0.7787	1.4666	0.7494	1.5657	2.7822	1.776
1,15,5+SNV	249	5	0.7803	1.4612	0.7388	1.5999	2.7537	1.721
1,15,10+SNV	249	5	0.7784	1.4675	0.7564	1.5446	2.7725	1.794
1,15,15+SNV	249	5	0.7773	1.4713	0.7556	1.5439	2.7819	1.801
1,10,5	249	5	0.8064	1.3718	0.7567	1.5460	2.7869	1.802
1,10,10	249	5	0.8072	1.3690	0.7770	1.4826	2.8077	1.893
1,10,15	249	5	0.8035	1.3819	0.7741	1.4802	2.8053	1.895
1,15,5	249	5	0.8088	1.3633	0.7514	1.5557	2.8043	1.802
1,15,10	249	5	0.8056	1.3746	0.7713	1.4936	2.8065	1.879
1,15,15	249	5	0.8006	1.3923	0.7709	1.4992	2.7738	1.853
2,5,5	249	6	0.7422	1.5830	0.6483	1.8658	2.6017	1.394
2,5,10	249	8	0.8412	1.2422	0.7765	1.4855	8.7922	5.918
2,5,15	249	8	0.8297	1.2867	0.7655	1.5200	8.7832	5.778
2,10,5	249	8	0.8450	1.2276	0.7347	1.6155	8.7890	5.440
2,10,10	249	8	0.8292	1.2885	0.7761	1.4810	8.7954	5.938
2,10,15	**249**	**8**	**0.8187**	**1.3275**	**0.7842**	**1.4573**	**8.7910**	**5.994**

EMSC: corrección multiplicativa extensivas de la señal; **SNV**: corrección dispersiva desviación estándar normalizada; **(1,10,5) y (2,10,5)**: donde el primer término es el orden de la derivada aplicada, el segundo hace referencia al intervalo de sustracción o GAP y el tercero a la longitud del segmento de suavizado; **n**: número de muestras; **P**: número de términos en la ecuación; **R^2**: coeficiente de determinación de la calibración; **EEC**: error estándar de calibración; **1-VR**: coeficiente de determinación de la validación cruzada; **EE_{VC}**: error estándar de validación cruzada; **DE**: desviación estándar; **RPD**: cociente entre la DE del grupo de validación y el EE_{VC}.

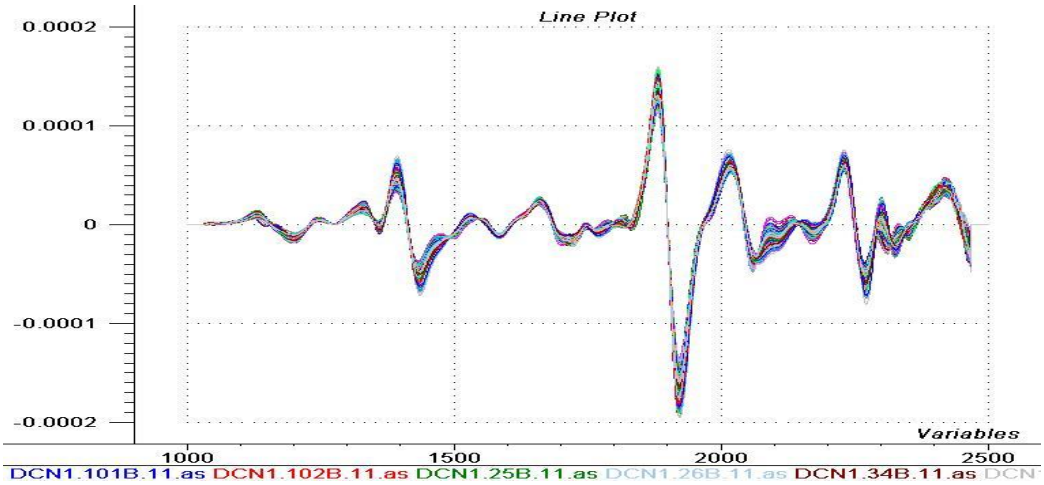


Figura 11. Conjunto de los espectros con tratamiento 2,10,15 de las 249 muestras de FND

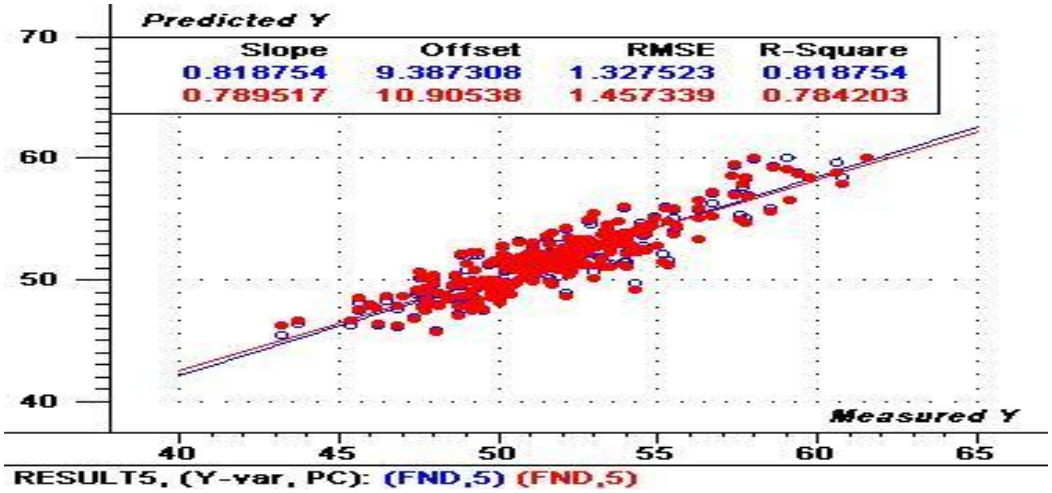


Figura 12. Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la FND, con pretratamiento 2,10,15 en validación cruzada

Por otra parte, en la figura 13 se representan las longitudes de onda con mayor influencia en la ecuación de calibración seleccionada. En este caso se corresponden con los 1100 nm, 1190 nm, 1450 nm, 1792 nm, 1900 nm, 2210 nm y 2366 nm, entre otras. Estudios previos realizados por Norris *et al*. (1976) consideran las longitudes de onda 1586 nm, 1702 nm, 1850 nm, 1902 nm, 2204 nm y 2294 nm, para la calibración de FND en forraje seco de alfalfa. Osborne y Fearn (1986) hacen referencia a las longitudes de onda, 2328 nm y 2080 nm como bandas absorción de celulosa y 2264 nm, 2316 nm y 2320 nm para hemicelulosa, ambas componentes de la FND; probándose así que las longitudes de onda utilizadas están relacionadas con la FND.

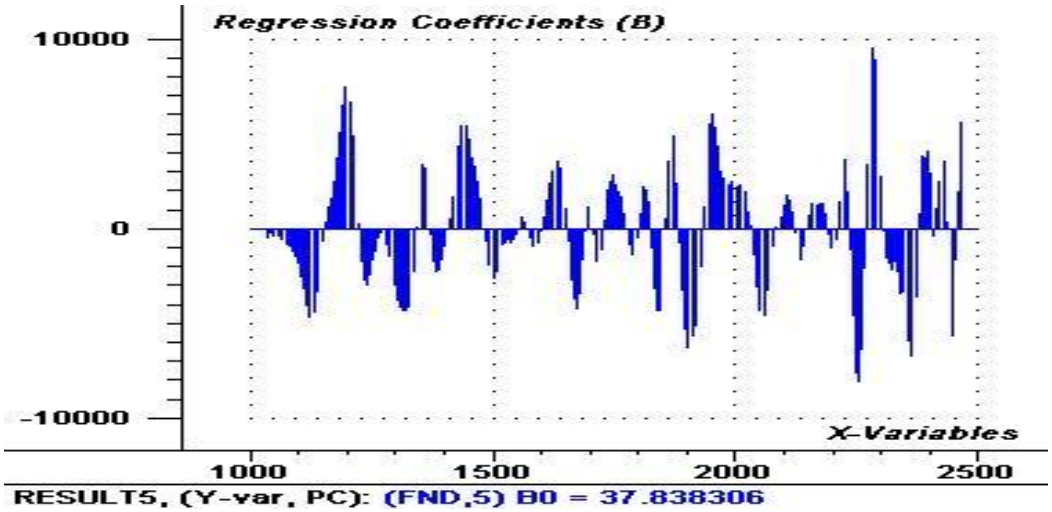


Figura 13 Coeficientes de regresión para la proteína con corrección 2,10,15, altos valores absolutos = zonas espectralmente relevantes para la determinación de la FND

La validación del modelo seleccionado, realizada con el conjunto de muestras externas, nos mostró los estadísticos descriptivos y de predicción que aparecen en la tabla 12. La habilidad predictiva del contenido en FND (figura 14) de las mismas, no fue el esperado ya que los valores de los principales indicadores son mejorables (R^2_{VE} = 0.5660; EEP= 1.976; RPD< 3). Según Saeys *et al*. (2004) valores de RPD<3 corresponden a calibraciones poco fiables.

Tabla 12. Estadísticos de predicción de la validación externa del modelo para FND

Parámetro (g 100g^{-1} MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	R^2_{VE}	EEP	RPD (DE/EEP)
FND	30	44.90	59.27	52.09	2.953	0.5660	1.976	1.42

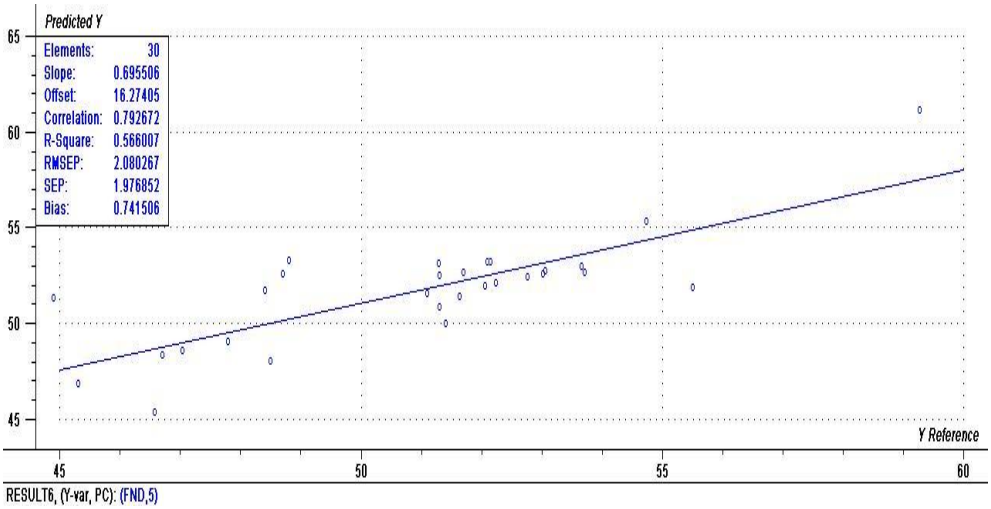


Figura 14. Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la FND, con pretratamiento 2,10,15 en validación externa.

Fibra Ácido Detergente (FAD)

Los resultados del conjunto de muestras de calibración para FAD (tabla 13) indican que se han tenido que eliminar algunas muestras con comportamientos anómalos para la elaboración de los modelos de predicción. El rango de la propiedad, sin embargo, no es muy amplio, pero similar al observado por Polo (2010), Sánchez (2010) y Fulkerson *et al*. (2007) en estudios con triticale para aprovechamiento animal.

Tabla 13. Estadísticos descriptivos del conjunto de calibración del contenido en FAD

Parámetro (g 100 g^{-1} MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	CV (%)
FAD	240	23.50	37.20	30.35	2.52	0.08

A continuación, se muestran los valores de los modelos predictivos en cada pretratamiento utilizado (tabla 14); donde se observa que el mejor comportamiento corresponde con la combinación de aplicar la derivada de orden 1 (1, 10, 15)+SNV. Pero en cualquier caso los resultados no fueron satisfactorios, ya que a pesar de que el valor 1-VR fue superior al 70%

y el EE_{VC} fue relativamente bajo (=1.2909), el índice RPD fue inferior a 2. Otros autores han reportado mejores resultados para FAD en estudios con especies forrajeras (Norris *et al*., 1976), ensilajes de pradera (Ibáñez y Alomar, 2007) aplicando la 2ª derivada o Stubbs *et al*. (2010) en estudios con paja de cereales de invierno, aplicando un pretratamiento SNV-D junto a 1º derivada (1, 4, 2).

Tabla 14. Estadísticos del conjunto de muestras para la calibración de FAD

PLS	n	CP	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN CRUZADA			RPD (DE/EE_{VC})
Tratamiento			R^2	EEC	1-VR	EE_{VC}	DE	
Absorbancia	245	6	0.7030	1.2909	0.6658	1.3763	1.9810	1.439
EMSC	240	7	0.7717	1.1373	0.6856	1.3418	2.0542	1.531
1,10,5+EMSC	240	6	0.7267	1.2382	0.6364	1.4329	2.0083	1.401
1,10,10+EMSC	240	6	0.7403	1.2072	0.6691	1.3724	2.0136	1.472
1,10,15+EMSC	240	6	0.7443	1.1977	0.6873	1.3275	2.0442	1.539
1,15,5+EMSC	240	6	0.7200	1.2533	0.6451	1.4165	1.9988	1.411
1,15,10+EMSC	240	6	0.7475	1.1902	0.6783	1.3498	2.0113	1.490
1,15,15+EMSC	240	6	0.7436	1.1993	0.6945	1.3170	2.0308	1.541
SNV	240	7	0.7024	1.2986	0.6601	1.3905	1.9951	1.434
1,10,5+SNV	240	6	0.7685	1.1397	0.6703	1.3628	2.0496	1.503
1,10,10+SNV	240	6	0.7308	1.2289	0.6751	1.3559	2.0043	1.478
1,10,15+SNV	**240**	**6**	**0.8099**	**0.9965**	**0.7649**	**1.1119**	**2.0596**	**1.852**
1,15,5+SNV	240	6	0.7358	1.2174	0.6667	1.3753	2.0186	1.467
1,15,10+SNV	240	6	0.7574	1.1666	0.6966	1.3078	2.0425	1.568
1,15,15+SNV	240	6	0.7543	1.1740	0.7008	1.3005	2.0435	1.571
1,10,5	240	7	0.7392	1.2157	0.6613	1.3923	2.0520	1.473
1,10,10	240	6	0.7360	1.2169	0.6851	1.3308	2.0254	1.521
1,10,15	240	6	0.7313	1.2279	0.6949	1.3162	2.0081	1.525
1,15,5	240	6	0.7416	1.2041	0.6822	1.3411	2.0206	1.506
1,15,10	240	6	0.7521	1.1794	0.7004	1.3022	2.0508	1.574
1,15,15	240	6	0.7320	1.2263	0.7014	1.3031	2.0165	1.547
2,5,5	240	5	0.6156	1.4686	0.4585	1.7496	1.8081	1.031
2,5,10	240	10	0.7845	1.0994	0.6743	1.3559	2.0682	1.525
2,5,15	240	8	0.7649	1.1486	0.6864	1.3375	2.0368	1.522
2,10,5	240	10	0.8066	1.0416	0.6134	1.4767	2.0681	1.400
2,10,10	240	8	0.7679	1.1412	0.6654	1.3770	2.0647	1.499
2,10,15	240	8	0.7528	1.1778	0.6920	1.3195	2.0620	1.562

EMSC: corrección multiplicativa extensivas de la señal; **SNV**: corrección dispersiva desviación estándar normalizada; **(1,10,5) y (2,10,5)**: donde el primer término es el orden de la derivada aplicada, el segundo hace referencia al intervalo de sustracción o GAP y el tercero a la longitud del segmento de suavizado; **n**: número de muestras; **P**: número de términos en la ecuación; **R^2**: coeficiente de determinación de la calibración; **EEC**: error estándar de calibración; **1-VR**: coeficiente de determinación de la validación cruzada; **EE_{VC}**: error estándar de validación cruzada; **DE**: desviación estándar; **RPD**: cociente entre la DE del grupo de validación y el EE_{VC}.

El pretramiento seleccionado (1,10,15+SNV) conlleva una simplificación espectral que puede examinarse en la figura 15, apreciándose las zonas espectrales que tienen mayor relación con la FAD, mencionadas en la figura 17.

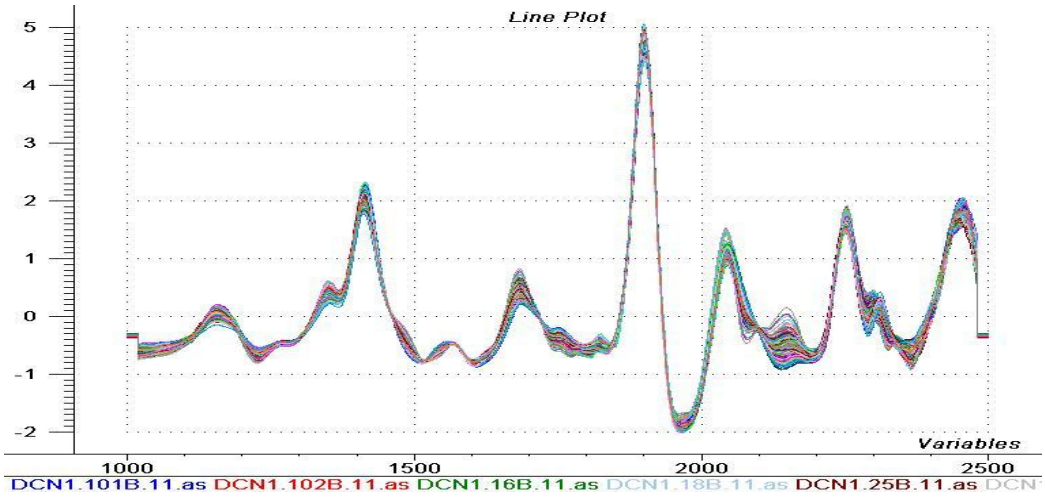


Figura 15. Conjunto de los espectros con tratamiento 1,10,15+SNV de las 69 muestras de FAD

Gráficamente (figura 16) se muestra el ajuste lineal de los puntos del valor de la propiedad predicho frente al real

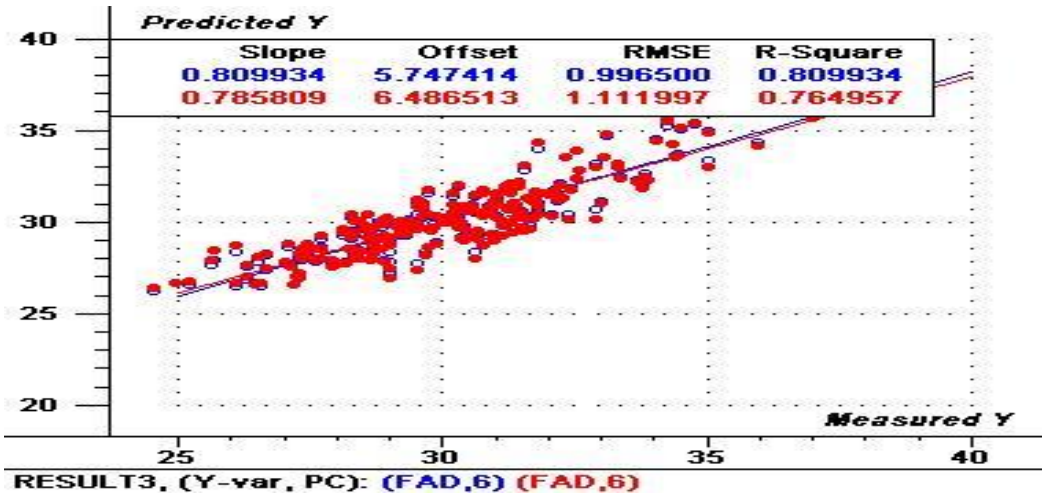


Figura 16. Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la FAD, con pretratamiento 1,10,15+SNV en validación cruzada

Las longitudes de onda con mayor carga inicial en la ecuación de predicción (figura 17) fueron 1136, 1411, 1890, 1911, 2195, 2249 y 2455 nm. Éstas son próximas a las que indican autores como Osborne y Fearn (1986), asociadas de la celulosa (2328, 2080 nm), o a los 1672, 1700, 1940, 2100, 2180 y 2336 nm que señalan Norris *et al*. (1976).

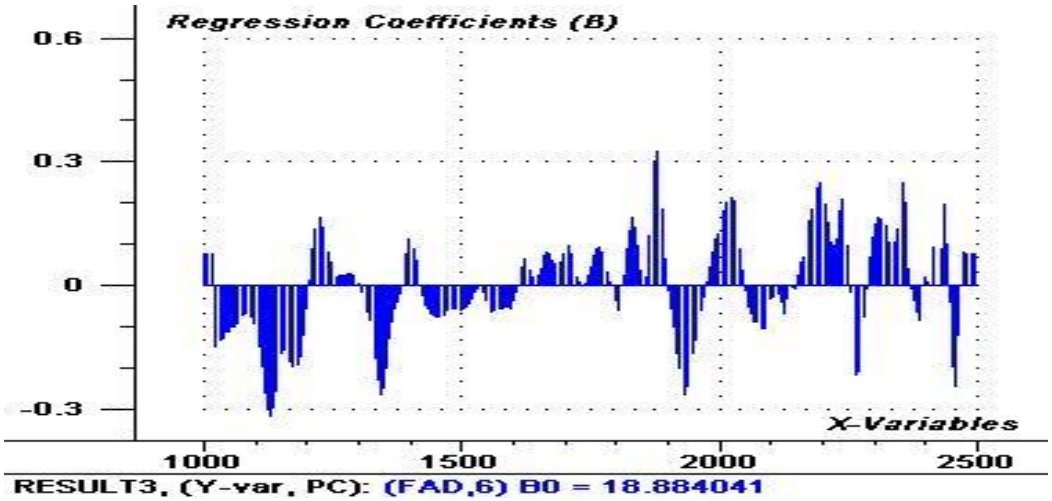


Figura 17. Coeficientes de regresión para la proteína con corrección 1,10,15+SNV, altos valores absolutos = zonas espectralmente relevantes para la determinación de la FAD

La predicción del contenido en FAD de las muestras externas (tabla 15 y figura 18) con la ecuación seleccionada, no mostró un comportamiento satisfactorio; ya que aunque el EEP fue bajo, los valores del coeficiente de determinación (R^2_{VE}) y RPD (0.5703 y 1.31, respectivamente) no alcanzaron los valores esperados.

Tabla 15. Estadísticos de predicción de la validación externa del modelo para FAD

Parámetro (g $100g^{-1}$ MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	R^2_{VE}	EEP	RPD (DE/EEP)
FAD	30	26.20	35.29	30.75	1.81	0.5703	1.406	1.31

Otros estudios, sin embargo, sí mostraron buenas ecuaciones de predicción. Así, Stubbs *et al*. (2010), en trabajos con paja de cereales de invierno, reportaron unos valores de EEP= 0.81 y R^2= 0.92 con pretratamiento SNV-D junto a 2º derivada (2, 4, 4). Por su parte Roza *et al.* (1991), en hierba de praderas naturales, obtuvieron un R^2> 0.836 y un EEP= 3.24, utilizando como pretratamiento la 3º derivada con gap 16 y segmento 2 ó Vásquez *et al.* (2004), en pasto de Guinea, con la validación externa alcanzan un R^2= 0.737 con 2º derivada, (2, 4, 4, 1), aunque un EEP mayor.

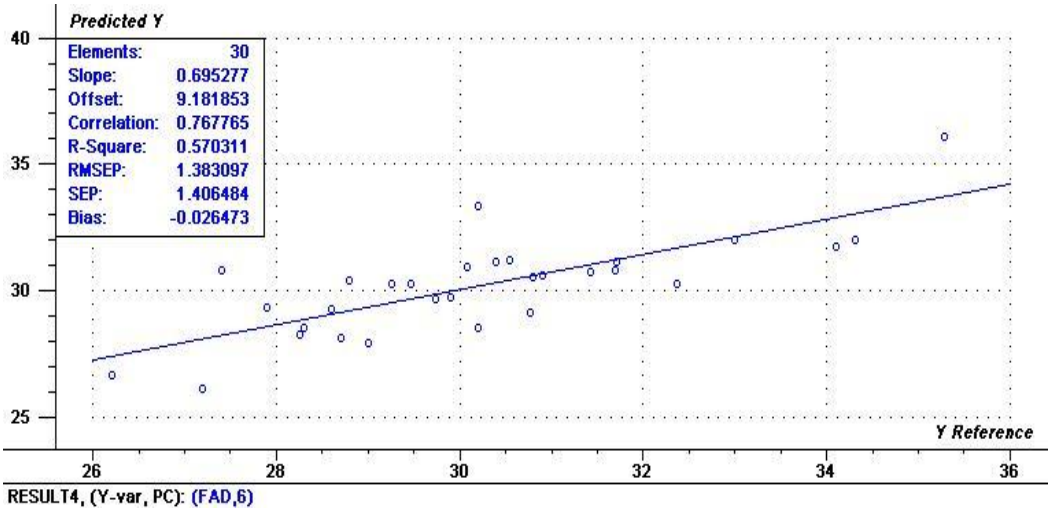


Figura 18.Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la FAD, con pretratamiento 1,10,15+SNV en validación externa

Lignina Ácido Detergente (LAD)

Los estadísticos descriptivos del conjunto de muestras de calibración para la determinación del contenido en LAD se muestran en la tabla 16. Estos resultados están en concordancia con los descritos por Polo (2010), Sánchez (2010) y Fulkerson *et al*. (2007) en estudios con forraje triticale.

Tabla 16. Estadísticos descriptivos del conjunto de calibración del contenido en LAD

Parámetro (g 100 g^{-1} MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	CV (%)
LAD	215	3.10	11.93	7.52	1.71	0.23

Las ecuaciones de predicción para el contenido en LAD de las muestras de triticale, con cada pretratamiento espectral realizado, se muestran en la tabla 17. Tras una primera evaluación de los resultados obtenidos, se puede afirmar que los mejores estadísticos predictivos corresponde con el modelo (2, 10, 15), ya que mostró un 1-VR > 0.7 y un EE_{VC} = 1.1721. Aunque en estudios similares (Stubbs *et al*., 2010) con paja de cereales de invierno se observan mejores resultados (EE_{VC}= 0.039 y 1-VR= 0.85 y RPD= 2.51) aplicando como pretramiento un SNV-D junto con la 1ª derivada (1, 4, 4, 1).

Tabla 17. Estadísticos del conjunto de muestras para la calibración de LAD

PLS	n	CP	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN CRUZADA			RPD
Tratamiento			R^2	EEC	1-VR	EE_{VC}	DE	(DE/EE_{VC})
Absorbancia	255	8	0.7037	1.1664	0.5981	1.3592	1.8127	1.333
EMSC	252	6	0.6512	1.3798	0.5510	1.5723	1.9302	1.227
1,10,5+EMSC	253	5	0.6199	1.4517	0.5282	1.6178	1.9015	1.174
1,10,10+EMSC	253	6	0.6368	1.4189	0.5573	1.5731	2.0255	1.287
1,10,15+EMSC	253	6	0.6248	1.4915	0.5636	1.6142	1.9717	1.221
1,15,5+EMSC	249	6	0.6726	1.3324	0.5680	1.5406	1.9318	1.253
1,15,10+EMSC	241	6	0.6581	1.3114	0.5892	1.4413	1.8466	1.281
1,15,15+EMSC	238	6	0.6615	1.3025	0.6146	1.3912	1.8462	1.327
SNV	252	7	0.6534	1.3862	0.5482	1.5854	1.9348	1.220
1,10,5+SNV	247	5	0.6161	1.4783	0.5000	1.6885	1.9114	1.132
1,10,10+SNV	253	6	0.6091	1.5224	0.5481	1.6430	1.9297	1.174
1,10,15+SNV	253	6	0.6256	1.4899	0.5705	1.6004	2.0277	1.266
1,15,5+SNV	247	6	0.6840	1.3101	0.5892	1.5001	1.9149	1.276
1,15,10+SNV	243	6	0.6564	1.3473	0.5944	1.4673	1.8942	1.290
1,15,15+SNV	239	6	0.6731	1.2935	0.6226	1.3906	1.8666	1.342
1,10,5	251	6	0.6559	1.4526	0.5406	1.6819	2.0141	1.197
1,10,10	251	6	0.6364	1.4113	0.5612	1.5598	2.0061	1.286
1,10,15	251	6	0.6026	1.4755	0.5563	1.5662	1.8524	1.182
1,15,5	247	6	0.6703	1.3257	0.5807	1.5043	1.8959	1.260
1,15,10	248	6	0.6292	1.3996	0.5776	1.5003	1.8423	1.227
1,15,15	239	6	0.6358	1.3417	0.5948	1.4210	1.8013	1.276
2,5,5	220	8	0.6828	1.1245	0.4528	1.4907	1.6029	1.075
2,5,10	236	8	0.6769	1.2770	0.5488	1.5148	1.8256	1.205
2,5,15	240	8	0.6827	1.2473	0.6022	1.4041	1.8320	1.304
2,10,5	253	8	0.6736	1.3452	0.4963	1.6792	1.9007	1.131
2,10,10	237	8	0.7054	1.1860	0.6268	1.3440	1.8297	1.361
2,10,15	**215**	**8**	**0.7927**	**1.0196**	**0.7287**	**1.1721**	**1.9786**	**1.688**

EMSC: corrección multiplicativa extensivas de la señal; **SNV**: corrección dispersiva desviación estándar normalizada; **(1,10,5) y (2,10,5)**: donde el primer término es el orden de la derivada aplicada, el segundo hace referencia al intervalo de sustracción o GAP y el tercero a la longitud del segmento de suavizado; **n**: número de muestras; **P**: número de términos en la ecuación; **R^2**: coeficiente de determinación de la calibración; **EEC**: error estándar de calibración; **1-VR**: coeficiente de determinación de la validación cruzada; **EE_{VC}**: error estándar de validación cruzada; **DE**: desviación estándar; **RPD**: cociente entre la DE del grupo de validación y el EE_{VC}.

En la figura 19 se representa la simplificación espectral del conjunto de muestras de calibración aplicando el pretratamiento seleccionado (2, 10, 15) y en la figura 20, la correlación entre el valor real y el predicho aplicando dicha ecuación. Por otra parte, los coeficientes de regresion de las diferentes longitudes de onda implicadas (figura 21) muestran que los mayores valores aparecen a los 1100, 1150, 1300, 1495, 1650, 1680, 1900, 2000, 2200 y 2300 nm. Para Bran+Luebbe (1989) y Russel *et al*, (1989), los 1672 nm están asociados a estructuras de tipo aromático, entre las que puede incluirse la lignina y que, además, ha sido reiteradamente relacionada con la digestibilidd de forrajes ligninocelulósicos (Guzmán *et al*., 1996). Via *et al.* (2008) asocian los 1135, 1672, 1900 nm como longitudes de onda asociadas a la lignina. Como puede observarse, las longitudes de onda utilizadas para la calibración están en consonancia con las de estos autores.

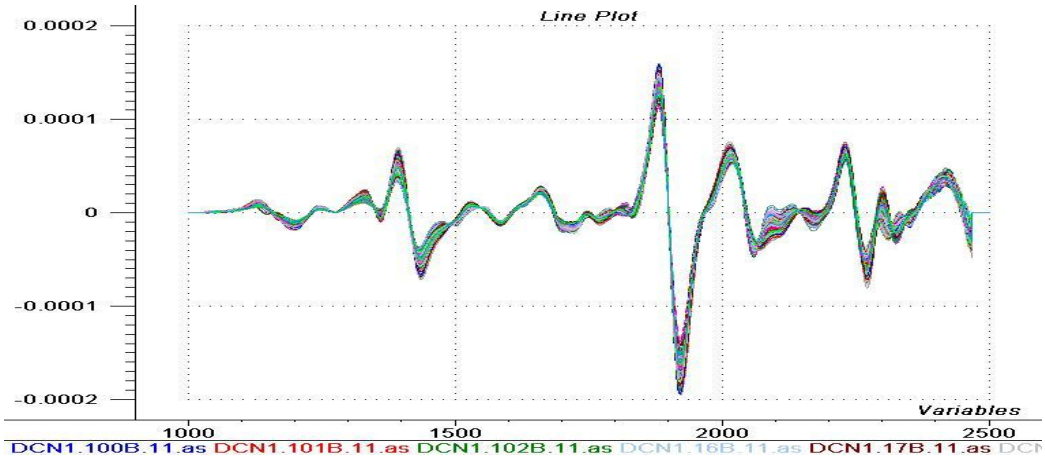


Figura 19. Conjunto de los espectros con tratamiento 2,10,15 de las 215 muestras de LAD

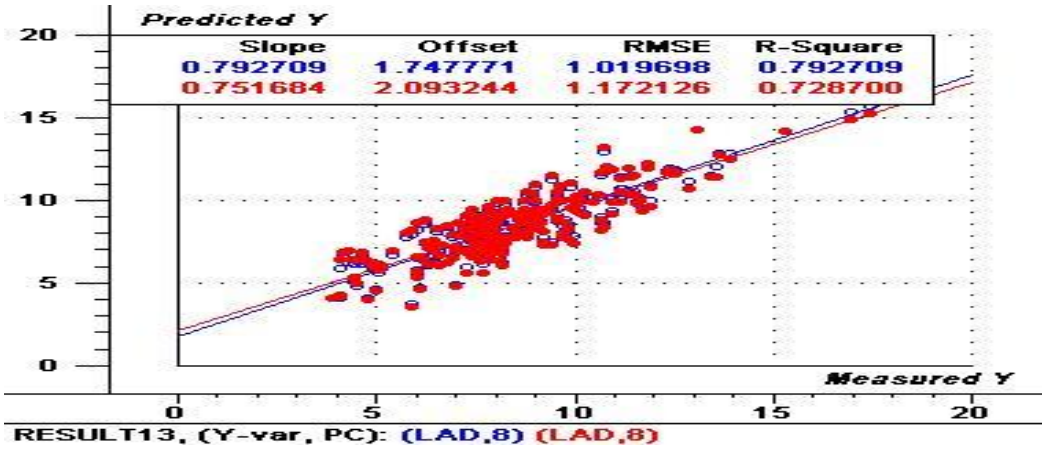


Figura 20. Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la LAD, con pretratamiento 2,10,15 en validación cruzada

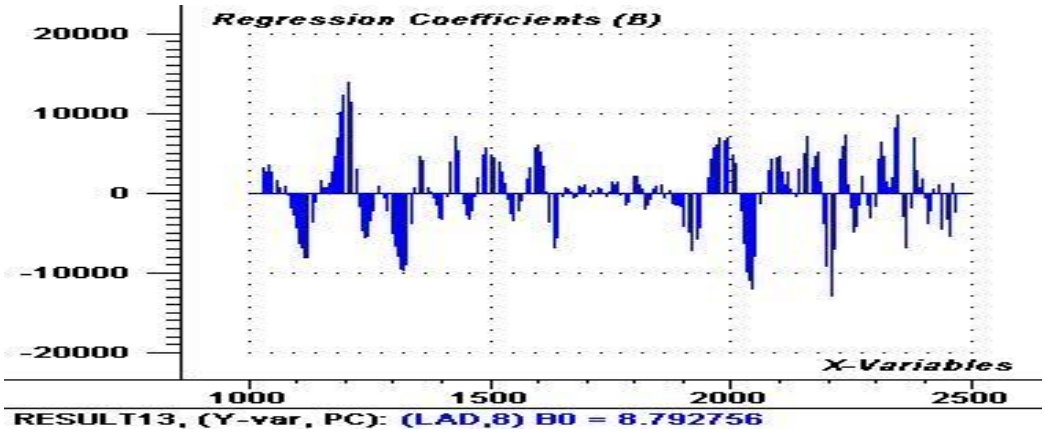


Figura 21. Coeficientes de regresión para la LAD con corrección 2,10,15, altos valores absolutos = zonas espectralmente relevantes para la determinación de la LAD

La predicción del conjunto de muestras externas (tabla 18 y figura 22) nos reportó unos resultados poco fiables, ya que el EEP= 2.51 y el índice RPD < 1.5. El error obtenido fue similar al observado por Vásquez *et al.* (2004) en pasto de Guinea (EEP= 2.445), aplicando una 2º derivada (2, 4, 4). Por otra parte, Stubbs *et al*. (2010) en paja de cereales de invierno,

obtuvieron un valor del EEP= 0.44 y R^2> 0.81 con pretratamiento SNV-D junto a 1º derivada, gap 4 y suavizado 4. Es por esto que la habilidad predictiva obtenida con nuestras ecuaciones es mejorable y se debe seguir trabajando en ello.

Tabla 18. Estadísticos de predicción de la validación externa del modelo para LAD

Parámetro (g $100g^{-1}$ MS)	n	Mínimo	Máximo	Media	DE	R^2_{VE}	EEP	RPD (DE/EEP)
LAD	30	3.90	10.76	7.33	3.36	0.2019	2.51	1.339

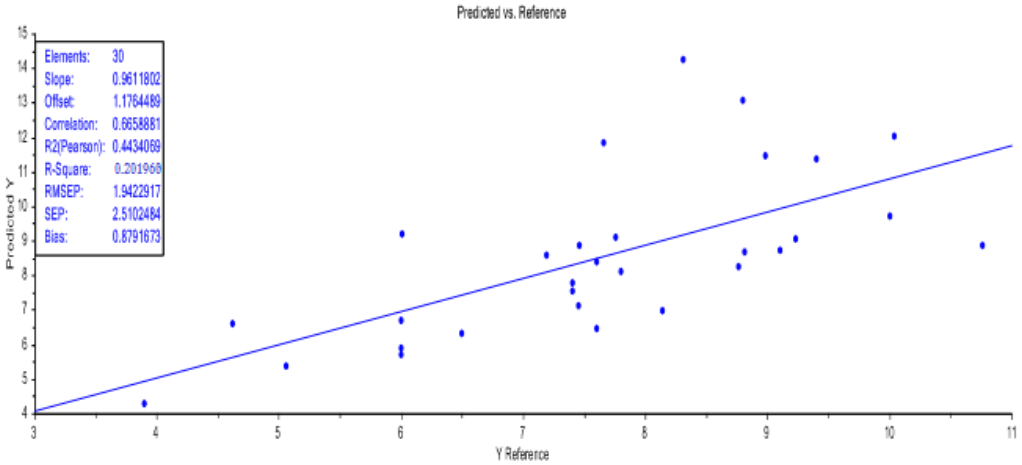


Figura 22. Relación entre el valor real del laboratorio y el valor predicho en NIRS para la LAD, con pretratamiento 2+10+15 en validación externa

Tras evaluar la capacidad de predicción de la tecnología NIRS para los parámetros de este estudio (PB, FB, FNA, FAD y LAD) de muestras de triticale de doble aptitud cv. `Verato´, se podría afirmar que puede ser usada para la cuantificación del contenido en PB de una manera fiable. Sin embargo, para la predicción de la FB, los estadísticos obtenido son aceptables, aunque se podría seguir trabajando para mejorar las ecuaciones de predicción obtenidas al igual que para el resto de parámetros

.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC (1969) Official Method 9689.06 Protein (Crude) In Animal Feed. Dumas Method.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC (2003) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical 305 Chemists (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.

BIRTH G.S. Y HECHT H.G. (1987) The Physics of Near-Infrared Reflectance. En: P. Willliams & K. Norris (eds) Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. American Association of Cereal Chemits, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

BRAN+LÜEBBE (1989) User's Reference Manual for Bran+Lübbe InfraAlyzer Data Analysis Software (IDAS). New York, USA. Bran+Luebbe Analyzing Technologies Inc.

CALDERÓN F., VIGIL M., REEVES J. Y POSS D. (2009) Mid-Infrared and Near-Infrared Calibrations for Nutritional Parameters of Triticale (Triticosecale) and Pea (Pisum sativum). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (12), 5136-5142.

CAMO (2013). The Unscrambler methods. Camo Software AS. Oslo, Norway

CAMPO L., CASTRO P., MORENO J. (2007) Calibración NIRS para estimar la digestibilidad de la materia orgánica de la planta entera de maíz en híbridos seleccionados para forraje. En: Neiker (Ed) Los sistemas forrajeros: entre la producción y el paisaje, pp. 461-467. Vitoria-Gasteiz, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP).

CASTRO P., BAEZ D. Y ROCA A. (2010) Análisis de macronutrientes en muestras de pradera mediante espectroscopía NIR. En: IV Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes. Encuentro de la SEEP y la Sociedad Portuguesa de Pastos y Forrajes (SPPF). Pastos: fuente natural de energía. pp. 279-283. Zamora-Miranda do Douro.

CUEVAS J.M. (2005) Calibración de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para medición de la composición química de praderas (muestras secas) en la Décima Región. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía. Universidad austral de chile. Facultad de ciencias agrarias. Escuela de agronomía. Valdivia. Chile.

DALE L., THEWIS A., ROTAR I., BOUDRY C., VIDICAN R., MAALINAS A., FLORIAN V., LECLER B., AGNEESSENS R., FERNÁNDEZ J. Y BAETEN V. (2013) Determination of Romanian alfalfa crude protein and crude fiber contents as well as in vitro organic matter digestibility by NIR spectrometry. Scientific Papers, Animal Science, Series D. 55.

DE BOEVER J.L., VANACKER J.M., FIEMS L.O Y DE BRABANDER D.L. (2004) Rumen degradation characteristics and protein value of grassland products and their prediction by laboratory measurements and NIRS. Animal Feed Science and Technology, 116, 53-66.

DEAVILLE E.Y FLINN P. (2000) Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake.

FULKERSON W.A., HORADAGODA A., NEAL J.S., BARCHIA I. Y NANDRA K.S. (2007) Nutritivie value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: Herbs and grain crops. Livestock Science, 114, 75-83.

GALLEGO R.A., TEJERINA D., CRUZ V. Y LLERA F. (2013) Uso de la tecnología NIRS como herramienta de predicción del contenido proteico de triticale de doble aptitud cv `Verato´. En: 52ª Reunión Científica de la S.E.E.P. Badajoz. España

GARCÍA B., LEÓN L. Y GARCÍA A. (1977) Determinación directa de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en plantas herbáceas mediante reflectancia de infrarrojos. Pastos, 7, 112-126.

GARCÍA B., LEÓN L. Y GARCÍA A. (1978) Análisis y evaluación automática de forrajes por espectroscopía (R. I.). Longitudes de onda óptimas. Pastos, 8, 311-323.

GARCÍA B., GARCÍA A. Y RICO M. (1988) Predicción de la calidad de pastos por espectroscopía de la reflectancia en el infrarrojo cercano. Análisis de proteína. En: Actas de la XVIII R. C. de la SEEP, pp. 397-404.Jaca. España.

GIL A., LLERA F., GARCÍA A.M. Y RUFO S. (2009) Nuevas oportunidades de alimentación en la dehesa: el triticale. En: La agricultura y la ganadería extremeñas, informe 2008. pp. 173-189. Badajoz, España.

GIVENS (1992) Forage evaluation in ruminant nutrition, pp. 301-320. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing.

GIVENS D.I., Y DEAVILLE E.R. (1999) The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. Australian Journal of Agricultural Research, 50, 1131-1145.

GUZMAN J., GARRIDO A., GOMEZ A., GUERRERO J. Y MURRAY I. (1996) Predicting the expected imporvement in digestibility after ammonia treatament of cereal straws. Animal Feed Science amd Technology, 57, 149-157.

HĂRMĂNESCU M., MOISUC A. Y GERGEN I. (2010) Near infrared spectroscopy – an alternative to determine the crude fiber content of forages. Food and Environment Safety, 9 (3), 105-109.

IBAÑEZ L. Y ALOMAR D. (2007) Predicción de la composición química y parámetros fermentativos de ensilajes de predera mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Chilean Journal Agriculture Reearch.68 (4), 352-359.

INDICO PRO (2013) Analytical Spectral Devices, Inc., dba ASD

KENNEDY C., SHELFORD J. Y WILLIAMS P. (1995) Near infrared spectroscopy analysis of intact grass silage and fresh grass for dry matter, crude protein and acid detergent fiber. En: Davies, A. y Williams, P. (Eds). Near Infrared Spectroscopy: The future Waves. VII International Conference on Near Infrared Spectroscopy. pp: 524-530. Montreal, Canada.

LIPPKE H. Y BARTON F. (1988) Near infrared reflectance spectroscopy for predicting intake of digestible organic matter by cattle. Journal Dairy Science, 71,2986–299.

LLERA F., PÉREZ F. Y AYUSO A. (1997) Fertilización de triticale para forraje y grano. Vida Rural, 42, 42-43.

LLERA F. Y CRUZ V. (2012) El triticale: una interesante alternativa forrajera. Agricultura, 955, 656-658.

LLERA F., DE SANTIAGO A., RIVERA A.Mª., GALLEGO R.A. Y CRUZ, V. (2012) Curvas de dilución de la proteína en un triticale de doble aptitud: influencia de la densidad de siembra, la dosis de nitrógeno y el número de cortes. En: Canals R. y San Emeterio L. (Eds) Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extinción, 417-423. Pamplona, España: Sociedad Española para el estudio de los pastos (SEEP).

LOPEZ M. (1997) Estudio del uso de la técnica NIR para la valoración química de piensas compuestos. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Cáceres.

MARTEN G., HALGERSON J. Y CHERNEY J. (1983) Quality prediction of small grain forages by near infrared reflectance spectroscopy. Crop Science, 23, 94-96.

MARTÍNEZ A. (2002) Necesidades proteicas y aportes de proteína en el ganado vacuno lechero. Mundo Ganadero, 145, 20-28.

MASLOVARIÉ M., JOVANOVIÉ R., JANKOVIÉ S., LEVIÉ J. Y TOLIMIR N. (2011) Application of NIR technology in the animal food industry. Biotechnology in Animal Husbandry, 27 (4),p 1811-1817.

McDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D. (2002). Animal nutrition. 6.ed. Prentice Hall, 692

MILLER C. (2001) Chemical Principles of Near Infrared Technology. En: Williams P. y Norris K. (Eds) The Agricultural and Food Industry, pp. 19-37. American Association of Cereal Chemists; 2nd Ed. St. Paul

MURRAY I. (1988) Aspects of the interpretation of near infrared spectra. Food Science Technology, 2, 135-139.

MURRAY I. (1993) Forage analysis by near infrared spectroscopy. En: Davies et al. (Eds) Chapter 14. Sward Herbage Measurement Handbook, pp. 285-312. British Grassland Society.

NORRIS K., BARNES R., MOORE D., HALGERSON J. Y HORNSTEIN J. (1976) Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. Journal of Animal Science, 43, 889-897.

O'KEFFE M., DOWNWY C. Y BROGEAN J.C. (1987) The use of near infrared reflectance spectroscopy for predicting the quality of grass silage. Journal of the Science of Food Agriculture, 38, 209-216.

OSBORNE B.G. Y FEARN T. (1986) Near Infrared spectroscopy in food analysis. Longman Group UK Limited. Longman House, Harlow. England.

OSBORNE B., FEARN T. Y HINDLE P.H. (1993) Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. En: Pearson Longman (ed) Longmann Scientific and Technical, 227.

PASINI F. (2009) Evaluation of the structural and functional composition of south african triticale cultivars (x triticosecale wittmack). Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE. Department of Food Science. Faculty of AgriSciences. Stellenbosch University

POLO I. (2010) Evaluación de variedades de triticale para distintos aprovechamientos: grano, forraje y biomasa energética y estudio comparativo con variedades de trigo. Tesis doctoral. Departamento de Producción agraria (Área de producción vegetal). Universidad Pública de Navarra.

ROYO C. (1992) El Triticale: bases para el cultivo y aprovechamiento. Madrid, España: Ediciones Mundi Prensa.

ROZA B., MARTÍNEZ A. Y ARGAMENTARÍA A. (1991) Predicción de componentes de la pared celular por reflectancia en el infrarrojo cercano, en hierba de praderas del interior y zona costera asturiana. En: XXXI Reunión Científica de la S.E.E.P. pp. 411-416 Murcia. España.

RUSSEL J., MURRAY I. Y FRASER, A. (1989) Near and mid infrared studies of the cell wall structure of cereal straw in relation to its rumen degradability. En: A. Chesson y E.R. Orksov, (Ed) Physico-chemical characterization of plant residues for industrial and feed use. Elservier, Amsterdan. Netherland.

SAEYS W., DARIUS P.Y RAMON H. (2004) Potential for on-site analysis of hog manure using a visual and near infrared diode array reflectance spectrometer. Journal of near infrared spectroscopy, 12, 299-309.

SÁNCHEZ J. (2010) Dinámica productiva de iferentes cultivares de triticales y avenas como suplemento de los pastos de dehesa y pastizales del s.o. de la provincia de badajoz (extremadura). Trabajo fin de carrera. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. Badajoz.

SHENK J., LANDA I., JOOVER M. Y WESTERHAUS M. (1981) Description and evaluation of a near infrared reflectance spectrocomputer for forage and grain analysis. Crop Science, 21, 355-358

SHENK J., WESTERHAUS M. Y WORKMAN J. (1992) Application of NIR spectroscopy to agricultural products. En: Burns D.A. y Ciurczak E.W. (Eds) Handbook of near infrared analysis, pp. 383–431. New York, EEUU: Marcel Dekker.

STUBBS T.L., KENNEDY A.C. Y FORTUNA, A. (2010) Using NIRS to predict fiber and nutrient content of dryland cereal cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 398-403.

SPSS.PC+. (2005) SPSS Trends 14.0. SPSS Inc. Chicago. EEUU.

TEJERINA D., LÓPEZ M., GARCÍA S. (2009) Potential used of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat physico-chemical composition of guinea fowl (Numida meleagris) reared under different production systems. Food Chemistry, 113, 1290-1296.

TEMPLETON W., SHENK J., NORRIS K., FISSEL G., MARTEN G., ELGIN, J., Y WESTERHAUS M. (1983) Forage analysis with near infrared reflectance spectroscopy: Status and outline of national research project. En J. A. Smith and V.W. Hays (Eds.) Proc. XIV Int. Grassld Congr. Westview Press, Boulder, pp. 528-531. Colorado

VÁSQUEZ D., ABADÍA B. Y ARREAZA L. (2004) Aplicación de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano de maíz. Revista Corporica, 5 (1), 49-55.

VIA B., FERNÁNDEZ E. Y MÉNDEZ J. (2002) Response of near infrared diffuse reflectance spectra to blue stain and Wood age. Journal of near infrared spectroscopy. 16, 71-74.

VILLAMARÍN B., FERNÁNDEZ E. Y MÉNDEZ J. (2002) Analysis of grass silage from Northwestern Spain by near-infrared reflectance spectroscopy. J. AOAC, 85, 541-545.

WATERS C. Y GIVENS D. (1992) Nitrogen degradability of fresh herbage: effect of maturity and growth type, and prediction from chemical composition and ty near infrared reflectance spectroscopy. Animal Feed Science and Technology, 38: 335-349.

WILLIAMS P. (2001) Implementation of near infrared technology. En: Williams Ph. y Norris K. (Eds.) Near infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemis, pp.145-169. St. Paul, Minnesota, USA.

WILLIAMS P. Y NORRIS K. (1987) Variables Affecting Near-Infrared Reflectance Spectroscopic Analysis. En: (Ed) P. Williams and K. Norris. American Association of Cereal Chemits, Inc. Near Infrares Technology in the Agricultural and Food Industries. St. Paul, Minnesota, USA.

5.3. CAPÍTULO III

Clasificación del triticale doble aptitud según la densidad de siembra, la fecha de corte y el abonado nitrogenado, mediante tecnología NIRs

CAPÍTULO III
CLASIFICACIÓN DE TRITICALE DOBLE APTITUD SEGÚN LA DENSIDAD DE SIEMBRA, LA FECHA DE CORTE Y EL ABONADO NITROGENADO, MEDIANTE TECNOLOGÍA NIRs

RESUMEN

Los animales tienen unas necesidades nutricionales mínimas que cubrir con los recursos disponibles y considerando que en la dehesa extremeña éstos escasean, es importante tener en cuenta la variabilidad de la calidad del forraje. Esta calidad es un reflejo de las diferencias dadas, desde que se siembra hasta que se cosecha, por factores genéticos, de manejo y por otros factores de tipo ambiental. El objetivo de esta investigación fue la obtención de un modelo de clasificación de triticale de doble aptitud (forraje y grano) cv `Verato´. Para ello se tomaron los datos espectrales NIRs (1000 a 2500 nm) de cada muestra y se realizaron modelos quimiométricos de clasificación, con muestras sin pretratamiento espectral, con pretratamiento MSC (corrección multiplicativa de la señal, *Multiplicative Scatter Correction*) y con EMSC (corrección multiplicativa extendida de la señal, *Extended Multiplicative* Scatter *Correction*). Los modelos aplicados de clasificación no supervisada fueron un PCA (análisis de componentes principales, *Principal Component Analysis*) y un análisis *cluster* (análisis de conglomerados), con varios métodos de agrupación y medida de distancia euclídea al cuadrado. Los métodos de clasificación supervisada utilizados fueron un análisis SIMCA (modelado independiente por analogía de clases) y PLS-DA (análisis discriminante sobre mínimos cuadrados parciales, *Partial Least Squares Discriminant Analysis).* Las variables cualitativas que se utilizaron como referencia fueron 3 densidades de siembra, 6 épocas de corte (periodo vegetativo) y 3 dosis de abonado nitrogenado. Todo ello se realizó mediante el programa Unscrambler®. Los resultados revelan que no se ha podido agrupar el triticale en función de su densidad de siembra ni dosis de abonado nitrogenado. Sin embargo, la información espectral es adecuada para agrupar el triticale según su fecha de corte, pudiendo ser asociada con el ciclo vegetativo de la planta, siendo los métodos supervisados SIMCA y el PLS-DA los que mejores resultados ofrecen. Por tanto, la tecnología NIRs podría ser usada para discriminar el forraje de triticale de doble aptitud en función del periodo vegetativo en el que se corte, pero no en función de su densidad de siembra ni dosis de abonado nitrogenado.

Palabras clave: *X Triticosecale* Wittmack, análisis NIRs cualitativo, forraje.

INTRODUCCIÓN

Los animales de la dehesa dependen de la disponibilidad de los recursos naturales y tienen unas necesidades diarias que cubrir, como mínimo de mantenimiento, pudiendo ser mayores en función de su estado fisiológico: gestantes o paridas (Hassoun y Bocquier, 2010). Sin embargo, los recursos naturales son limitados en estas zonas y además presentan una gran dependencia de las condiciones climáticas, variables entre campañas.

Por lo tanto nos encontramos con una situación conflictiva: enfrentar unos recursos limitados y variables en su disponibilidad con unas necesidades obligadas y variables a lo largo del ciclo productivo de las ovejas (O'Reagain y McMeniman, 2002).

Una manera de paliar este problema y aumentar los beneficios de agricultores y ganaderos es la utilización de triticale, un cereal que con el paso de los años y gracias a los avances en mejora genética ha logrado ganar interés a nivel mundial. El triticale de doble aptitud (forraje y grano) cv `Verato´, como indican Gil *et al*. (2009) está adaptado a las condiciones agroclimáticas de la región extremeña.

Debido a que una parte de la producción de triticale estará destinada a alimentación, requiere una serie de controles de calidad y caracterización de su composición nutritiva para conocer las necesidades nutritivas que es capaz de cubrir. La tecnología NIRS puede ser una solución a éstos requisitos. En el ámbito agroalimentario ha sido ampliamente utilizada tanto en forrajes (García *et al*., 1977 y 1978), maíz forrajero (Campo *et al*., 2007), así como en carne y productos cárnicos (Tejerina *et al*., 2009). Permite obtener resultados de forma rápida, económica, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente. Requiere de una puesta a punto tanto de las técnicas estadísticas utilizadas, denominadas genéricamente como quimiométricas, así como de la interpretación de datos generados (Brereton, 2009), siendo éstas sus principales desventajas.

En el análisis cualitativo, a diferencia del análisis cuantitativo, no es preciso disponer de ningún dato químico adicional al dato espectroscópico NIR, por lo que el conjunto de datos sólo está constituido por información espectral NIRs.

Hay dos métodos de clasificación en el análisis cualitativo, supervisados y no supervisados. Los no supervisados son aquellos en los que no se dispone de ninguna o escasa información acerca de los grupos existentes en las muestras analizadas. El principal objetivo de éstos métodos es poder identificar tendencias al agrupamiento de las muestras disponibles, sin necesidad de disponer de ningún tipo de información adicional acerca de ellas, nada más que sus datos espectrales (Downey, 1996; Naes *et al.*, 2002).

Los trabajos de Sokal y Sneath (1963), marcan el inicio de las técnicas de agrupamiento (análisis *cluster*), que poco a poco han ido extendiendo sus aplicaciones a todos los ámbitos científicos. Marín (2008) indica que es un método utilizado en zoogeografía, biología y

microbiología, para la elaboración de taxonomías y clasificaciones, las cuales son la base para realizar procesos de análisis complejos, como pueden ser la determinación de patrones de evolución; el establecimiento y descubrimiento de mecanismos de diferenciación genética, la localización de procesos de especialización, entre otros, que a su vez permite a los investigadores establecer los desarrollos de linajes, los grados de biodiversidad, etc.; también se ha utilizado con éxito para clasificar biodiesel (Veras *et al*., 2010) o establecer los niveles de carbono orgánico en el suelo (Noticia *et al*., 2013).

A diferencia de los métodos no supervisados, en los supervisados sí se dispone de información acerca de los grupos o categorías existentes en el conjunto de muestras y son los utilizados normalmente en el análisis cualitativo. El principal objetivo de este tipo de método es el de generar diferentes reglas o modelos de clasificación para un número determinado de clases o grupos de muestras analizadas (Downey, 1996; Naes *et al.*, 2002). Los métodos de mayor aplicación a datos espectrales NIR, entre otros, son el análisis SIMCA y el análisis PLS-DA (Martens y Næs, 1989; Mark, 1992; Downey 1996; Bertrand y Dufour, 2000; Næs *et al.*, 2002; Amigo *et al*., 2013). Así, por ejemplo, se ha utilizado para clasificar diversos materiales farmacéuticos utilizando PLS-DA (Cebeci *et al*., 2013).

De esta manera se pueden comparar espectros de muestras desconocidas con grupos de espectros NIR de muestras con características conocidas (Mark, 1992). Estas características o atributos, variables categóricas y no continuas, pueden ser por ejemplo, el origen geográfico, variedad, tipo de producto, dosis de abonado, etc.

Mediante el uso de un modelo SIMCA en muestras de una temporada, Turza *et al*. (1998) fueron capaces de clasificar las muestras de semillas de soja de diferentes años. Ootake y Kokot (1998) diferenciaron entre el arroz glutinoso y no glutinoso. Posteriormente, Tsenkova y Atanassova (2002) utilizaron modelos SIMCA basado en PCA para el diagnóstico de la mastitis de vaca, obteniendo los mejores resultados de calibración con la transformación de los espectros de primera derivada. El éxito del NIRs en el diagnóstico de mastitis se debió a los cambios sufridos en los espectros debidos a la composición diferente de la leche con mastitis (Ozaki *et al*., 2007). Este mismo sistema mostró su utilidad en la detección de adulterantes en los alimentos, por ejemplo, en el puré de fresas (Holland *et al.*, 1998), chocolate (Che-Man *et al.*, 2005), tortas (Syahariza *et al*., 2005), miel de abejas (Gallardo-Velázquez *et al.*, 2009), y el aceite de oliva (Lai *et al*., 1995; Marcos *et al*., 2002; Tapp *et al.*, 2003), entre otras aplicaciones. Más recientemente en la detección de residuos médicos veterinarios en alimentos (Meza *et al*., 2011). Las principales ventajas de la técnica SIMCA, junto con el NIRs, son que requieren bajo volumen de muestra y no empeoran el medio ambiente, con preparación mínima o sin preparación de la muestra, lo que acelera en gran medida el análisis de muestras (Edelmann *et al.*, 2001).

Respecto al PLS-DA, Ozaki *et al*. (2007) señalan que es muy útil para los análisis espectrales en la región NIR, siendo a menudo necesario tratar previamente los datos antes de someterlos al análisis multivariante. El análisis multivariante ha sido utilizado, por ejemplo, para determinar la adulteración del aceite de oliva con aceite de maíz, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de nuez y aceite de avellana (Ozaki *et al*., 2007), obteniendo buenos resultados. Este método permite la determinación de las propiedades físicas y el contenido de varios componentes químicos. En los últimos años, muchos estudios han tratado de realizar controles de calidad en los medicamentos basados en hierbas utilizando NIRs, como Paeoniae Radix (Xiaofang *et al*, 2008), Puerariae Radix (Ching-Ching *et al*., 2009) o Phellodendri corteza (Chi-On *et al*., 2007).

Por tanto, en función del *estado del arte* hasta aquí indicado, el objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad de la técnica NIRs para obtener clasificaciones válidas para el forraje de triticale de doble aptitud cv `Verato´, en función de la densidad de siembra, fecha de corte y dosis de abonado nitrogenado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011, en una parcela de la finca La Orden perteneciente al CICYTEX del término municipal de Guadajira (Badajoz), propiedad del Gobierno de Extremadura, en condiciones de secano. El material vegetal utilizado fue un triticale de doble aptitud cv `Verato´. No se realizó ningún tipo de tratamiento fitosanitario.

El diseño estadístico fue el de parcelas sub-subdivididas (*split split-plot*) con cuatro repeticiones, siendo la parcela principal la densidad de siembra (400 plantas m^{-2}, 500 plantas m^{-2} y 600 plantas m^{-2}) con 216 muestras para cada densidad, la subparcela, el número de cortes (18/01/2010, 25/02/2010, 10/03/2010, 12/04/2010, 10/05/2010 y 21/06/2010) con 108 muestras aleatorias por cada fecha (tabla 1) y la sub-subparcela, las dosis de nitrógeno aplicadas antes de la siembra, después del corte tres (18/01/2010) y después del corte cinco (10/03/2010), (SIN nitrógeno (0-0-0), 75 kg N ha^{-1} (25-50-0) y 125 kg N ha^{-1} (50-50-25) (n=216 para cada dosis de abonado) (tabla 2). En total se trabajó con 648 muestras. La unidad experimental estaba constituida por dos parcelas de 1.5 m de ancho y 10 m de longitud, utilizando una de ellas para los muestreos destructivos (0.25 m^2).

Tabla 1. Fechas en que se realizaron los cortes

Corte	Fecha	Tipo	n	Zadoks (1974)	Estado Fenológico	PC
Corte 3	18/01/2010	Sin Aprovechamiento	36	30	Encañado	VEGETATIVO
		1 Aprovechamiento		30	Encañado	
		1 Aprovechamiento		30	Encañado	
Corte 4	25/02/2010	Sin Aprovechamiento		35	5º Nudo Detectable	
		1 Aprovechamiento		29	Final Ahijado	
		1 Aprovechamiento		29	Final Ahijado	
Corte 5	10/03/2010	Sin Aprovechamiento		41	Vaina Engrosada	
		1 Aprovechamiento		32	2º Nudo Detectable	
		1 Aprovechamiento		32	2º Nudo Detectable	
Corte 6	12/04/2010	Sin Aprovechamiento		57	¾ Espiga Emergida	REPRODUCTIVO
		1 Aprovechamiento		55	½ Espiga Emergida	
		2 Aprovechamiento		50	1º Espiguilla visible	
Corte 7	10/05/2010	Sin Aprovechamiento		83	Grano Pastoso Temprano	
		1 Aprovechamiento		80	Grano Pastoso	
		2 Aprovechamiento		77	Grano Lechoso Tardío	
Corte 8	21/06/2010	Sin Aprovechamiento		90	Madurez Comercial	
		1 Aprovechamiento		90	Madurez Comercial	
		2 Aprovechamiento		90	Madurez Comercial	

N: número de muestras. **PC**: periodo del cultivo. **V**: vegetativo. **R**: reproductivo

Tabla 2. Fertilizantes y dosis utilizados en el abonado de fondo y en los dos abonados de cobertera después de los dos aprovechamientos (corte 3 y 5) (kg ha^{-1})

	Abonado de Fondo			1ª Cobertera	2ª Cobertera
				1º aprovechamiento (corte 3)	2º aprovechamiento (corte 5)
	N	P_2O_5	K_2O	N	N
Tratamiento	Sulfato amónico del 21%	Superfosfato cálcico del 18%	Cloruro potásico del 60%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%	Nitrato Amónico Cálcico del 27%
125 kg N ha^{-1}	50	42	90	50	25
75 kg N ha^{-1}	25	42	90	50	0
0 kg N ha^{-1}	0	42	90	0	0

Las muestras fueron secadas en estufa a 105 °C (RD 2257/1994) durante 48 horas y posteriormente, fueron molidas y pasadas por un tamiz de 1 mm. Se tomaron sus espectros característicos por duplicado, para realizar la media posteriormente, en la región del Infrarrojo Cercano mediante un equipo NIRs Labspec 2500 (ASD Inc.®), que realiza una lectura continua entre los 1000-2500 nm, obteniendo su media de absorbancia. La obtención de los espectros se llevó a cabo a través del software IndicoPro® y el análisis quimiométrico de los datos mediante el software Unscrambler de CAMO®, con el cual se obtuvo el análisis cualitativo para agrupar las muestras según densidad de siembra, fecha de corte y dosis de abonado nitrogenado.

Debido a la presencia de posibles efectos dispersivos en los espectros, además de utilizar los espectros originales, se procedió a su tratamiento mediante MSC y EMSC. La corrección MSC se centra en la eliminación de los efectos debidos a la dispersión de la

radiación utilizando un espectro de referencia (Isaksson y Naes, 1988); la corrección EMSC, propuesta por Martens y Stark (1991), además de minimizar los efectos aditivos y multiplicativos, permite amortiguar respuestas dispersivas de naturaleza no lineal, se trata en definitiva de uno de los métodos más eficaces, de los disponibles actualmente, para eliminar los efectos dispersivos de la luz. De esta manera se ha trabajado con 3 tipos de espectros: originales, MSC y EMSC, sin eliminación de posibles muestras aberrantes.

El siguiente paso fue establecer un sistema de clasificación básica mediante un análisis de componentes principales para la interpretación visual de la posible ordenación de las muestras forrajeras en el espacio definido por los componentes principales (Mark, 2008). Los resultados comparados de este primer análisis determinaron cuál era el mejor tratamiento espectral con el que seguir trabajando (sin pretratamiento, con MSC o con EMSC) y además, permitió saber la posible generación de grupos en función de la densidad de siembra (3 grupos), de la fecha de corte (6 grupos) y del abonado (3 grupos).

Posteriormente, se abordó el estudio de las muestras espectrales mediante sistemas de clasificación no supervisada, que consistieron en un análisis de conglomerados (*cluster*) combinando distintos métodos de agrupación y midiendo la distancia entre individuos mediante una distancia euclídea al cuadrado (tabla 3). Se decidió usar esta combinación por ser con los que Collado (2012) obtuvo mejores resultados en muestras de pastos.

Tabla 3. Combinación de métodos de agrupación y medidas de distancia utilizadas en el análisis de conglomerados

Método de agrupación	Medida de distancia
K-means	Euclídea al cuadrado
K-medians	
Enlace jerárquico sencillo	
Enlace jerárquico completo	
Enlace jerárquico promedio	
Enlace jerárquico por mediana	
Enlace de Ward	

El análisis *cluster* proporciona un dendrograma de distancias donde es fácil apreciar visualmente la proximidad real de las diferentes muestras y la formación de aglomerados de muestras con perfil semejante. La calidad de la agrupación se evaluó mediante la apreciación de los grupos finales creados, así como por la complejidad del dendrograma generado. De esta manera, dendrogramas que agrupaban las distintas muestras de forma clara antes de la distancia relativa 4 se entenderán como adecuados.

En los casos de agrupación no supervisada se sugirió al software la presencia de varios grupos: 3 grupos en función de la dosis de siembra, 6 grupos según fechas de corte y 3 grupos para la dosis de abonado.

Para la confección de sistemas de clasificación supervisados basados en el análisis SIMCA primeramente se realiza un PCA para cada grupo, como señalaron Ozaki *et al*. (2007) y Brereton (2009), con las muestras del conjunto de calibración, para situar cada grupo en una región del espacio multivariante definido por los componentes principales. Seguidamente se realiza el SIMCA propiamente dicho según lo describen Sharaf *et al*. (1986), de manera que cada nuevo caso se asigna a uno o varios de los grupos preestablecidos según su cercanía a ellos. A veces se realiza un segundo paso consistente en la detección de muestras aberrantes (*outliers)*, en este trabajo no parece relevante realizarlo ya que se trata comprobar la posible utilidad de este tipo de modelos y no tanto la detección de muestras extrañas. Dada la estructura de las muestras disponibles, se utilizaron los mismos grupos que se sugirieron en la agrupación no supervisada. Una vez obtenido el modelo se realizó una validación externa, para ello se seleccionaron diez muestras aleatorias del grupo total de muestras (588 muestras para realizar la calibración y 60 para validación) que permitían contrastar la habilidad predictiva de los modelos.

El último método de clasificación utilizado fue el PLS-DA, descrito por Bjorsvik y Martens (2008), en el que se asignan variables químicas *dummies* de manera que los casos de pertenencia al grupo tengan un valor de 1 y el resto de 0 (los no pertenecientes). De esta manera se realiza un modelo de regresión PLS convencional, de manera que los integrantes del grupo de pertenencia den un valor predictivo cercano a 1 y el resto (no pertenecientes al grupo), un valor cercano a 0. Se utilizaron los mismos grupos que en el método SIMCA y las mismas muestras para la obtención de la calibración y para la validación externa. A modo de resumen, en la tabla 4 se muestra la metodología seguida en orden.

Tabla 4. Resumen de los métodos de clasificación utilizados

	Método de clasificación		**Tipos de espectros**
Agrupación visual de las muestras	PCA		Originales MSC EMSC
	Método de agrupación	**Medida de distancia**	
No supervisados	*K-means* *K-medians* Enlace jerárquico sencillo Enlace jerárquico completo Enlace jerárquico promedio Enlace jerárquico por mediana Enlace de Ward	Euclídea al cuadrado	Originales MSC EMSC
Supervisados	SIMCA		Originales MSC EMSC
	PLS-DA		Originales MSC EMSC

Para medir la bondad del modelo, se tendrá en cuenta su precisión y fiabilidad en la clasificación. Como indican Garrido *et al*. (2000), éstos parámetros son juzgados por diferentes estadísticos, entre los que se encuentran como más generalizado, el error de clasificación que corresponde al porcentaje de muestras incorrectamente clasificadas por el modelo y que será el utilizado en esta investigación.

Todos los cálculos se llevaron a cabo mediante el software Unscrambler 10.3 de CAMO® (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros obtenidos de las diferentes muestras forrajeras se muestran en la figura 1. En ellos se puede observar un fuerte efecto dispersivo de la luz infrarroja. Igualmente observamos efectos multiplicativos en las zonas con mayores "picos" espectrales. Éstos efectos se manifiestan a pesar de haber utilizado un tamiz de un milímetro, para tratar de homogenizar el tamaño de partícula (Undersander *et al*., 1993).

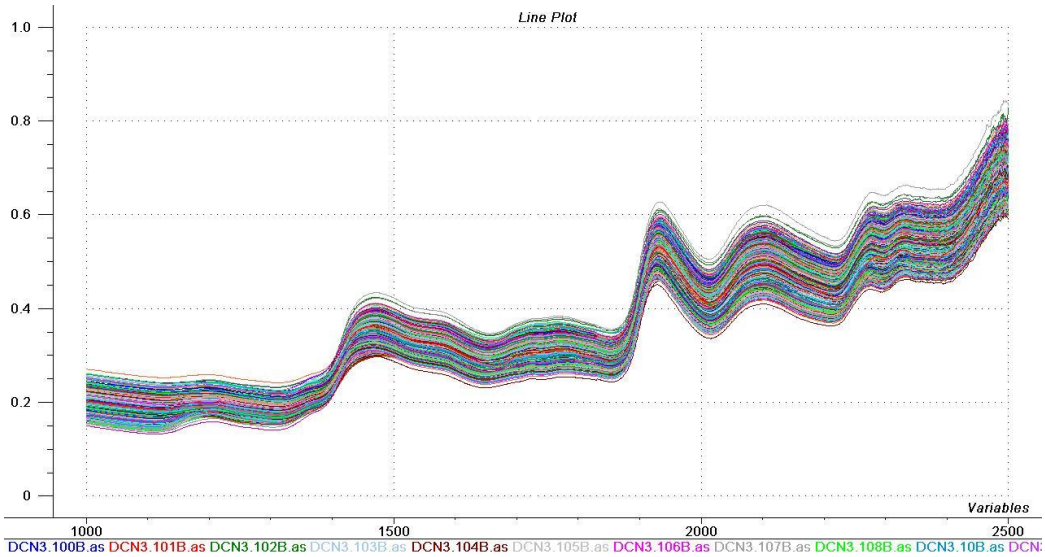


Figura 1. Espectros originales de las distintas muestras forrajeras utilizadas

Ante esta situación, se optó por someter a los espectros a una transformación MSC (figura 2) y EMSC (figura 3) con la finalidad de eliminar o disminuir, en la medida de lo posible, éstos efecto dispersivos.

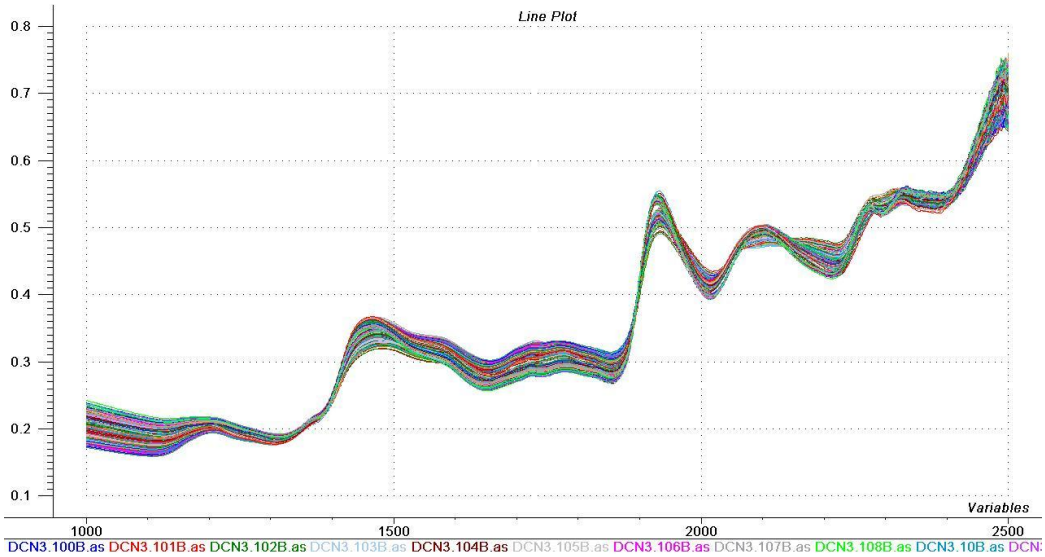


Figura 2. Aspecto de los espectros tras el tratamiento MSC

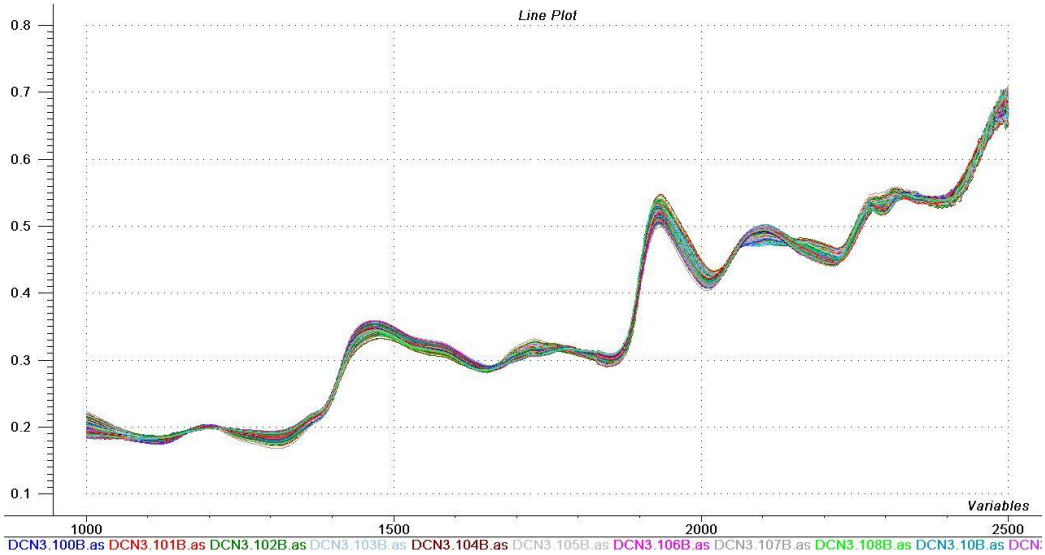


Figura 3. Aspecto de los espectros tras el tratamiento EMSC

Como se puede comprobar, los tratamientos han resultado efectivos, habiendo unificado el comportamiento de los espectros que presentan un aspecto visual más homogéneo, tal y como cabe esperar de la técnica aplicada (Kramer y Ebel, 2000; Ottestad *et al*., 2010).

Componentes principales y muestras originales

El análisis de componentes principales permite reducir el elevado número de variables espectrales originales en un número mucho menor denominadas componentes principales. Cada muestra puede ser representado como un punto con respecto a éstos nuevos ejes o componentes (Downey, 1999), tal y como vemos en la figura 7, en la que aparecen las muestras en el espacio definido por los tres primeros componentes.

La figura 4 recoge el gráfico de puntuación de los espectros originales de las muestras de forraje utilizadas en función de las densidades de siembra. No es un resultado satisfactorio ya que el código de formas/colores utilizado no permite apreciar visualmente ningún agrupamiento claro.

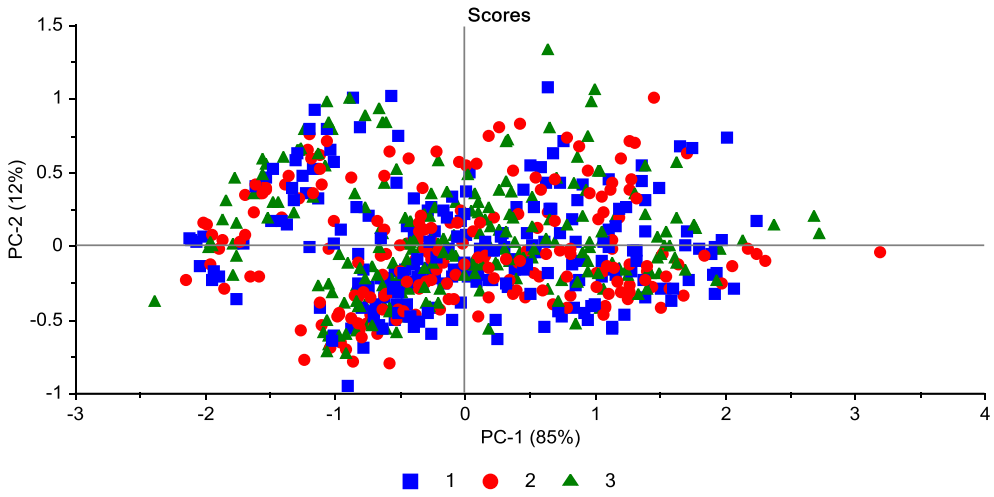


Figura 4. Situación de las muestras en el espacio definido por los 2 primeros componentes principales (espectros originales)
1: densidad 400 plantas m^{-2}. **2**: densidad 500 plantas m^{-2}. **3:** densidad 600 plantas m^{-2}

La única variable en la que se pueden apreciar ciertos agrupamientos es la fecha de corte (figuras 5 y 6), por lo que el resto del trabajo se realizó sólo en función de esta variable, descartando las variables de agrupación densidad de siembra y dosis de abonado nitrogenado, ya que no se ha podido realizar una discriminación de éstos grupos con los espectros recogidos.

Si nos fijamos en la figura 6, en el cuadrante inferior izquierdo de color azul, se aprecian las muestras procedentes del primer corte (corte 3). Las muestras del siguiente corte (rojas), aunque se entremezclan con las del corte anterior, puede apreciarse una ligera evolución desplazándose hacia el eje de ordenadas, aún en el cuadrante inferior. Siguiendo con la evolución de los cortes, las muestras de color verde (corte 5) se sitúan en el cuadrante inferior derecho, el corte 6 (azul claro) se encuentra en el cuadrante superior derecho, adyacentes al eje de abscisas, mientras que las del corte 7 (marrón) se encuentran en el mismo cuadrante pero en una zona superior y con algunas muestras ya situadas en el cuadrante superior izquierdo. Por último, el corte 8 (gris) se sitúa en su totalidad en el cuadrante superior izquierdo, terminando de esta manera la evolución temporal en la posición de las distintas muestras que sintetiza la flecha naranja (figura 6). En la figura 7 se observa lo descrito anteriormente, localizando las muestras respecto a los tres primeros componentes principales, lo que permite establecer su diferente ubicación espacial.

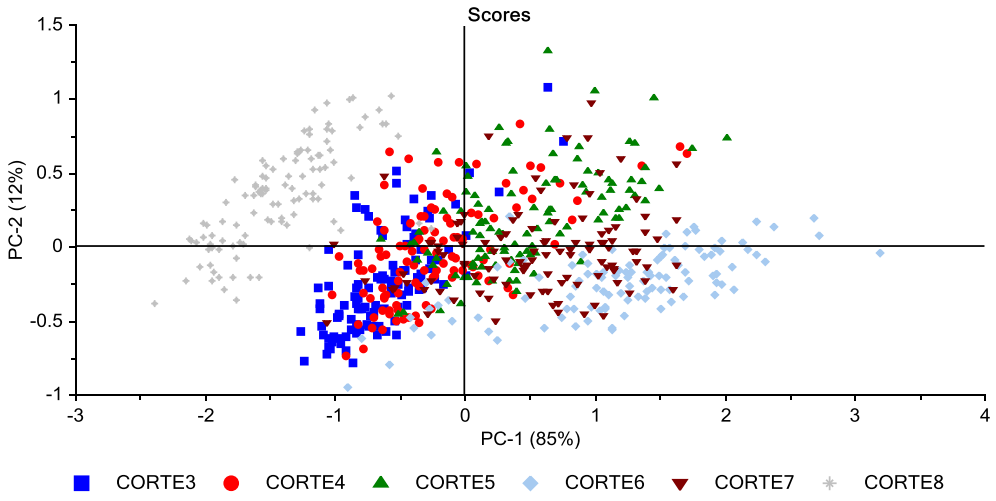


Figura 5. Situación de las muestras en el espacio definido por los 2 primeros componentes principales (espectros originales) para la fecha de corte

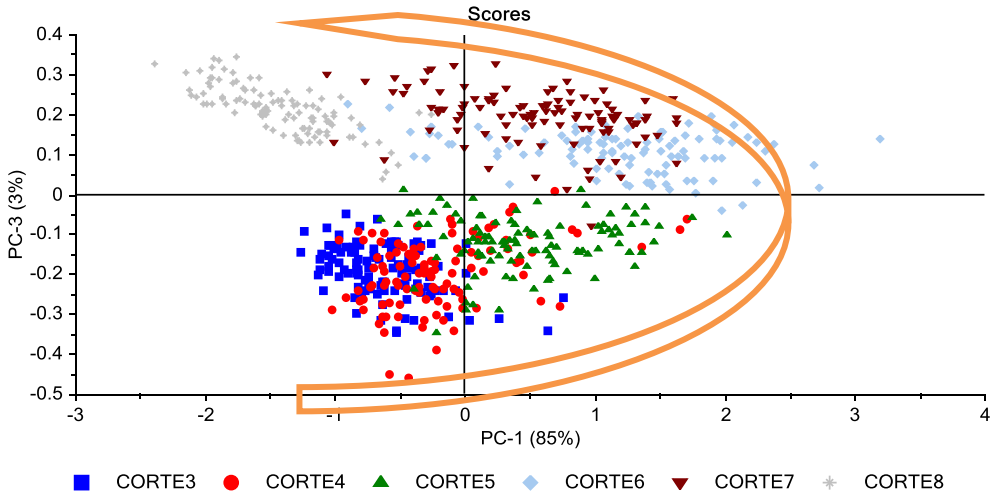


Figura 6. Situación de las muestras en el espacio definido por los componentes principales 1 y 3 (espectros originales) para la fecha de corte

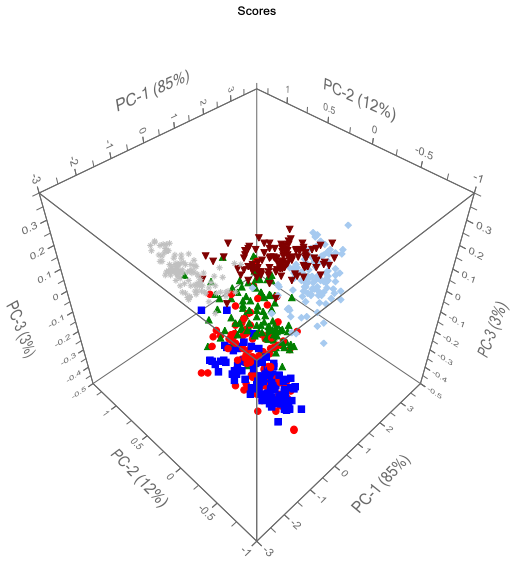


Figura 7. Situación de las muestras en el espacio definido por todos los componentes principales (1, 2 y 3) (espectros originales) para la fecha de corte

Componentes principales y muestras pretratadas con MSC y EMSC

En la figura 8 y 9 se muestra el gráfico de puntuación para los espectros corregidos mediante MSC y EMSC, respectivamente.

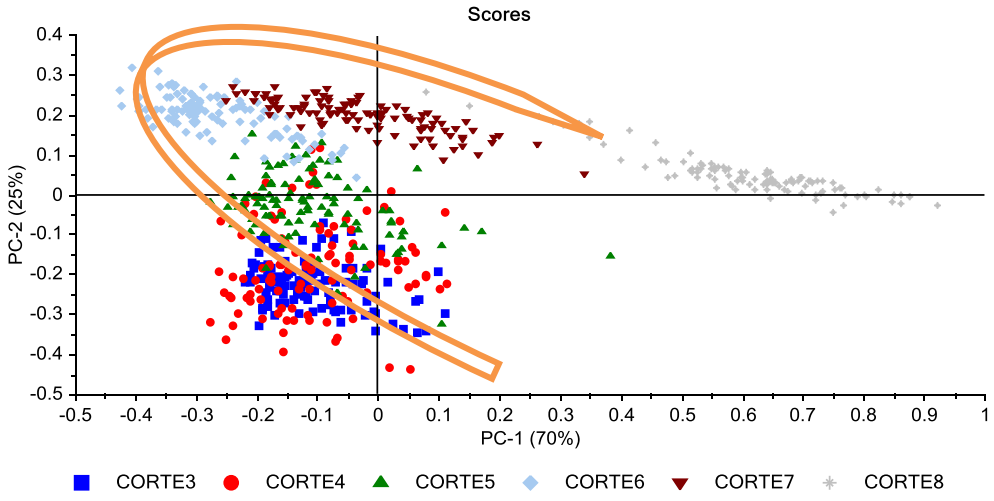


Figura 8. Situación de las muestras en el espacio definido por los componentes principales 1 y 2 (espectros corregido MSC) para la fecha de corte

En las muestras pretratadas mediante MSC (figura 8), con la representación de los dos primeros componentes principales que explican más del 95 % de la variación, se distinguen los cortes 3 y 5, mientras que el corte 4 se entremezcla con ellos dos. Los tres últimos cortes se distinguen bien entre ellos y además, se puede apreciar la separación entre los tres primeros

cortes y los tres últimos. En todo caso, la flecha naranja muestra claramente la progresión temporal de los cortes.

En cuanto al resultado del pretratamiento EMSC (figura 9), puede observarse que el componente 3 separa los distintos cortes. Los más tempranos están en la parte inferior y los tardíos en la superior.

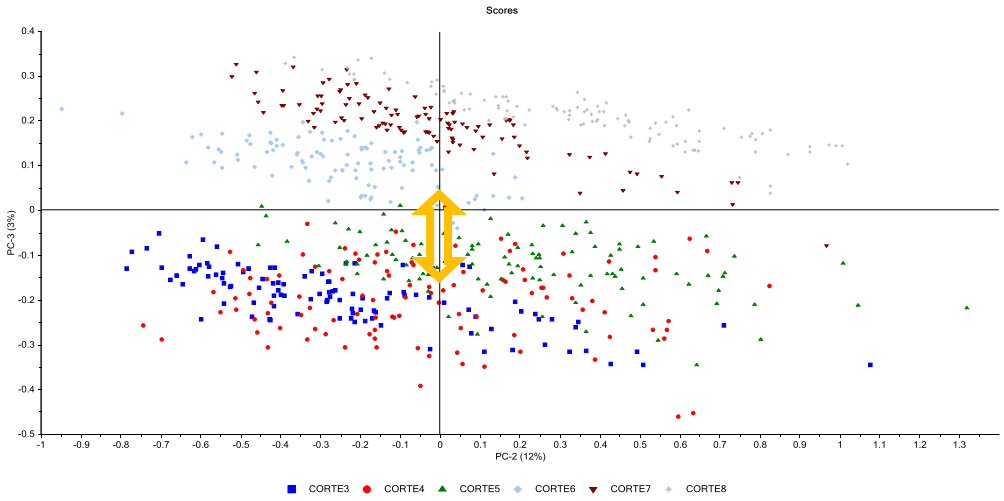


Figura 9. Situación de las muestras en el espacio definido por los componentes principales 2 y 3 (espectros corregidos EMSC) para la fecha de corte

El conjunto de éstos resultados indica que, a efectos de distinguir los diferentes cortes, resultan más importantes componentes de segundo o tercer orden. Esto estadísticamente es razonable, ya que los primeros componentes acumulan la mayor parte de la información común mientras que los siguientes componentes explican en mayor medida variaciones particulares, en nuestro caso asociable al momento de corte.

En la práctica, la proyección de espectros de nuevas muestras sobre el espacio definido por los componentes principales permitiría ubicar dichas muestras en el entorno de alguno de los grupos formados y estimar su época de corte o su periodo vegetativo en ese momento.

Agronómicamente, esto podría ser debido a las características de las muestras, principalmente a su composición química, que varía en función de la edad de la planta, de hecho podría relacionarse con los estadios fenológicos del triticale según la escala de Zadoks *et al*. (1974). Aproximadamente, en la fecha que se tomaron las muestras del corte 3, el triticale se encontraba en el inicio de encañado, mientras que en el corte 4 había 36 muestras en el 5º nudo detectable y 72 muestras al final del ahijado. En el corte 5, 36 muestras estaban en el estado de vaina engrosada y 72 en el 2º nudo detectable, por lo que éstos cortes se realizaron en el periodo vegetativo de la planta, con un mayor contenido en proteínas y menor en compuéstos fibrosos. En el corte 6 hay muestras entre el estado fenológico 1º espiguilla visible y ¾ espiga emergida, correspondientes al periodo de reproducción, disminuyendo el contenido en proteína mientras

que aumentaba el fibroso, variando la información contenida en los espectros. Por último, el corte 7 se realizó con muestras que se encontraban en el estado de grano pastoso temprano, grano pastoso y grano lechoso tardío y en el corte 8, todas las muestras se encuentran en el estado de madurez comercial (tabla 1) (éstos datos pueden consultarse en el Capítulo I).

La discusión de éstos resultados es dificultosa por la escasez de trabajos publicados al respecto. Rodríguez (2009) ya señala la posibilidad de que para trabajos de clasificación, los espectros originales pueden contener más información que los corregidos mediante MSC/EMSC, a pesar de que éstos últimos resulten más adecuados para hacer modelos de predicción de la composición química. Tampoco Indhal *et al*. (1999) utilizan corrección espectral alguna en sus trabajos de clasificación de mayonesas. Esta misma situación se comprueba en otras publicaciones: Cocchi *et al*. (2005), Galtier *et al*. (2007) y Said *et al*. (2011). Sin embargo, como se ha podido ver en las figuras anteriores, en el caso de este estudio con forraje de triticale, los pretratamientos no han tenido una repercusión negativa en la clasificación, por lo que el resto de métodos de agrupación que se estudian a continuación se realizarán sobre los tres tipos de muestras, sin pretratar, con pretratamiento MSC y con EMSC.

Análisis de grupos

Método *k-means*

Las tablas que a continuación se muestran representan los resultados proporcionadas por el software. La numeración utilizada (grupo 0, 1,…) no tiene porqué coincidir con el corte, siendo una propuesta arbitraria realizada por el programa informático, de manera que lo relevante es cómo se clasifican los cortes en los grupos y no la denominación de un grupo.

Mediante la agrupación con el procedimiento *K-means*, para las muestras sin pretratar se obtienen los resultados de la tabla 4.

Tabla 4. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *K-means*, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *K-MEANS*						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	77 (71.29%)	0 (0%)	0 (0%)	29 (26.85%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 4	40 (37.03%)	0 (0%)	2 (1.85%)	51 (47.22)	4 (3.70%)	11 (10.18%)	**108**
Corte 5	3 (2.77%)	0 (0%)	4 (3.70%)	42 (38.88%)	17 (15.74%)	42 (38.88%)	**108**
Corte 6	7 (6.48%)	0 (0%)	57 (52.77%)	8 (7.40%)	36 (33.33%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	8 (7.40%)	0 (0%)	14 (12.96%)	23 (21.29%)	52 (48.14%)	11 (10.18%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	102 (94.44%)	0 (0%)	6 (5.55%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**135**	**102**	**77**	**159**	**109**	**66**	**648**

De los 6 cortes sólo las muestras procedentes del corte 8 han sido clasificadas en su mayoría en un grupo creado por *k-means*, el grupo 1. El resto de grupos (0, 2, 3, 4, 5) se reparten las muestras según cortes, sin realizar un buen agrupamiento. Por ejemplo, las muestras del corte 7 se dividen entre los grupos 2, 3, 4 y 5, principalmente.

Los resultados obtenidos con la agrupación mediante el procedimiento *K-means*, para las muestras con tratamiento MSC, se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento MSC, procedimiento *K-means*, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *K-MEANS*						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	10 (9.25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	98 (90.74%)	**108**
Corte 4	27 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.85%)	1 (0.92%)	78 (72.22%)	**108**
Corte 5	87 (80.55%)	2 (1.85%)	1 (0.92%)	3 (2.77%)	3 (2.77%)	12 (11.11%)	**108**
Corte 6	1 (0.92%)	83 (76.85%)	0 (0%)	24 (22.22%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	7 (6.48%)	0 (0%)	70 (64.81%)	31 (28.70%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	97 (89.81%)	0 (0%)	11 (10.18%)	0 (0%)	**108**
Total	**125**	**92**	**98**	**99**	**46**	**188**	**648**

Con las muestras pretratadas MSC, los resultados mejoran respecto a las muestras originales, siendo más coherente con los resultados obtenidos en los componentes principales y con la estructura real de los datos, aunque siguen sin ser óptimos. El grupo 0 agrupa el 80.55 % de las muestras procedentes del corte 5, el resto de muestras de este corte, como sucede con el resto de cortes, se reparte de forma desigual en los otros grupos creados por el método *K-means*.

El 76.85 % de las muestras del corte 6 están situadas en el grupo 1. En el caso del grupo 2 mejoran los resultados, ya que prácticamente sólo separa el corte 8 con un 89.81 % de las muestras de este corte. El grupo 3 y 4 empeoran los resultados debido a que se reparten entre los dos las muestras del corte 7, un 64.81 % y 28.70 %, respectivamente. El 90.74 % de las muestras del corte 3 y el 72.22 % del corte 4, procedentes ambos del periodo de vegetación del cultivo, se agrupan en el grupo 5, resultando un grupo razonable, aunque sólo incluye el 11.11 % de las muestras del corte 5, también perteneciente al periodo vegetativo.

Utilizando las muestras con pretratamiento EMSC, los resultados obtenidos con la agrupación mediante el procedimiento *K-means*, se representan en la tabla 6

Tabla 6. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento EMSC, procedimiento *K-means*, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *K-MEANS*						
	0	1	*2*	3	**4**	5	**Total**
Corte 3	24 (22.22%)	2 (1.85%)	*0 (0%)*	0 (0%)	**0 (0%)**	82 (75.92%)	**108**
Corte 4	59 (54.62%)	20 (18.51%)	*2 (1.85%)*	0 (0%)	**0 (0%)**	27 (25%)	**108**
Corte 5	17 (15.74%)	87 (80.55%)	*2 (1.85%)*	0 (0%)	**0 (0%)**	2 (1.85%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	*87 (80.55%)*	21 (19.44%)	**0 (0%)**	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	*0 (0%)*	108 (100%)	**0 (0%)**	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	8 (7.40%)	*0 (0%)*	0 (0%)	**100 (92.59%)**	0 (0%)	**108**
Total	**100**	**117**	**91**	**129**	**100**	**111**	**648**

Con el pretratamiento EMSC los resultados mejoran aun más. En concordancia con lo visto en el análisis de los componentes principales, se pueden distinguir 4 grupos perfectamente diferenciados. El primero (sombreado) corresponde a los grupos 0, 1 y 5, que agrupan las muestras procedentes de los cortes (3, 4 y 5), los correspondientes al periodo vegetativo de la planta y a estados fenológicos varios, con muestras desde final del ahijado hasta vaina engrosada. El segundo (cursiva) formado por el grupo 2 que compila casi todas las muestras (80.55 %) del corte 6 (periodo de reproducción, floración). El tercero (subrayado) con el grupo 3 tiene el 100 % de las muestras del corte 7 (periodo de maduración, inicio de grano pastoso), aunque con el 19.44 % de las muestras del grupo 6. Y por último, el cuarto (negrita) que contiene el 92.59 % de las muestras del corte 8 (estado de madurez comercial) y ninguna muestra de otros cortes. Por tanto, este método serviría para distinguir entre distintos estados fenológicos según la escala de Zadoks *et al*. (1974). Respecto a la agrupación según cortes, sólo se podría diferenciar el corte 7 y 8, al tener sus muestras en uno sólo de los grupos creado por el *k-means*.

Método *K-medians*

En la tabla 7 se recogen los resultados obtenidos con este método utilizando las muestras sin pretratar.

Tabla 7. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *K-medians*, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPO *K-MEDIANS*						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	68 (62.96%)	38 (35.18)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	34 (31.48%)	54 (50%)	1 (0.92%)	8 (7.40%)	11 (10.18%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	2 (1.85%)	36 (33.33%)	4 (3.70%)	25 (23.14%)	41 (37.96%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	6 (5.55%)	6 (5.55%)	74 (68.51%)	22 (20.37%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	1 (0.92%)	5 (4.62%)	19 (17.59%)	30 (27.77%)	42 (38.88%)	11 (10.18%)	**108**
Corte 8	102 (94.44%)	0 (0%)	6 (5.55%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**103**	**115**	**159**	**109**	**97**	**65**	**648**

Como se observa en la tabla, los resultados no son satisfactorios, ya que a excepción del grupo 0 con el 94.44% de las muestras del Corte 8, prácticamente sólo agrupa muestras de este grupo, el resto de grupos divide las muestras de forma aleatoria.

En la tabla 8 se recogen los resultados obtenidos con este método y las muestras pretratadas con MSC.

Tabla 8. Resultado de agrupamiento con muestras pretratadas mediante MSC, procedimiento *K-medians*, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPO *K-MEDIANS*						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	3 (2.77%)	83 (76.85%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	22 (20.37%)	**108**
Corte 4	22 (20.37%)	54 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	32 (29.62%)	**108**
Corte 5	78 (72.22%)	5 (4.62%)	1 (0.92%)	1 (0.92%)	1 (0.92%)	22 (20.37%)	**108**
Corte 6	7 (6.48%)	0 (0%)	93 (86.11%)	8 (7.40%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	23 (21.29%)	84 (77.77%)	1 (0.92%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (6.48%)	101 (93.51%)	0 (0%)	**108**
Total	**110**	**142**	**117**	**100**	**103**	**76**	**648**

Los resultados obtenidos con las muestras pretratadas con MSC mejoran notablemente respecto a los resultados con muestras originales. El grupo 0 agrupa el 72.22% de las muestras

del Corte 5 (el 20.37% se encuentran en el grupo 5) y el 20.37% de las muestras del Corte 4, cuyo resto de muestras se encuentran entre el grupo 1 (50% de muestras) y el grupo 5 (29.62% de sus muestras). El Corte 3 tiene la mayoría de sus muestras congregadas en el grupo 1 y el resto (20.37%) en el grupo 5. Por tanto, las muestras pertenecientes al periodo vegetativo se encuentran repartidas entre los grupos 0, 1 y 5, separándose del resto de muestras.

El grupo 2 recoge la mayoría (86.11%) de las muestras del Corte 6 y el 21.29% de las muestras del Corte 7, casi la totalidad del resto de muestras de este corte (77.77%) se encuentran asociadas al grupo 3.

Por último, el grupo 4 compila prácticamente sólo muestras del Corte 8 (93.51% de las muestras de este Corte).

Por tanto, este método es capaz de agrupar las muestras como mostraba el análisis de componentes principales (figura 8), entremezclando los tres primeros cortes (correspondientes al periodo vegetativo de la planta) y separando éstos de los tres siguientes cortes. Respecto a éstos tres últimos cortes, realiza una buena separación entre ellos, destacando el Corte 8 sobre el 6 y 7.

Los resultados obtenidos con este método utilizando muestras con pretratamiento EMSC están recogidos en la siguiente tabla (tabla 9).

Tabla 9. Resultado de agrupamiento con muestras pretratadas mediante EMSC, procedimiento *K-medians*, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPO *K-MEDIANS*						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	86 (79.62%)	1 (0.92%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	21 (19.44%)	**108**
Corte 4	25 (23.14%)	20 (18.51%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	61 (56.48%)	**108**
Corte 5	2 (1.85%)	87 (80.55%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (15.74%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	85 (78.70%)	23 (21.29%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	8 (7.40%)	0 (0%)	0 (0%)	100 (92.59%)	0 (0%)	**108**
Total	**113**	**116**	**89**	**131**	**100**	**99**	**648**

Éstos resultados podrían considerarse muy semejantes que los obtenidos con las muestras pretratadas con MSC, variando ligeramente algunos porcentajes de agrupamiento según el grupo. Principalmente, las muestras de los Corte 6 y 7 invierten su resultado respecto al *k-medians* con muestras MSC. Por lo tanto, las conclusiones son extrapolables.

Abordar una discusión de los resultados con otros autores se hace complicada, al ser muy escasos los trabajos que aborden este tipo de clasificación no supervisada utilizando datos reales.

Análisis de conglomerados (*cluster*) con enlace simple

La figura 10 representa el dendrograma obtenido mediante el enlace simple y distancia euclídea al cuadrado.

El resultado no es satisfactorio ya que en la distancia relativa 4 hay un número superior de grupos formados que los seis cortes y, por lo tanto, no se agrupan adecuadamente las muestras según fecha de corte. Además, la propuesta de colores sugerida por el programa demuestra la insuficiencia del método.

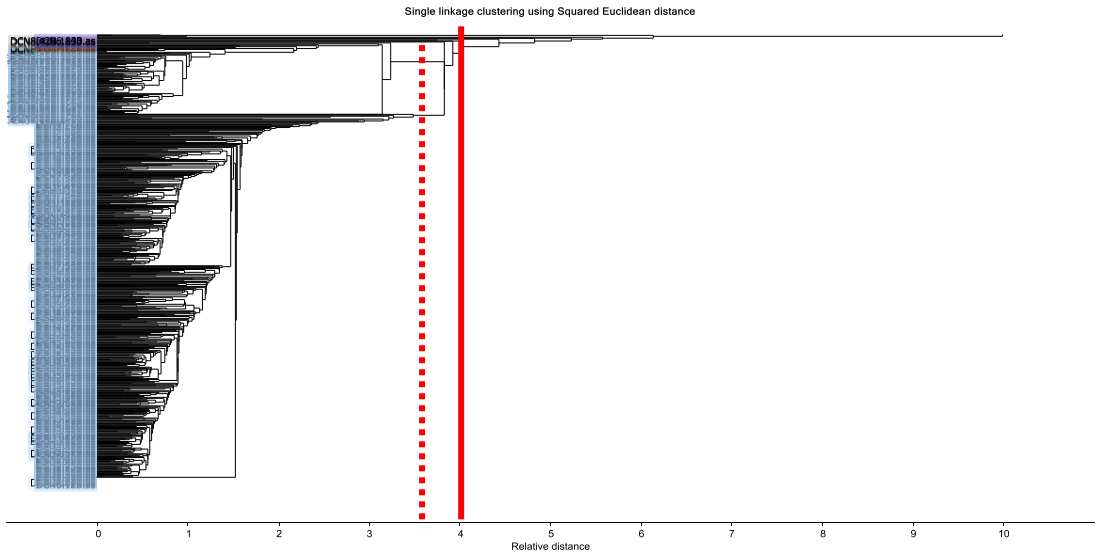


Figura 10. Dendrograma de distancias de enlace simple con distancia euclídea al cuadrado, con muestras sin pretratar

Esta conclusión queda afianzada si se observa la tabla 10, en la que el grupo 3 creado por el método *cluster* con enlace simple, utilizando muestras originales, agrupa el 98.91% de las muestras utilizadas.

Tabla 10. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *Cluster* con enlace simple, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE SIMPLE, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 6	1 (0.92%)	0 (0%)	1 (0.92%)	104 (96.29%)	2 (1.85%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	105 (97.22%)	0 (0%)	3 (2.77%)	**108**
Total	**1**	**0**	**1**	**641**	**2**	**3**	**648**

La figura 11 representa el dendrograma obtenido mediante el enlace simple con muestras pretratadas con MSC. Ésto ocurre como en el caso anterior (figura 10).

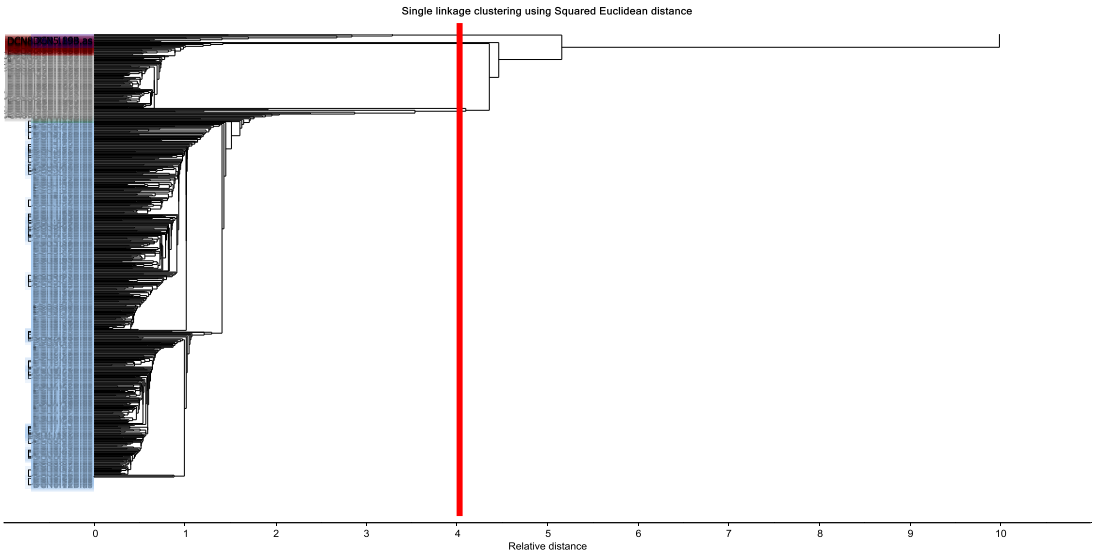


Figura 11. Dendrograma de distancias de enlace simple con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento MSC

En la tabla 11 se muestra cómo se agrupan las muestras en los cinco grupos sugeridos al programa quimiométrico. El resultado, con respecto a las muestras originales, mejora ligeramente, aunque sigue sin ser útil para distinguir en qué fecha se ha realizado el corte, al menos el último corte que se realizó (Corte 8) tiene un 87.96% de las muestras agrupadas en el grupo 5.

Tabla 11. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento MSC, procedimiento *Cluster* con enlace simple, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE SIMPLE, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	107 (99.07%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (11.11%)	95 (87.96%)	**108**
Total	**0**	**2**	**2**	**536**	**12**	**95**	**648**

Estudiando el dendrograma obtenido con distancias de enlace simple, muestras con pretratamiento EMSC (figura 12), se observa que este pretratamiento en las muestras no mejora los resultados.

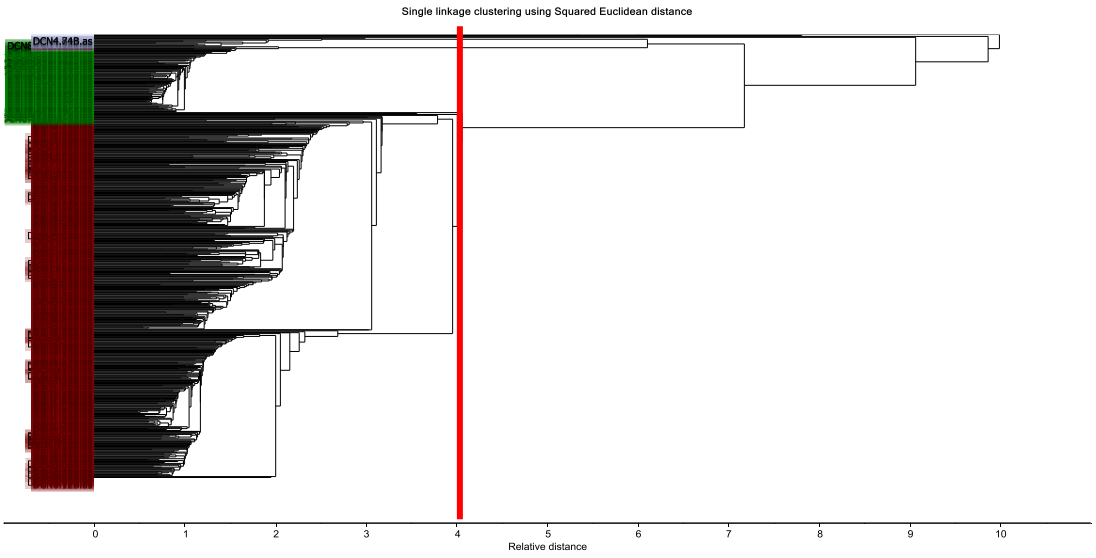


Figura 12. Dendrograma de distancias de enlace simple con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento EMSC

Ocurre lo mismo que en el caso anterior (tabla 12), diferenciándose sólo el Corte 8 (con sus muestras agrupadas en el grupo 2) y el resto de cortes en el grupo 4 (tabla 12).

Tabla 12. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento EMSC, procedimiento *Cluster* con enlace simple, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE SIMPLE, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	1 (0.92%)	1 (0.92%)	0 (0%)	3 (2.77%)	101 (93.51%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 5	1 (0.92%)	1 (0.92%)	0 (0%)	3 (2.77%)	101 (93.51%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**2**	**2**	**108**	**6**	**526**	**4**	**648**

Análisis de conglomerados (*cluster*) con enlace completo

El enlace completo con distancia euclídea al cuadrado con las muestras originales (figura 13), aunque sigue sin proporcionar resultados satisfactorios (tabla 13), comienzan a distribuirse las muestras de los distintos cortes de manera adecuada en los grupos que se le sugirieron al programa y, a la distancia relativa de referencia, muestra una situación menos compleja que en los enlaces anteriores, con tres grupos, teniendo que adelantar (línea roja discontinua figura 13) la distancia relativa aproximadamente a 1,8 para poder encontrar 6 grupos formados. La propuesta de inclusión en grupos (tabla 13) no es aceptable, el grupo 5 sólo clasifica un 2,77 % de las muestras de los cortes, mientras que por ejemplo, en el grupo 1 congrega un número variado de muestras procedente de todos los cortes.

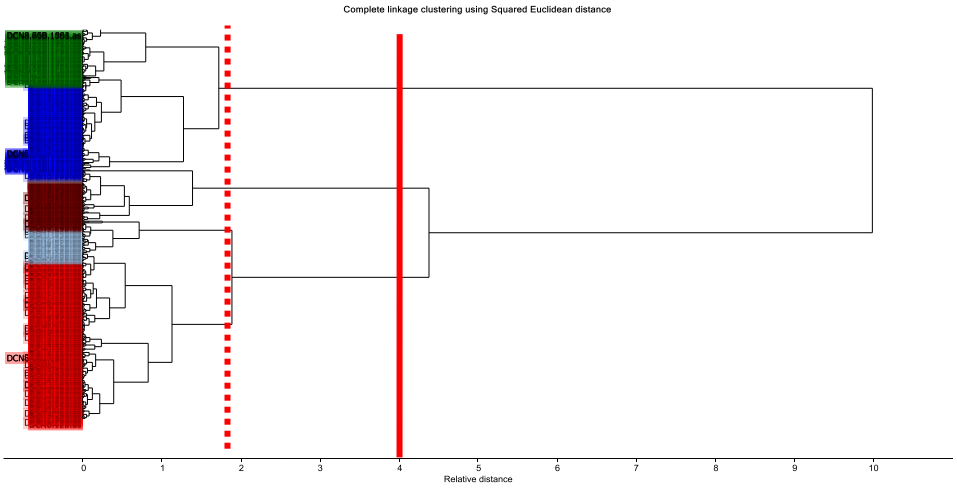


Figura 13. Dendrograma de distancias de enlace completo con distancia euclídea al cuadrado, con muestras sin pretratar

Tabla 13. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *Cluster* con enlace completo, distancia euclídea al cuadrado

GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE COMPLETO, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO							
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	76 (70.37%)	30 (27.77%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	39 (36.11%)	62 (57.40%)	0 (0%)	4 (3.70%)	3 (2.77%)	0 (0%)	**108**
Corte 5	39 (36.11%)	61 (56.48%)	0 (0%)	5 (4.62%)	3 (2.77%)	0 (0%)	**108**
Corte 6	9 (2.77%)	45 (41.66%)	0 (0%)	1 (0.92%)	56 (51.85%)	3 (2.77%)	**108**
Corte 7	7 (6.48%)	65 (60.18%)	1 (0.92%)	23 (21.29%)	12 (11.11%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	27 (25%)	2 (1.85%)	79 (73.14%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**191**	**265**	**80**	**35**	**74**	**3**	**648**

Utilizando las muestras con pretratamiento MSC los resultados vuelven a mejorar. En el dendrograma (figura 14) se aprecia algo similar que en el dendrograma de la figura 13, sin embargo la propuesta de grupos (colores), aunque sigue sin ser adecuada para cualificar las muestras (tabla 14), mejora, ya que pueden distinguirse los seis grupos propuéstos. Con los tres primeros cortes agrupados en el grupo 0 y 2, más del 85 % del corte 6 en el grupo 5, el corte 7 repartido entre los grupos 2, 3 y 5, entremezclándose por lo tanto con los cuatro primeros cortes, y el corte 8 con, prácticamente, la mitad de sus muestras en el grupo 1 y la otra mitad en el grupo 4.

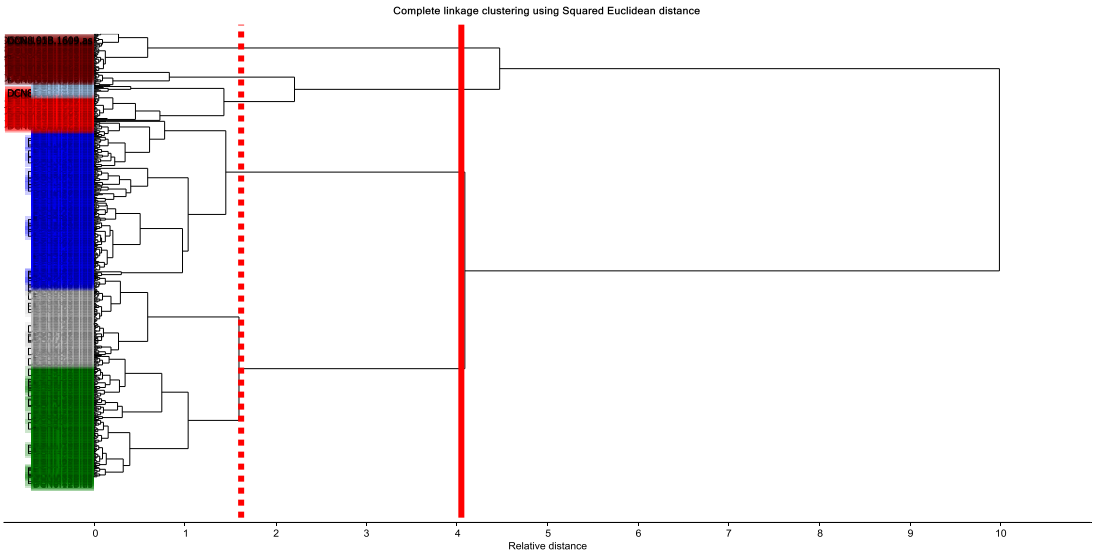


Figura 14. Dendrograma de distancias de enlace completo con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento MSC

Tabla 14. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento MSC, procedimiento *Cluster* con enlace completo, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE COMPLETO, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	107 (99.07%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	91 (84.25%)	0 (0%)	17 (15.74%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 5	91 (84.25%)	0 (0%)	17 (15.74%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 6	1 (0.92%)	0 (0%)	15 (13.88%)	0 (0%)	0 (0%)	92 (85.18%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	1 (0.92%)	69 (63.88%)	18 (16.66%)	0 (0%)	20 (18.51%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	49 (45.37%)	0 (0%)	2 (1.85%)	56 (51.85%)	1 (0.92%)	**108**
Total	**290**	**50**	**118**	**20**	**56**	**113**	**648**

El dendrograma generado con las muestras pretratadas con EMSC (figura 15) mejoran nuevamente los resultados, aunque siguen sin ser suficientemente buenos para distinguir entre cortes. La distancia de corte 4 no es suficiente, creándose los 6 grupos a una distancia de corte próxima a 3.5. Aunque no quedan correctamente agrupados los cortes (tabla 15), sí se observa una separación entre los tres primeros (grupo 0), pertenecientes al periodo vegetativo, los cortes 6 (floración) y 7 (grano pastoso) (grupo 1 y 2) y el corte 8 (madurez comercial) (grupo 4).

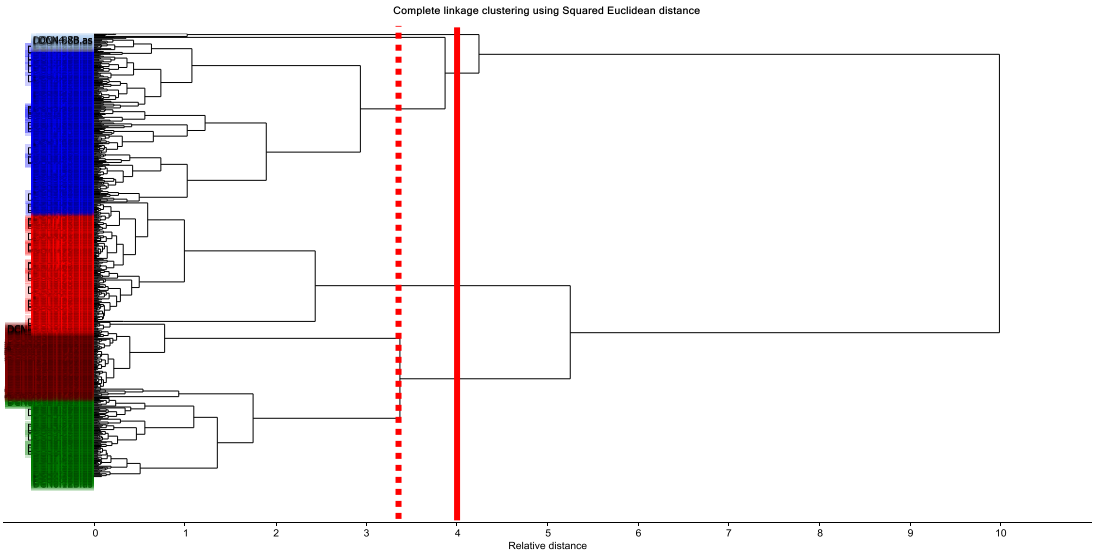


Figura 15. Dendrograma de distancias de enlace completo con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento EMSC

Tabla 15. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento EMSC, procedimiento *Cluster* con enlace completo, distancia euclídea al cuadrado.

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE COMPLETO, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	88 (81.48%)	2 (1.85%)	9 (8.33%)	6 (5.55%)	0 (0%)	3 (2.77%)	**108**
Corte 5	87 (81.50%)	2 (1.85%)	10 (9.25%)	6 (5.55%)	0 (0%)	3 (2.77%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	101 (93.51%)	7 (6.48%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	71 (65.74%)	37 (34.25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	12 (11.11%)	0 (0%)	96 (88.88%)	0 (0%)	**108**
Total	**283**	**176**	**75**	**12**	**96**	**6**	**648**

Análisis de conglomerados (*cluster*) con enlace promedio

En la figura 16 y tabla 16 se representa el dendrograma y los resultados de las muestras originales, en la figura 17 y tabla 17, los resultados con muestras pretratadas mediante MSC y en la figura 18 y tabla 18, los resultados utilizando las muestras EMSC. Todos ellos con enlace promedio y distancia euclídea al cuadrado.

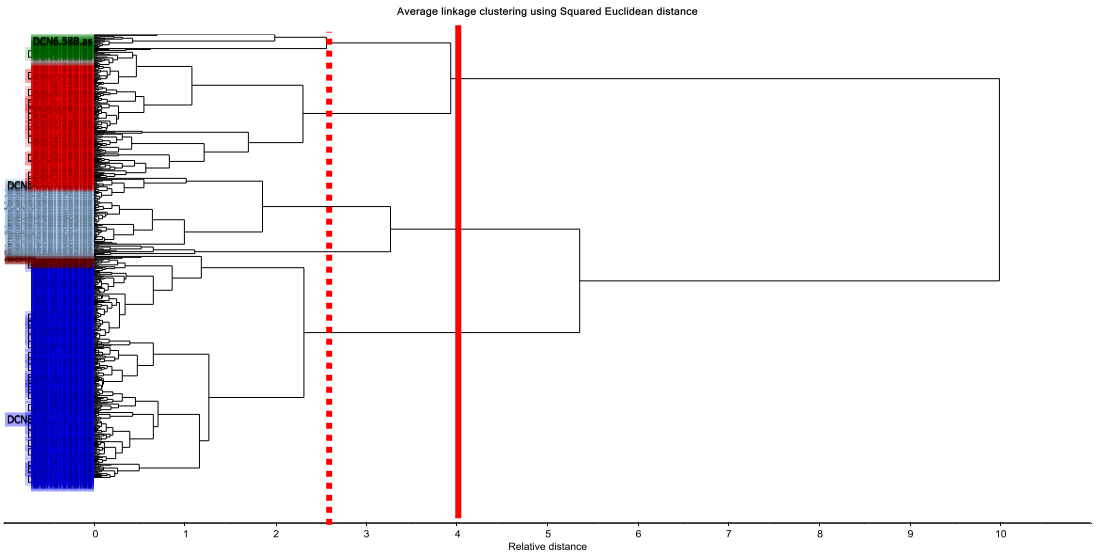


Figura 16. Dendrograma de distancias de enlace promedio con distancia euclídea al cuadrado, con muestras sin pretratar

Tabla 16. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *Cluster* con enlace promedio, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE PROMEDIO, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	103 (95.37%)	3 (2.77%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (44.44)	0 (0%)	**108**
Corte 4	91 (36.11%)	12 (11.11%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (2.77%)	2 (44.44)	**108**
Corte 5	90 (36.11%)	13 (12.03%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (2.77%)	2 (44.44)	**108**
Corte 6	20 (2.77%)	67 (62.03%)	21 (19.44%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	48 (6.48%)	57 (52.77%)	0 (0%)	1 (0.92%)	1 (0.92%)	1 (0.92%)	**108**
Corte 8	2 (44.44)	0 (0%)	0 (0%)	96 (88.88%)	10 (9.25%)	0 (0%)	**108**
Total	**354**	**152**	**21**	**97**	**19**	**5**	**648**

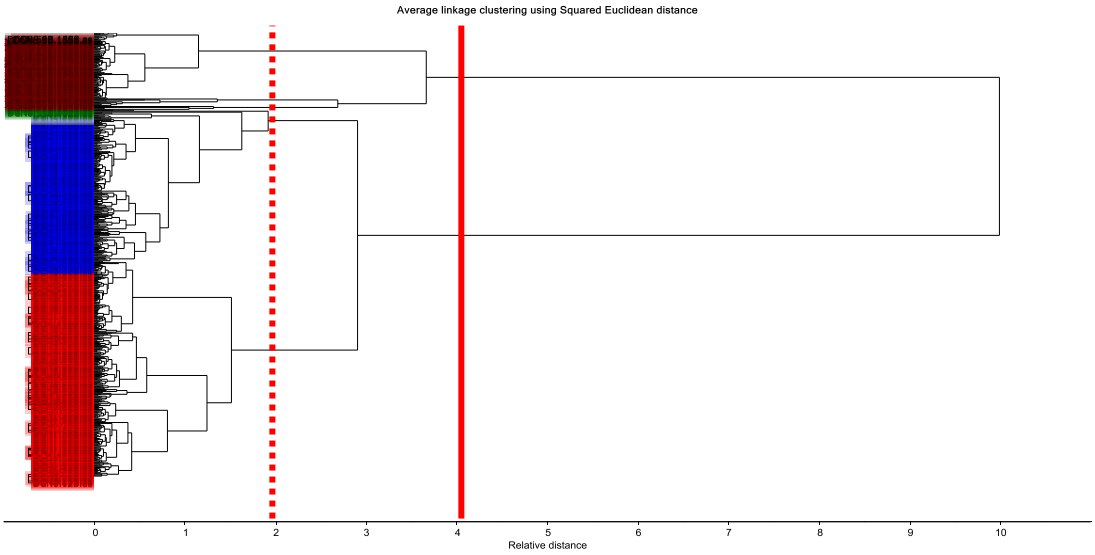


Figura 17. Dendrograma de distancias de enlace promedio con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento MSC

Tabla 17. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento MSC, procedimiento *Cluster* con enlace promedio, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE PROMEDIO, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	105 (99.07%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	87 (84.25%)	18 (16.66%)	0 (0%)	1 (0.92%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 5	87 (84.25%)	18 (16.66%)	0 (0%)	1 (0.92%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 6	1 (0.92%)	107 (99.07%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	1 (0.92%)	12 (11.11%)	0 (0%)	95 (51.85%)	0 (0%)	**108**
Total	**280**	**252**	**12**	**4**	**95**	**3**	**648**

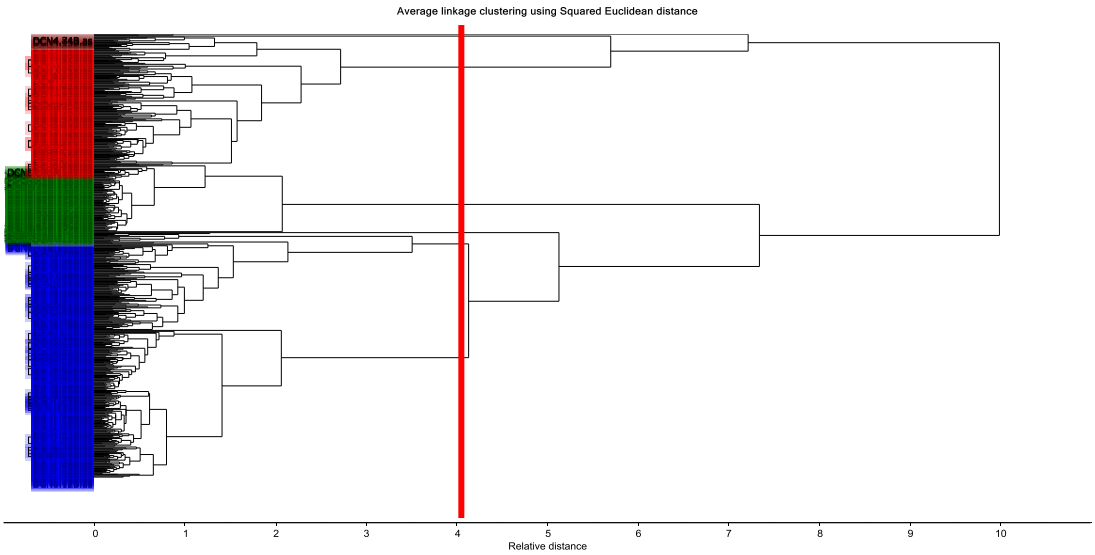


Figura 18. Dendrograma de distancias de enlace promedio con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento EMSC

Tabla 18. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento EMSC, procedimiento *Cluster* con enlace promedio, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE PROMEDIO, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	2 (1.85%)	106 (98.14%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	27 (25.00%)	74 (68.51%)	0 (0%)	2 (1.85%)	3 (2.77%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 5	28 (25.92%)	73 (67.59%)	0 (0%)	2 (1.85%)	3 (2.77%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 6	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	107 (99.07%)	0 (0%)	1 (0.92%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	12 (11.11%)	0 (0%)	96 (88.88%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**284**	**253**	**97**	**4**	**6**	**4**	**648**

En ninguno de los tres casos los resultados son satisfactorios, ya que no proporcionan un patrón de agrupamiento adecuado. Los grupos propuéstos (colores) tampoco son acertados con las fechas de corte, ni siquiera se agrupan las muestras según la escala de Zadoks *et al*. (1974), como sí ocurría con el enlace completo y las muestras EMSC.

Análisis de conglomerados (*cluster*) con enlace mediana

Los resultados del enlace mediana y distancia euclídea al cuadrado utilizando las muestras sin pretratar (figura y tabla 19), con muestras pretratadas con MSC (figura y tabla 20) y con las muestras pretratadas según EMSC (figura y tabla 21) muestran una pauta de agrupación compleja, aún así no proporcionan una agrupación válida en la distancia 4. La propuesta de grupos (colores) tampoco es satisfactoria al no agrupar los forrajes según la fecha de corte.

Tan sólo el análisis realizado con las muestras pretratadas con MSC agrupa la mayoría de las muestras pertenecientes al periodo vegetativo (cortes 3, 4 y 5) en el grupo 1, las muestras de los corte 6 y 7 en el grupo 3 y el corte 8 (madurez comercial) en el grupo 4.

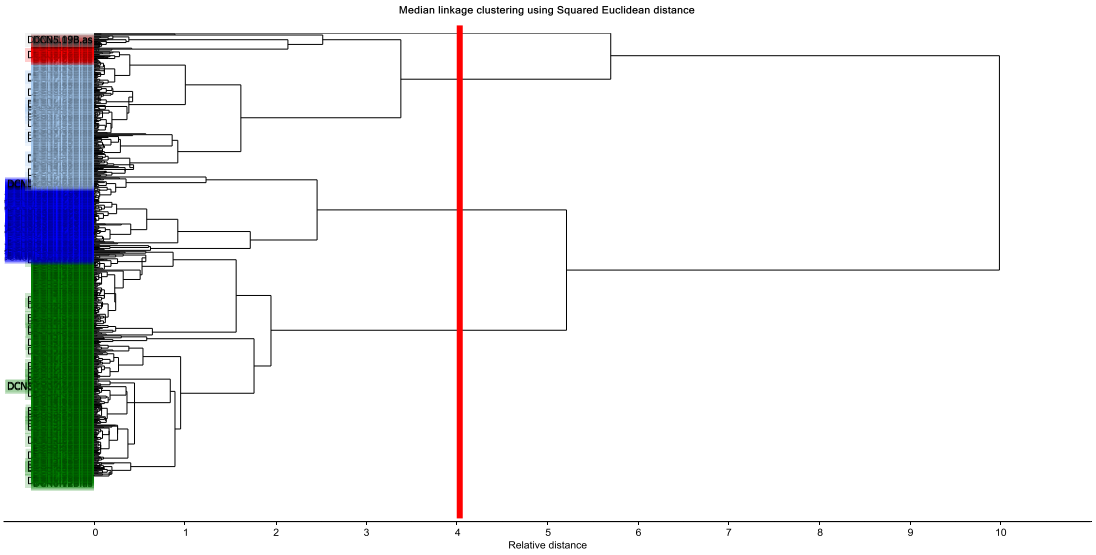


Figura 19. Dendrograma de distancias de enlace mediana con distancia euclídea al cuadrado, con muestras sin pretratar

Tabla 19. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *Cluster* con enlace mediana, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE MEDIANA, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	0 (0%)	105 (97.22%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	2 (1.85%)	95 (87.96%)	11 (10.18%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	2 (1.85%)	94 (87.03%)	12 (11.11%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	18 (16.66%)	20 (0.92%)	67 (62.03%)	3 (2.77%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	2 (1.85%)	1 (0.92%)	45 (41.66%)	60 (55.55%)	0 (0%)	1 (0.92%)	**108**
Corte 8	106 (98.14%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**108**	**23**	**361**	**152**	**3**	**10**	**648**

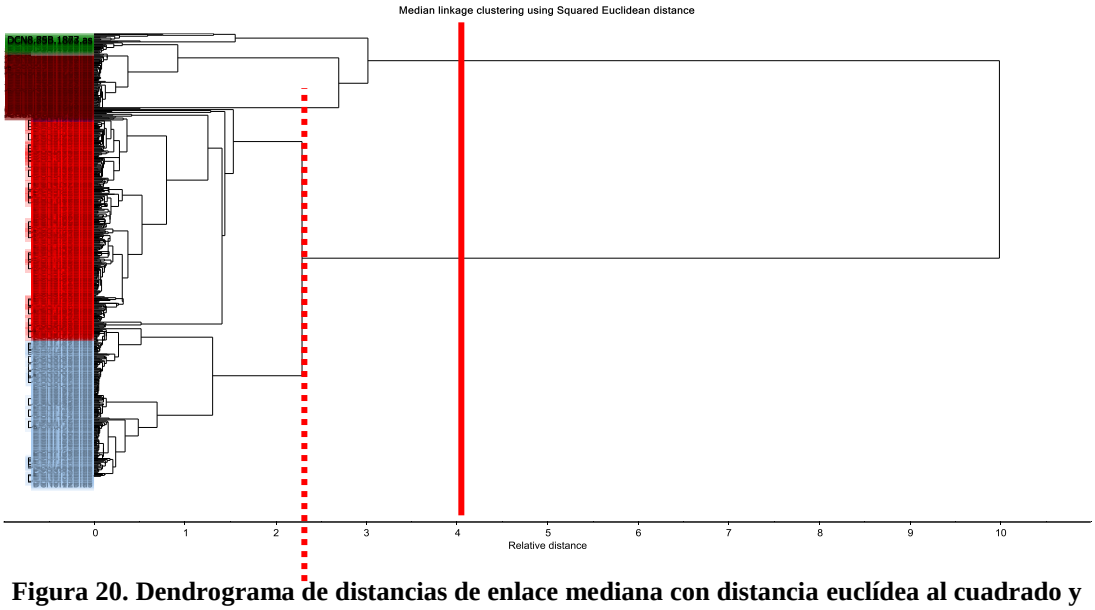


Figura 20. Dendrograma de distancias de enlace mediana con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento MSC

Tabla 20. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento MSC, procedimiento *Cluster* con enlace mediana, distancia euclídea al cuadrado

GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE MEDIANA, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO							
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	107 (99.07%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	1 (0.92%)	0 (0%)	107 (99.07%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	2 (1.85%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	12 (11.11%)	1 (0.92%)	94 (87.96%)	1 (0.92%)	**108**
Total	**0**	**320**	**12**	**218**	**94**	**3**	**648**

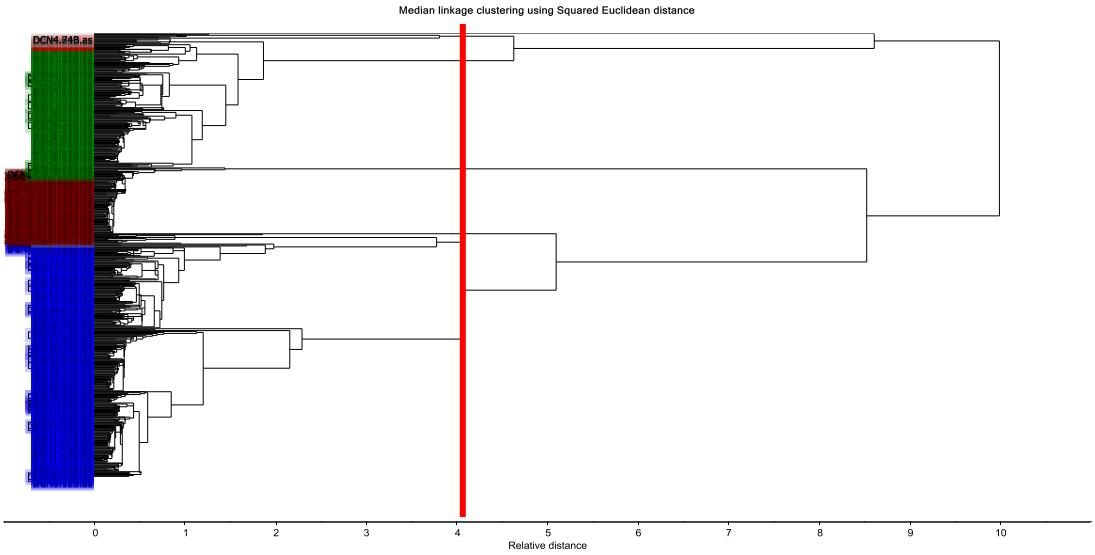


Figura 21. Dendrograma de distancias de enlace mediana con distancia euclídea al cuadrado y muestras con pretratamiento EMSC

Tabla 21. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento EMSC, procedimiento *Cluster* con enlace mediana, distancia euclídea al cuadrado

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE MEDIANA, DISTANCIA EUCLÍDEA AL CUADRADO						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	2 (1.85%)	0 (0%)	106 (98.14%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	28 (25.92%)	6 (5.55%)	69 (63.88%)	2 (1.85%)	0 (0%)	3 (2.77%)	**108**
Corte 5	29 (26.85%)	6 (5.55%)	68 (62.96%)	2 (1.85%)	0 (0%)	3 (2.77%)	**108**
Corte 6	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 7	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	12 (11.11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	96 (88.88%)	0 (0%)	**108**
Total	**287**	**12**	**243**	**4**	**96**	**6**	**648**

Análisis de conglomerados (*cluster*) con enlace Ward

Por último, la agrupación de Ward con la única distancia que mide (figuras 22, 23 y 24) muestra una pauta de agrupación más sencilla que en los enlaces anteriores. En cuanto a los grupos propuéstos (colores), en el caso de las muestras originales, la propuesta no es semejante a la obtenida al inicio con el análisis de componentes principales (tabla 22), sin embargo, con las muestras pretratadas, tanto con MSC (tabla 23) como con EMSC (tabla 24), la propuesta mostrada si es semejante a la obtenida al inicio, agrupándose los cortes según el ciclo vegetativo de la planta, como en casos anteriores.

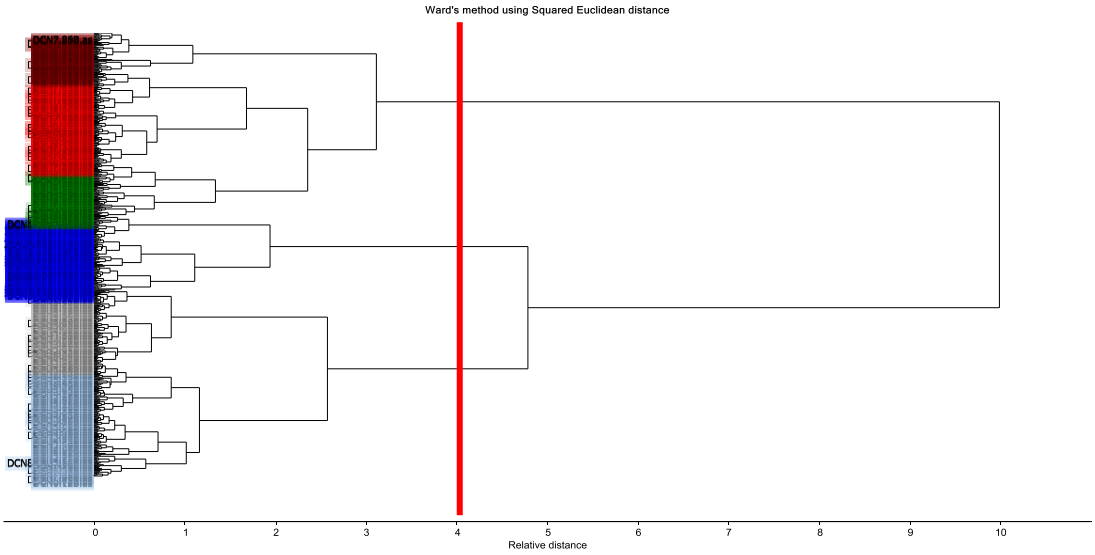


Figura 22. Dendrograma de distancias de enlace Ward, con muestras sin pretratar

Tabla 22. Resultado de agrupamiento con muestras originales, procedimiento *Cluster* con enlace Ward

GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE WARD							
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	0 (0%)	3 (2.77%)	39 (36.11%)	0 (0%)	66 (61.11%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	4 (3.70%)	13 (12.03%)	58 (53.70%)	0 (0%)	33 (30.55%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	4 (3.70%)	14 (12.96%)	57 (52.77%)	0 (0%)	33 (30.55%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	48 (44.44)	1 (0.92%)	8 (7.40%)	48 (44.44%)	3 (2.77%)	**108**
Corte 7	2 (1.85%)	60 (55.55%)	13 (12.03%)	20 (18.51%)	12 (11.11%)	1 (0.92%)	**108**
Corte 8	106 (98.14%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**108**	**116**	**44**	**184**	**60**	**136**	**648**

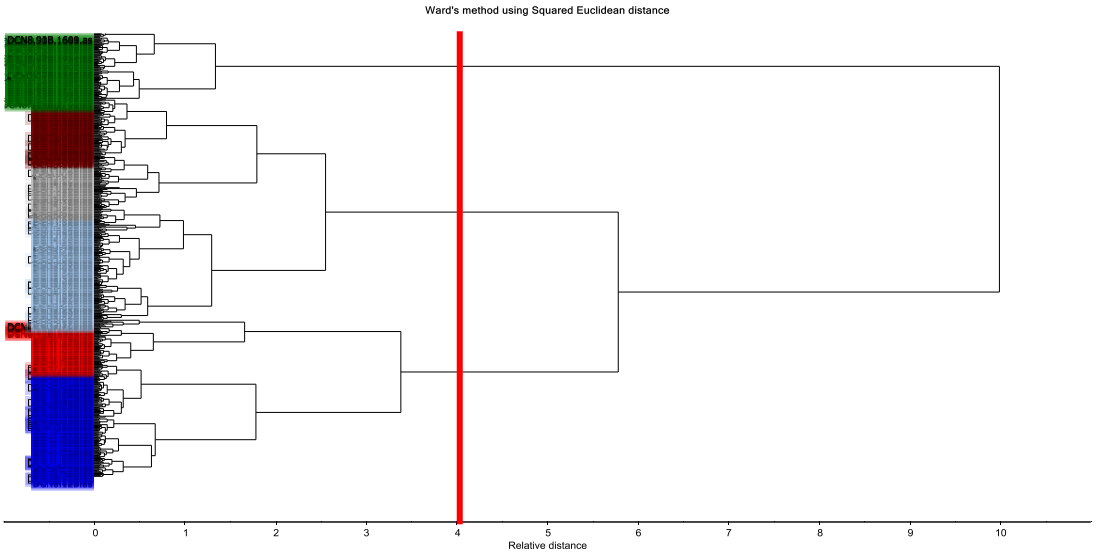


Figura 23. Dendrograma de distancias de enlace Ward y muestras con pretratamiento MSC

Tabla 23. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento MSC, procedimiento *Cluster* con enlace Ward

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE WARD						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	99 (91.66%)	0 (0%)	8 (7.40%)	**108**
Corte 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	56 (51.85%)	15 (13.88%)	37 (34.25%)	**108**
Corte 5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	55 (50.92%)	15 (13.88%)	38 (35.18%)	**108**
Corte 6	107 (99.07%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.92%)	**108**
Corte 7	55 (50.92%)	53 (49.07%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	1 (0.92%)	12 (0.92%)	95 (87.96%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Total	**163**	**65**	**95**	**210**	**30**	**84**	**648**

Los tres primeros cortes (3, 4 y 5) se entremezclan en los grupos 3, 4 y 5 en el caso de las muestras con pretratamiento MSC y grupos 0, 1 y 3 para muestras pretratadas con EMSC. Que no se agrupen bien éstos cortes puede ser debido a que están próximos al mismo periodo vegetativo.

Esto mismo ocurre con los cortes 6 y 7 (grupos 0 y 1 con las muestras MSC y grupos 2 y 5 con muestras EMSC). En algunos casos las plantas podían encontrarse en periodo reproductivo y en otros en el periodo de maduración. Sin embargo, el corte 8 se agrupa casi en su totalidad en el grupo 2 con muestras MSC y en el 4 con muestras EMSC, posiblemente debido a que la mayoría de las muestras de este corte estaban en el periodo de maduración.

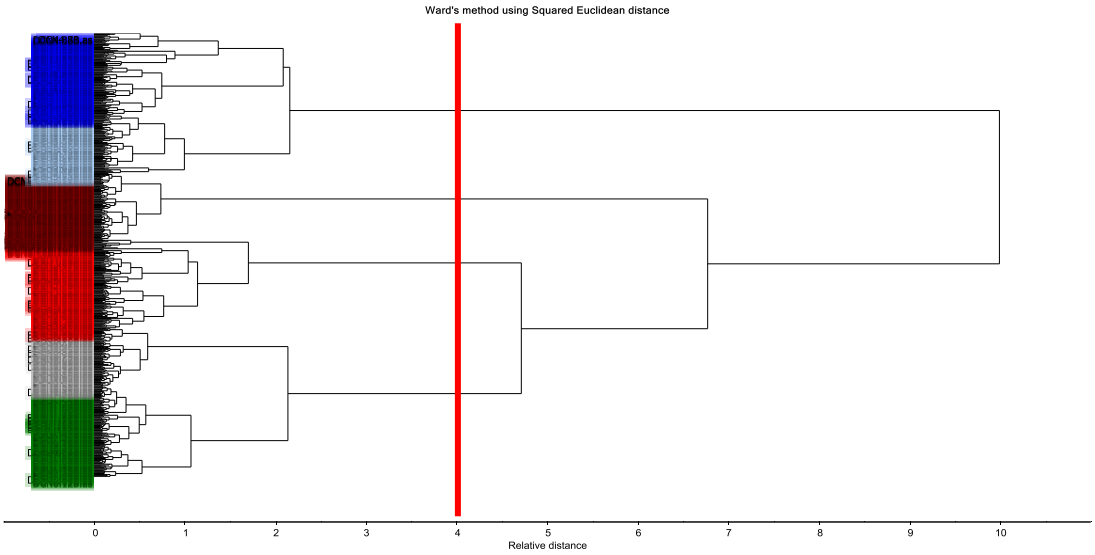


Figura 24. Dendrograma de distancias de enlace Ward y muestras con pretratamiento EMSC

Tabla 24. Resultado de agrupamiento con muestras con pretratamiento EMSC, procedimiento *Cluster* con enlace Ward

	GRUPOS *CLUSTER* CON ENLACE WARD						
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
Corte 3	24 (22.22%)	2 (1.85%)	0 (0%)	82 (75.92%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 4	79 (73.14%)	27 (25.00%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 5	78 (72.22%)	28 (25.92%)	0 (0%)	2 (1.85%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	24 (22.22%)	0 (0%)	0 (0%)	84 (77.77%)	**108**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	108 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**108**
Corte 8	0 (0%)	12 (11.11%)	0 (0%)	0 (0%)	96 (88.88%)	0 (0%)	**108**
Total	**181**	**69**	**132**	**86**	**96**	**84**	**648**

La discusión de éstos resultados, utilizando el enlace Ward, es difícil por la poca información existente sobre todo si sólo se consideran forrajes. Ferreira y Hitchcock (2009) mencionan que el método Ward era, en general, mejor que otros métodos jerárquicos, especialmente cuando las proporciones de grupo eran aproximadamente iguales, como ocurre con las muestras de triticale. Blashfield (1976) cuando comparó cuatro métodos de enlace (enlace jerárquico sencillo, enlace jerárquico completo, enlace jerárquico por mediana y enlace de Ward), también con el método de Ward tuvo mejores resultados que con los otros procedimientos. Por lo tanto, nuestros resultados resultan ser acordes con lo indicado por éstos autores.

Clasificación SIMCA

En este apartado se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis SIMCA. Los resultados que se muestran son los obtenidos con la validación externa, de manera que se hace una evaluación efectiva de la capacidad de agrupamiento.

Los resultados de la clasificación SIMCA, aplicada sobre las propias muestras de calibración, con las muestras sin pretratar se muestran en la tabla 25, con las muestras pretratadas MSC en la tabla 26 y con muestras pretratadas EMSC en la tabla 27. Todos los casos son clasificados adecuadamente dentro de su grupo de pertenencia, pero los tres primeros cortes, como sucedía en los modelos anteriores, se incluyen erróneamente en otros grupos. Los pretratamientos mejoran la clasificación, el tratamiento EMSC respecto al MSC y éste a su vez respecto a las muestras originales sin pretratar.

Tabla 25. Resultados de la clasificación SIMCA con muestras de validación externa sin pretratar

	GRUPOS SIMCA						
	3	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**TOTAL**
Corte 3	9 (90%)	8 (80%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**25**
Corte 4	0 (0%)	10 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**18**
Corte 5	1 (10%)	8 (80%)	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	**20**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)	**14**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	10 (100%)	0 (0%)	**13**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	**10**
TOTAL	**10**	**26**	**29**	**15**	**11**	**10**	**100**

Tabla 26. Resultados de la clasificación SIMCA con muestras de validación externa con pretratamiento MSC

	GRUPOS SIMCA						
	3	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**TOTAL**
Corte 3	9 (90%)	8 (80%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**25**
Corte 4	0 (0%)	10 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**18**
Corte 5	1 (10%)	8 (80%)	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	**20**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	10 (100%)	2 (20%)	0 (0%)	**15**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	10 (100%)	0 (0%)	**15**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	10
TOTAL	**10**	**26**	**26**	**16**	**12**	**10**	**100**

Tabla 27. Resultados de la clasificación SIMCA con muestras de validación con pretratamiento EMSC

	GRUPOS SIMCA						
	3	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**TOTAL**
Corte 3	9 (90%)	8 (80%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**25**
Corte 4	0 (0%)	10 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	**18**
Corte 5	1 (10%)	8 (80%)	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	**20**
Corte 6	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)	**14**
Corte 7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	10 (100%)	0 (0%)	**13**
Corte 8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	**10**
TOTAL	**10**	**26**	**26**	**14**	**11**	**10**	**100**

Puede observarse que la situación descrita es similar a la obtenida con el análisis de componentes principales que se muestra al inicio del capítulo, de manera que los tres primeros cortes, en los tres modelos SIMCA realizados, se entremezclan en los grupos 3, 4 y 5. Esto podría ser debido, como ya se ha comentado, a que las muestras se encuentran próximas en el ciclo vegetativo. Sin embargo, los tres últimos cortes (6, 7 y 8) quedan, casi en su totalidad, correctamente clasificados cada uno dentro de un grupo definido por el modelo SIMCA. Por tanto, este modelo podría ser utilizado para distinguir el forraje de triticale en función del periodo vegetativo en el que se realice el corte.

Ha habido autores como Meza *et al*. (2010) que han obtenido buenos resultados con el método SIMCA y espectros infrarrojos, en este caso en concreto este modelo clasificó correctamente el 100% de muestras de carne adulteradas respecto a las no adulteradas, obteniendo éstos buenos resultados con espectros sin pretratamientos. Más recientemente, Gómez *et al*. (2012), utilizando FTIR junto al SIMCA, detectaron y clasificaron correctamente carne de cerdo sana y carne de cerdo infectada con Trichinella.

Éstos resultados son alentadores y permiten mantener el objetivo de que esta técnica podría optimizarse para el triticale, mejorándose los rendimientos obtenidos, siguiendo con el desarrollo de este método para la identificación del forraje en función de la fecha de corte.

Clasificación según modelos de regresión PLS-DA

Una vez realizados los modelos SIMCA a continuación se realiza el modelo PLS-DA con cada corte y con espectros originales, MSC y EMSC.

El modelo PLS-DA para las muestras sin pretratar y el grupo corte 3 (figura 25) resulta aceptable con un $R^2 = 0.861$, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Además, se observa (línea roja) que sólo se superpone un valor previsto por el modelo y el real.

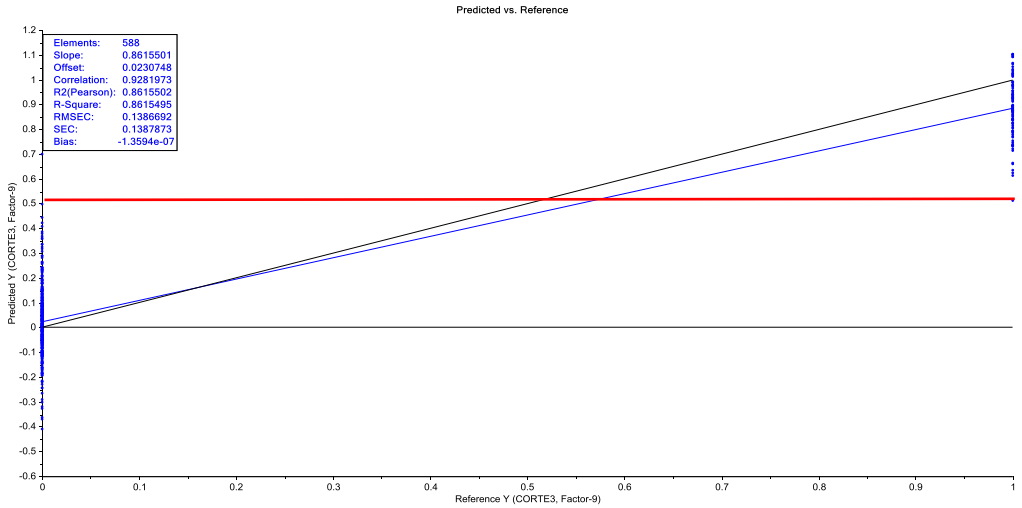


Figura 25. Resultado PLS-DA corte 3 con muestras sin pretratar

En validación externa (figura 26 y tabla 28) este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 3. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 3 es del 80% (tabla 28).

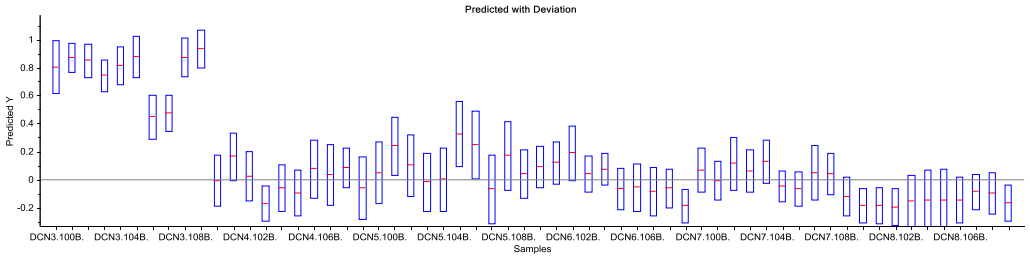


Figura 26. Representación gráfica de la validación externa para el PLS-DA del corte 3 con muestras sin pretratar

Corte	Previsto	Desviación	Referencia	Corte	Previsto	Desviación	Referencia	Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	**0.801**	**0.187**	**1**	4	-0.005	0.180	0	5	0.052	0.217	0
3	**0.866**	**0.104**	**1**	4	0.166	0.167	0	5	0.241	0.205	0
3	**0.847**	**0.116**	**1**	4	0.027	0.176	0	5	0.104	0.220	0
3	**0.742**	**0.113**	**1**	4	-0.167	0.125	0	5	-0.015	0.209	0
3	**0.811**	**0.134**	**1**	4	-0.056	0.164	0	5	0.004	0.227	0
3	**0.875**	**0.149**	**1**	4	-0.091	0.160	0	5	0.328	0.232	0
3	**0.447**	**0.156**	**1**	4	0.078	0.206	0	5	0.250	0.239	0
3	**0.474**	**0.128**	**1**	4	0.040	0.216	0	5	-0.066	0.241	0
3	**0.870**	**0.139**	**1**	4	0.089	0.141	0	5	0.173	0.243	0
3	**0.930**	**0.136**	**1**	4	-0.057	0.223	0	5	0.045	0.171	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia	Corte	Previsto	Desviación	Referencia	Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.093	0.145	0	7	0.071	0.155	0	8	-0.182	0.124	0
6	0.122	0.151	0	7	-0.005	0.138	0	8	-0.182	0.127	0
6	0.191	0.196	0	7	0.115	0.190	0	8	-0.191	0.129	0
6	0.046	0.128	0	7	0.065	0.151	0	8	-0.150	0.185	0
6	0.077	0.115	0	7	0.133	0.154	0	8	-0.144	0.213	0
6	-0.063	0.149	0	7	-0.043	0.108	0	8	-0.144	0.221	0
6	-0.052	0.168	0	7	-0.064	0.122	0	8	-0.142	0.164	0
6	-0.083	0.172	0	7	0.051	0.193	0	8	-0.083	0.126	0
6	-0.058	0.137	0	7	0.043	0.148	0	8	-0.095	0.148	0
6	-0.184	0.118	0	7	-0.118	0.138	0	8	-0.162	0.129	0

Tabla 28. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 3 con muestras sin pretratar. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento MSC y el grupo corte 3, el modelo PLS-DA (figura 27) resulta aceptable con un R^2 = 0.868, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Además se observa (línea roja) que no llega a superponerse ningún valor previsto entre el modelo y el real. Resultados muy parecidos a los obtenidos con las muestras sin pretratar del mismo grupo.

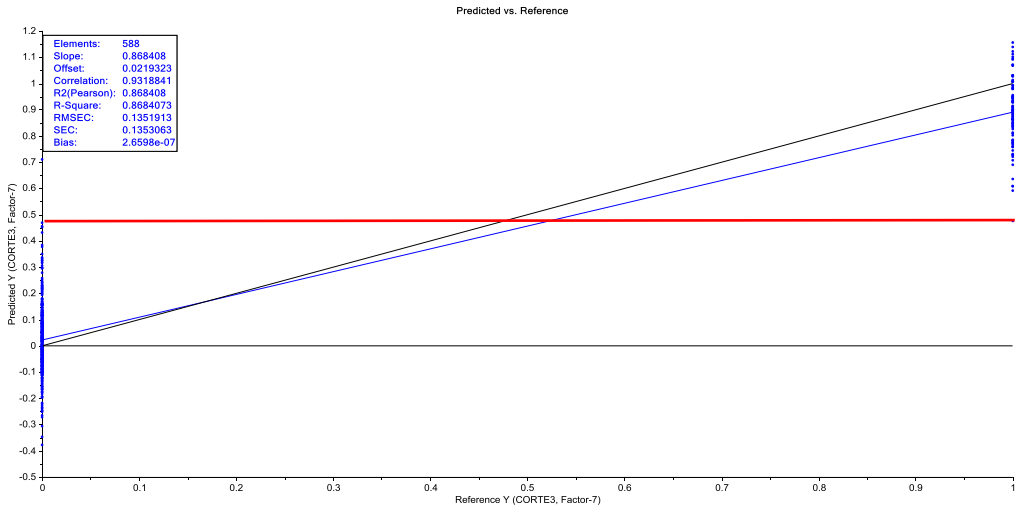


Figura 27. Resultado PLS-DA corte 3 con muestras pretratadas MSC.

En validación externa (figura 28 y tabla 29), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras con pretratamiento MSC del corte 3, sólo solapándose 1 muestra con el resto del grupo. En este caso el porcentaje de clasificación de las muestras del corte 3 es del 90 % (tabla 29).

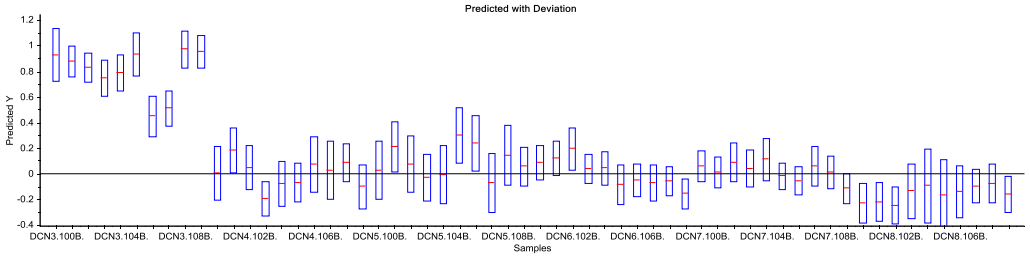


Figura 28. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 3 con muestras pretratadas MSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	**0.93**	**0.20**	**1**
3	**0.88**	**0.12**	**1**
3	**0.83**	**0.12**	**1**
3	**0.75**	**0.14**	**1**
3	**0.79**	**0.14**	**1**
3	**0.93**	**0.17**	**1**
3	**0.45**	**0.16**	**1**
3	**0.51**	**0.14**	**1**
3	**0.97**	**0.14**	**1**
3	**0.95**	**0.13**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.00	0.21	0
4	0.18	0.18	0
4	0.05	0.17	0
4	-0.19	0.13	0
4	-0.08	0.17	0
4	-0.07	0.15	0
4	0.07	0.22	0
4	0.03	0.23	0
4	0.09	0.15	0
4	-0.10	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.03	0.23	0
5	0.21	0.20	0
5	0.08	0.22	0
5	-0.03	0.18	0
5	-0.01	0.22	0
5	0.30	0.22	0
5	0.24	0.22	0
5	-0.07	0.23	0
5	0.14	0.24	0
5	0.06	0.15	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.09	0.14	0
6	0.12	0.13	0
6	0.19	0.16	0
6	0.04	0.11	0
6	0.04	0.13	0
6	-0.09	0.15	0
6	-0.05	0.13	0
6	-0.07	0.14	0
6	-0.06	0.11	0
6	-0.16	0.12	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	0.06	0.12	0
7	0.01	0.12	0
7	0.09	0.15	0
7	0.04	0.14	0
7	0.11	0.16	0
7	-0.02	0.10	0
7	-0.06	0.11	0
7	0.06	0.15	0
7	0.01	0.13	0
7	-0.12	0.12	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	-0.23	0.15	0
8	-0.22	0.15	0
8	-0.25	0.15	0
8	-0.14	0.21	0
8	-0.09	0.29	0
8	-0.17	0.28	0
8	-0.14	0.20	0
8	-0.10	0.13	0
8	-0.08	0.15	0
8	-0.16	0.14	0

Tabla 29. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 3 con muestras pretratadas MSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

El modelo PLS-DA para las muestras con pretratamienro EMSC del grupo corte 3 (figura 29) resulta mejor que en los dos casos anteriores, con un R^2 = 0.890 y la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Además se observa (línea roja) que no se superpone ningún previsto entre el modelo y el real, como sí ocurría anteriormente.

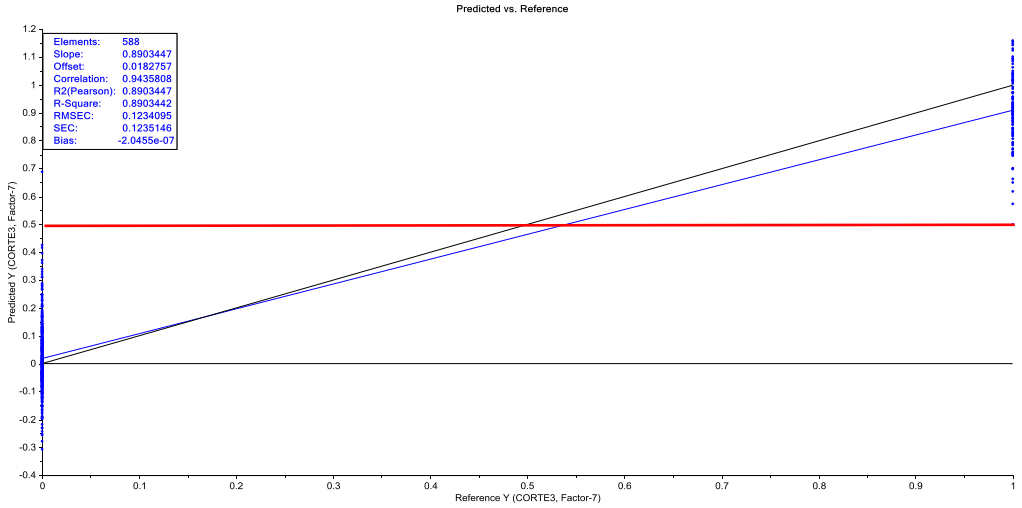


Figura 29. Resultado PLS-DA corte 3 con muestras pretratadas EMSC

En validación externa (figura 30 y tabla 30), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 3. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 3 es del 90 % (tabla 30), confirmando que con el pretratamiento EMSC se obtienen los mejores resultados.

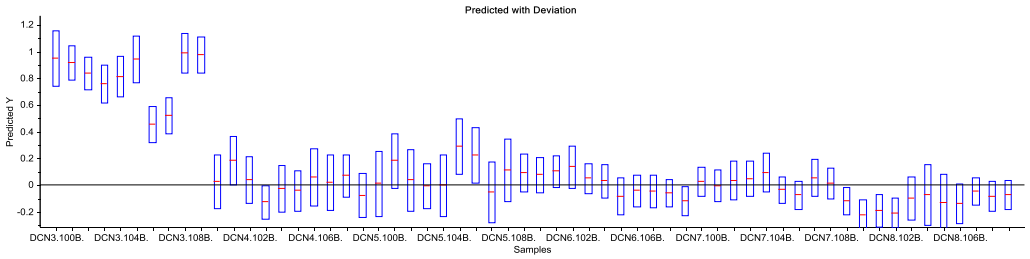


Figura 30. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 3 con muestras pretratadas EMSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	**0.95**	**0.21**	**1**
3	**0.91**	**0.13**	**1**
3	**0.84**	**0.12**	**1**
3	**0.76**	**0.14**	**1**
3	**0.81**	**0.15**	**1**
3	**0.94**	**0.17**	**1**
3	**0.45**	**0.13**	**1**
3	**0.52**	**0.13**	**1**
3	**0.99**	**0.15**	**1**
3	**0.98**	**0.14**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.03	0.20	0
4	0.18	0.18	0
4	0.04	0.18	0
4	-0.13	0.13	0
4	-0.03	0.17	0
4	-0.04	0.15	0
4	0.06	0.21	0
4	0.02	0.21	0
4	0.07	0.16	0
4	-0.08	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.01	0.25	0
5	0.18	0.21	0
5	0.04	0.23	0
5	-0.01	0.17	0
5	0.00	0.23	0
5	0.29	0.21	0
5	0.22	0.21	0
5	-0.05	0.23	0
5	0.11	0.24	0
5	0.09	0.14	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.08	0.13	0
6	0.10	0.12	0
6	0.13	0.16	0
6	0.05	0.11	0
6	0.03	0.13	0
6	-0.08	0.14	0
6	-0.04	0.12	0
6	-0.05	0.12	0
6	-0.06	0.10	0
6	-0.12	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	0.03	0.11	0
7	-0.01	0.12	0
7	0.03	0.14	0
7	0.05	0.13	0
7	0.09	0.14	0
7	-0.03	0.10	0
7	-0.08	0.10	0
7	0.05	0.14	0
7	0.01	0.12	0
7	-0.12	0.10	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	-0.22	0.11	0
8	-0.19	0.12	0
8	-0.21	0.11	0
8	-0.10	0.16	0
8	-0.07	0.23	0
8	-0.13	0.21	0
8	-0.14	0.15	0
8	-0.05	0.10	0
8	-0.08	0.11	0
8	-0.07	0.11	0

Tabla 30. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 3 con muestras pretratadas EMSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para el grupo corte 4, el modelo PLS-DA para las muestras se muestra en la figura 31. El resultado es bueno, con un R^2 = 0.914, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Se observa (línea roja) que no se superpone ningún valor previsto por el modelo y el real.

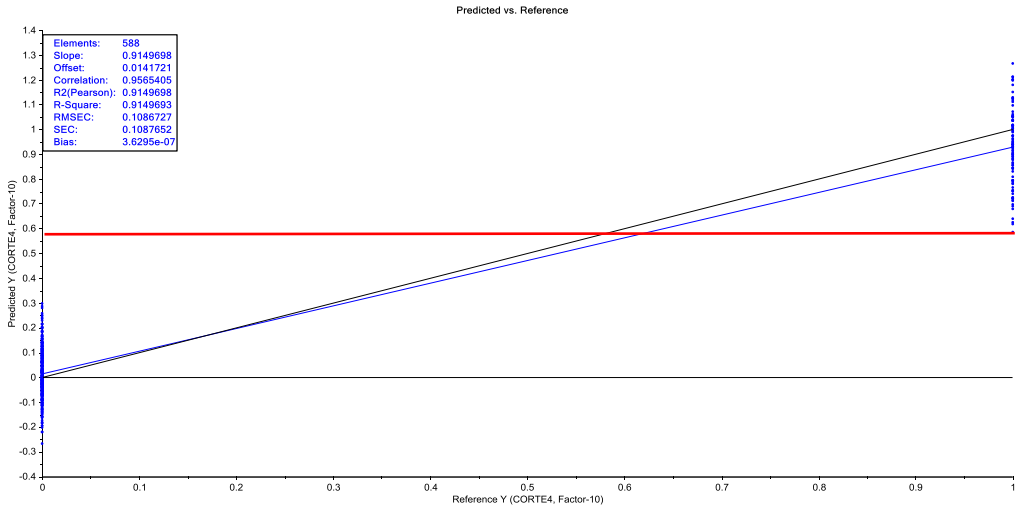


Figura 31. Resultado PLS-DA corte 4 con muestras sin pretratar

En validación externa (figura 32 y tabla 31), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 4. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 4 es del 100 % (tabla 31), por lo que el resultado de este modelo para clasificar las muestras del corte 4 es aceptable

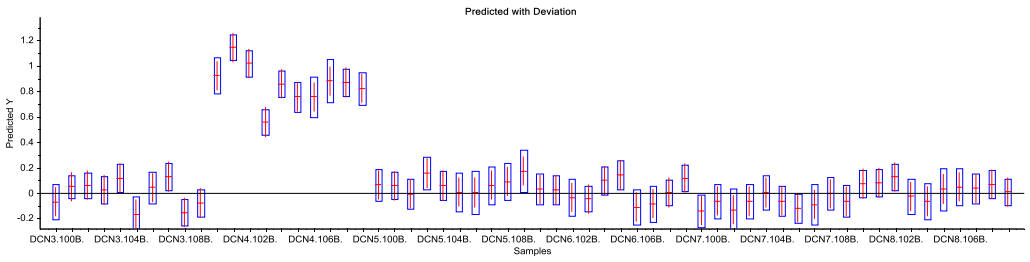


Figura 32. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 4 con muestras sin pretratar.

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.07	0.14	0
3	0.05	0.09	0
3	0.06	0.10	0
3	0.02	0.11	0
3	0.11	0.11	0
3	-0.17	0.14	0
3	0.04	0.12	0
3	0.12	0.11	0
3	-0.16	0.11	0
3	-0.08	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	**0.92**	**0.14**	**1**
4	**1.14**	**0.10**	**1**
4	**1.02**	**0.11**	**1**
4	**0.55**	**0.10**	**1**
4	**0.85**	**0.10**	**1**
4	**0.75**	**0.12**	**1**
4	**0.75**	**0.16**	**1**
4	**0.88**	**0.17**	**1**
4	**0.87**	**0.11**	**1**
4	**0.82**	**0.13**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.06	0.13	0
5	0.05	0.11	0
5	-0.01	0.12	0
5	0.15	0.12	0
5	0.06	0.11	0
5	0.00	0.15	0
5	0.00	0.17	0
5	0.06	0.15	0
5	0.09	0.14	0
5	0.17	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.03	0.12	0
6	0.02	0.11	0
6	-0.04	0.15	0
6	-0.05	0.10	0
6	0.09	0.11	0
6	0.14	0.11	0
6	-0.11	0.14	0
6	-0.09	0.14	0
6	0.00	0.10	0
6	0.11	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.14	0.13	0
7	-0.07	0.14	0
7	-0.14	0.17	0
7	-0.07	0.13	0
7	0.00	0.13	0
7	-0.07	0.12	0
7	-0.12	0.11	0
7	-0.09	0.16	0
7	-0.01	0.13	0
7	-0.07	0.13	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.07	0.11	0
8	0.08	0.11	0
8	0.12	0.10	0
8	-0.03	0.14	0
8	-0.07	0.14	0
8	0.03	0.17	0
8	0.04	0.15	0
8	0.03	0.12	0
8	0.06	0.11	0
8	0.01	0.10	0

Tabla 31. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 4 con muestras sin pretratar. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

El modelo PLS-DA para las muestras con pretratamiento MSC del grupo corte 4 (figura 33) resulta aceptable con un R^2 = 0.922, mejor resultado en el anterior modelo, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Sigue observándose (línea roja) que no se superponen valores previstos por el modelo y reales.

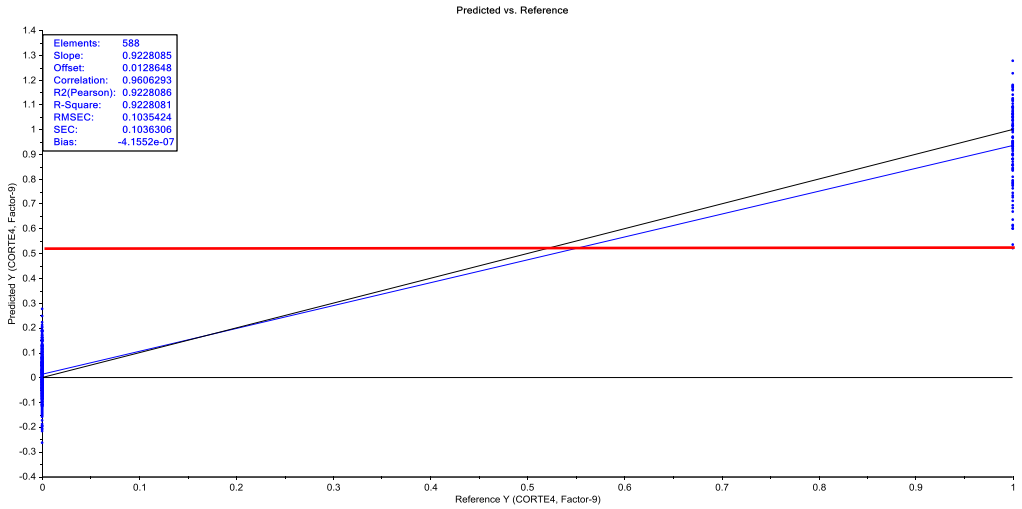


Figura 33. Resultado PLS-DA corte 4 con muestras pretratadas MSC

En validación externa (figura 34 y tabla 32), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 4. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 4, en este caso, es del 100 % (tabla 32), muy próximo al obtenido con las muestras sin pretratar, siendo un modelo aceptable para agrupar las muestras de este corte.

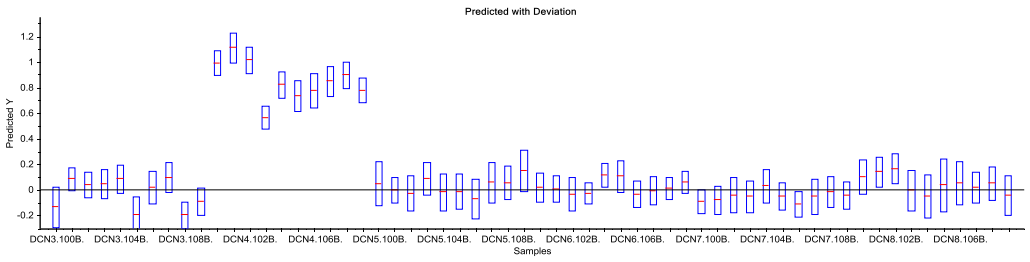


Figura 34. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 4 con muestras pretratadas MSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.14	0.16	0
3	0.08	0.09	0
3	0.04	0.10	0
3	0.05	0.11	0
3	0.08	0.11	0
3	-0.19	0.14	0
3	0.02	0.13	0
3	0.10	0.12	0
3	-0.20	0.10	0
3	-0.09	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	**0.99**	**0.10**	**1**
4	**1.11**	**0.12**	**1**
4	**1.01**	**0.10**	**1**
4	**0.57**	**0.09**	**1**
4	**0.82**	**0.10**	**1**
4	**0.73**	**0.12**	**1**
4	**0.78**	**0.13**	**1**
4	**0.85**	**0.12**	**1**
4	**0.90**	**0.10**	**1**
4	**0.78**	**0.10**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.05	0.17	0
5	0.00	0.10	0
5	-0.03	0.14	0
5	0.09	0.13	0
5	-0.02	0.15	0
5	-0.01	0.14	0
5	-0.07	0.15	0
5	0.06	0.16	0
5	0.06	0.13	0
5	0.15	0.16	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.02	0.11	0
6	0.01	0.10	0
6	-0.03	0.13	0
6	-0.03	0.08	0
6	0.12	0.09	0
6	0.11	0.12	0
6	-0.04	0.10	0
6	-0.01	0.11	0
6	0.01	0.08	0
6	0.06	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.09	0.09	0
7	-0.08	0.11	0
7	-0.04	0.14	0
7	-0.05	0.13	0
7	0.03	0.13	0
7	-0.05	0.11	0
7	-0.11	0.10	0
7	-0.05	0.14	0
7	-0.02	0.12	0
7	-0.04	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.10	0.13	0
8	0.14	0.12	0
8	0.17	0.12	0
8	0.00	0.16	0
8	-0.05	0.17	0
8	0.04	0.21	0
8	0.05	0.17	0
8	0.02	0.12	0
8	0.05	0.13	0
8	-0.05	0.15	0

Tabla 32. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 4 con muestras pretratadas MSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para el grupo corte 4 y las muestras con pretratamiento EMSC, el modelo PLS-DA se muestra en la figura 35. El resultado es bueno, con un R^2 = 0.907, un resultado superior al obtenido con las muestras sin pretratar, pero inferior al de las muestras con pretratamiento MSC con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Se observa (línea roja) que no se superpone ningún valor previsto por el modelo y el real.

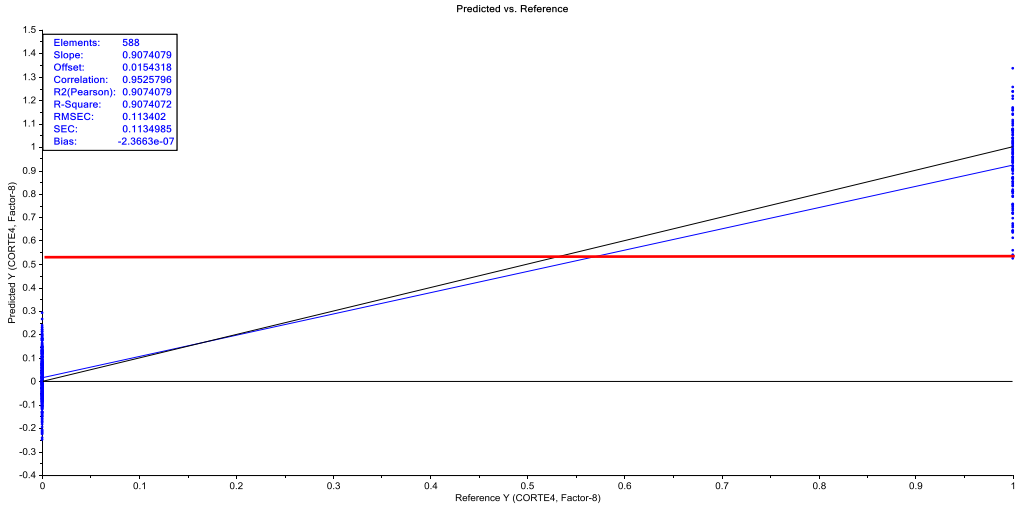


Figura 35. Resultado PLS-DA corte 4 con muestras pretratadas EMSC

En validación externa (figura 36 y tabla 33), este modelo sigue obteniendo un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 4. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 4 es del 100 % (tabla 33), muy parecido a los dos obtenidos anteriormente.

Al contrario que en el modelo realizado para el corte 3, los pretratamiento para las muestras del corte 4 no mejora los resultados.

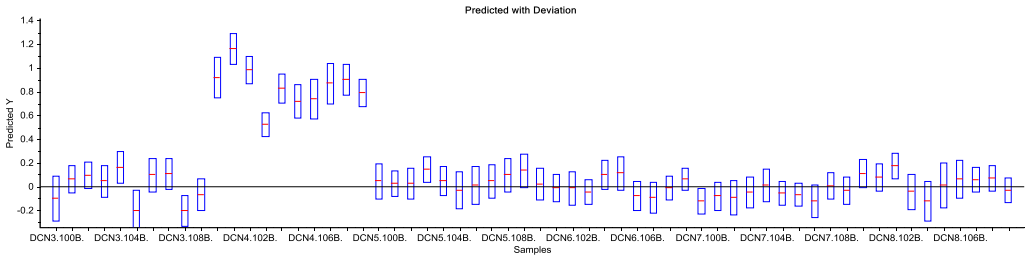


Figura 36. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 4 con muestras pretratadas EMSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.10	0.19	0
3	0.06	0.11	0
3	0.09	0.11	0
3	0.04	0.13	0
3	0.16	0.13	0
3	-0.21	0.17	0
3	0.10	0.14	0
3	0.11	0.13	0
3	-0.21	0.13	0
3	-0.07	0.13	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	**0.92**	**0.17**	**1**
4	**1.16**	**0.13**	**1**
4	**0.98**	**0.11**	**1**
4	**0.52**	**0.10**	**1**
4	**0.83**	**0.12**	**1**
4	**0.72**	**0.14**	**1**
4	**0.74**	**0.17**	**1**
4	**0.87**	**0.17**	**1**
4	**0.90**	**0.13**	**1**
4	**0.79**	**0.12**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.04	0.15	0
5	0.03	0.11	0
5	0.03	0.13	0
5	0.14	0.11	0
5	0.05	0.12	0
5	-0.03	0.16	0
5	0.01	0.16	0
5	0.04	0.14	0
5	0.10	0.14	0
5	0.13	0.14	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.02	0.13	0
6	-0.01	0.11	0
6	-0.01	0.14	0
6	-0.05	0.10	0
6	0.10	0.12	0
6	0.11	0.14	0
6	-0.08	0.12	0
6	-0.10	0.13	0
6	-0.01	0.10	0
6	0.06	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.12	0.11	0
7	-0.08	0.12	0
7	-0.10	0.14	0
7	-0.05	0.13	0
7	0.01	0.14	0
7	-0.06	0.10	0
7	-0.07	0.10	0
7	-0.12	0.14	0
7	0.00	0.11	0
7	-0.03	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.11	0.12	0
8	0.08	0.11	0
8	0.17	0.11	0
8	-0.05	0.15	0
8	-0.12	0.17	0
8	0.01	0.19	0
8	0.06	0.16	0
8	0.06	0.10	0
8	0.07	0.11	0
8	-0.03	0.10	0

Tabla 33. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 4 con muestras pretratadas EMSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

El modelo PLS-DA para las muestras sin pretratamiento del grupo corte 5 (figura 37) resulta aceptable con un R^2 = 0.642, no siendo un buen resultado, con la línea de regresión del modelo (azul) y la línea de regresión ideal (negra) menos próximas entre sí que en los grupos de los cortes anteriores. Se observa (línea roja) que se superponen numerosos valores previstos por el modelo y los reales.

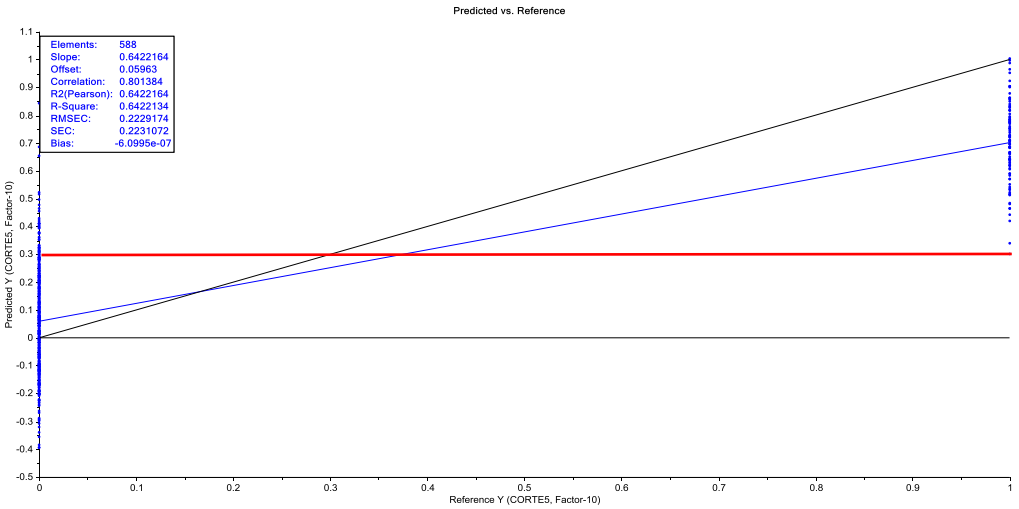


Figura 37. Resultado PLS-DA corte 5 con muestras sin pretratar

En validación externa (figura 38 y tabla 34), a pesar de la que la R^2 anterior sea baja, se comprueba que este modelo tiene buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 5. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 5 es del 100 % (tabla 34), a pesar de ello, el resultado no es óptimo porque la incertidumbre es elevada, provocando que las muestras no acaben de ser agrupadas con plena seguridad (línea horizontal roja discontinua figura 38).

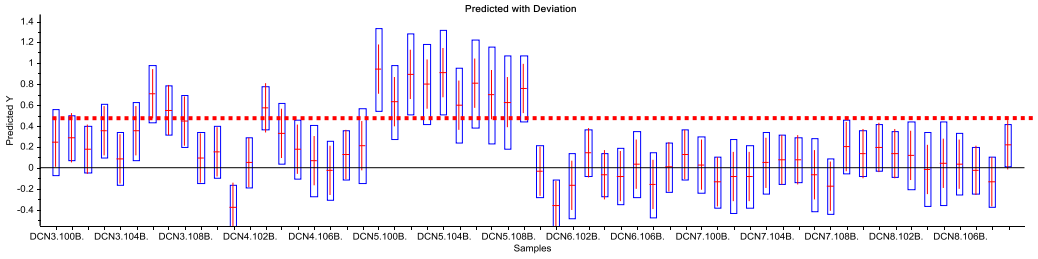


Figura 38. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 5 con muestras sin pretratar

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	0.24	0.32	0
3	0.28	0.21	0
3	0.17	0.22	0
3	0.35	0.26	0
3	0.08	0.25	0
3	0.35	0.28	0
3	0.70	0.28	0
3	0.55	0.24	0
3	0.44	0.25	0
3	0.09	0.24	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.15	0.24	0
4	-0.38	0.21	0
4	0.05	0.24	0
4	0.57	0.20	0
4	0.32	0.29	0
4	0.18	0.28	0
4	0.07	0.34	0
4	-0.03	0.28	0
4	0.12	0.23	0
4	0.21	0.36	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	**0.94**	**0.39**	**1**
5	**0.63**	**0.35**	**1**
5	**0.89**	**0.39**	**1**
5	**0.80**	**0.39**	**1**
5	**0.91**	**0.40**	**1**
5	**0.59**	**0.36**	**1**
5	**0.80**	**0.42**	**1**
5	**0.69**	**0.46**	**1**
5	**0.62**	**0.45**	**1**
5	**0.75**	**0.31**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	-0.04	0.25	0
6	-0.36	0.25	0
6	-0.17	0.31	0
6	0.14	0.22	0
6	-0.07	0.20	0
6	-0.08	0.27	0
6	0.03	0.32	0
6	-0.16	0.31	0
6	0.00	0.24	0
6	0.13	0.24	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	0.03	0.27	0
7	-0.14	0.25	0
7	-0.08	0.36	0
7	-0.09	0.30	0
7	0.04	0.29	0
7	0.08	0.23	0
7	0.07	0.22	0
7	-0.07	0.35	0
7	-0.18	0.27	0
7	0.20	0.26	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.14	0.22	0
8	0.19	0.22	0
8	0.13	0.22	0
8	0.11	0.32	0
8	-0.02	0.35	0
8	0.04	0.40	0
8	0.03	0.30	0
8	-0.03	0.22	0
8	-0.14	0.24	0
8	0.21	0.20	0

Tabla 34. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 5 con muestras sin pretratar. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

El modelo PLS-DA para las muestras con pretratamiento MSC del grupo corte 5 (figura 39) resulta mejor que el anterior, con un $R^2 = 0.711$, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) más próximas entre sí. Aunque sigue observándose (línea roja) que se superponen valores previstos por el modelo y reales.

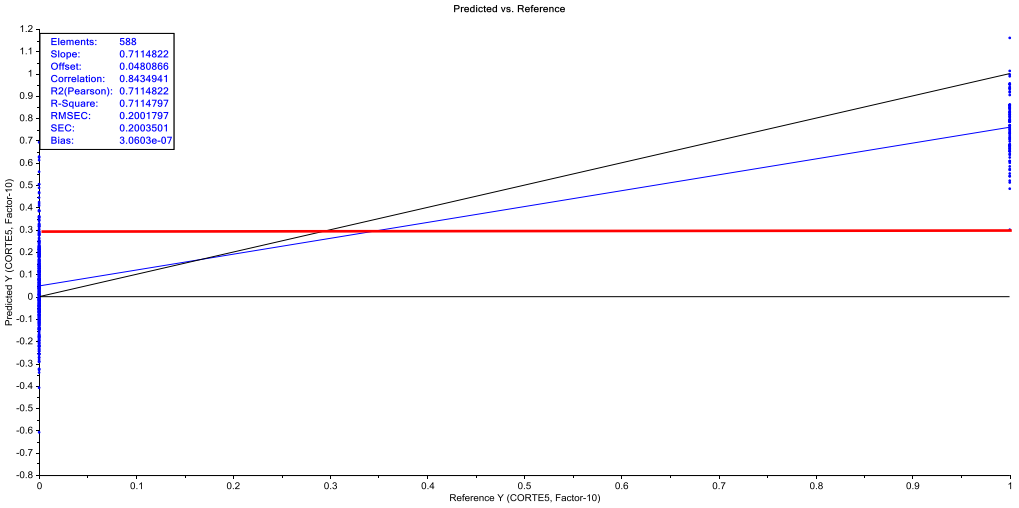


Figura 39. Resultado PLS-DA corte 5 y muestras con pretratamiento MSC

En validación externa (figura 40 y tabla 35), al igual que ha ocurrido anteriormente, este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 5. El porcentaje de clasificación de las muestras del corte 5 es del 100 % (tabla 35), aunque si se observa los resultados, es inferior al obtenido con las muestras sin pretratar y ocurre como en las muestras originales, la desviación es elevada.

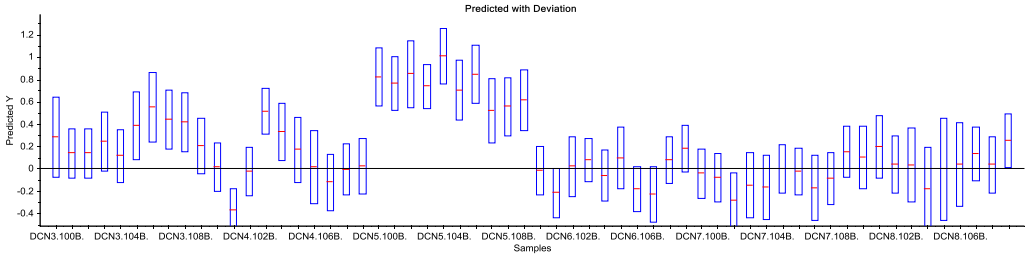


Figura 40. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 5 y muestras con pretratamiento MSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	0.28	0.36	0
3	0.14	0.22	0
3	0.14	0.22	0
3	0.25	0.26	0
3	0.11	0.24	0
3	0.38	0.30	0
3	0.55	0.31	0
3	0.44	0.26	0
3	0.42	0.26	0
3	0.20	0.25	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.01	0.22	0
4	-0.37	0.19	0
4	-0.03	0.22	0
4	0.51	0.21	0
4	0.33	0.25	0
4	0.17	0.29	0
4	0.01	0.33	0
4	-0.12	0.25	0
4	-0.01	0.23	0
4	0.02	0.25	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	**0.82**	**0.26**	**1**
5	**0.76**	**0.24**	**1**
5	**0.84**	**0.30**	**1**
5	**0.73**	**0.20**	**1**
5	**1.01**	**0.25**	**1**
5	**0.70**	**0.27**	**1**
5	**0.84**	**0.26**	**1**
5	**0.52**	**0.29**	**1**
5	**0.56**	**0.26**	**1**
5	**0.61**	**0.27**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	-0.02	0.22	0
6	-0.22	0.22	0
6	0.02	0.27	0
6	0.08	0.19	0
6	-0.06	0.23	0
6	0.10	0.28	0
6	-0.18	0.20	0
6	-0.23	0.25	0
6	0.08	0.21	0
6	0.18	0.21	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.04	0.22	0
7	-0.08	0.22	0
7	-0.29	0.25	0
7	-0.15	0.29	0
7	-0.17	0.29	0
7	0.00	0.22	0
7	-0.02	0.21	0
7	-0.17	0.29	0
7	-0.09	0.24	0
7	0.15	0.23	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.10	0.28	0
8	0.19	0.28	0
8	0.04	0.26	0
8	0.03	0.33	0
8	-0.19	0.38	0
8	0.00	0.46	0
8	0.04	0.38	0
8	0.13	0.24	0
8	0.04	0.25	0
8	0.25	0.24	0

Tabla 35. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 5 con muestras pretratadas MSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo.

El modelo PLS-DA para las muestras con pretratamiento EMSC y grupo corte 5 (figura 41) resulta aceptable con un R^2 = 0.739, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) más próximas entre sí que en el modelo con muestras sin pretratar y con MSC, observándose (línea roja) que se superponen un menor número de valores previsto por el modelo y el real.

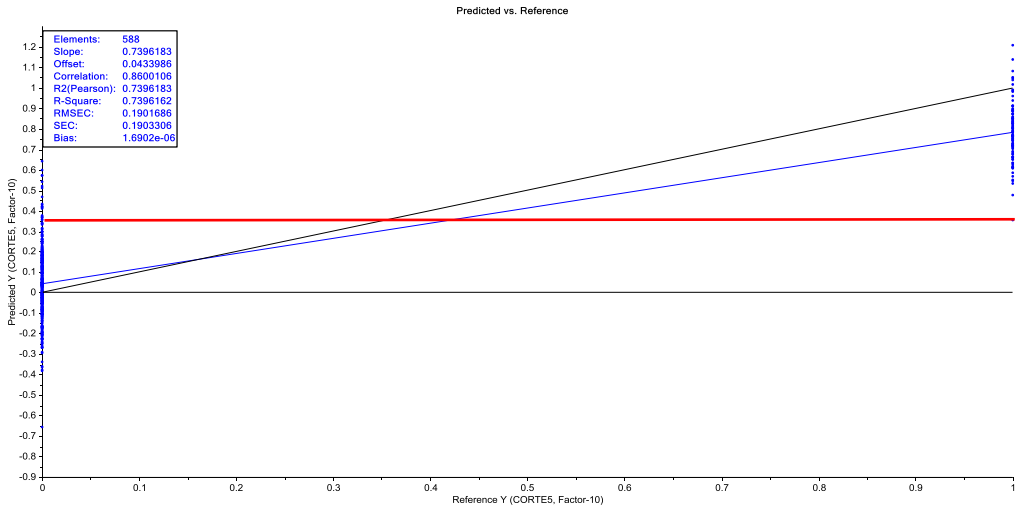


Figura 41. Resultado PLS-DA corte 5 y muestras con pretratamiento EMSC

En validación externa (figura 42 y tabla 36), este modelo sigue mostrando un mejor comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 5 que en los dos casos anteriores, como demuestra el porcentaje de clasificación de las muestras del corte 4, en este caso es del 100 % (tabla 36) y niveles de desviación inferiores. Por lo tanto, como ocurrió con los modelos probados para agrupar las muestras del corte 3, los pretratamientos mejoran los resultados, siendo el EMSC el que mejor resultados obtiene.

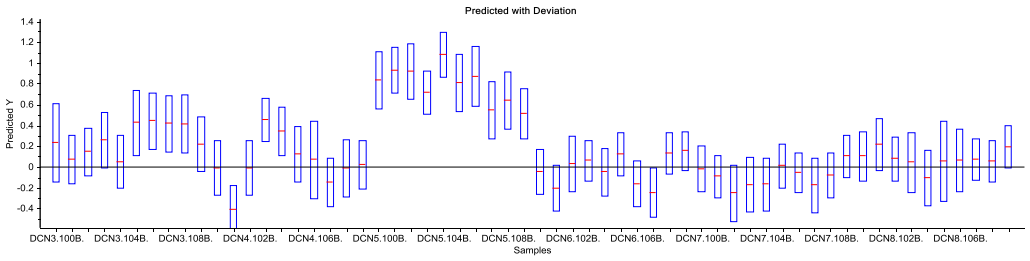


Figura 42. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 5 y muestras con pretratamiento EMSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	0.23	0.38	0
3	0.07	0.23	0
3	0.14	0.23	0
3	0.26	0.27	0
3	0.05	0.25	0
3	0.42	0.31	0
3	0.44	0.27	0
3	0.41	0.27	0
3	0.41	0.28	0
3	0.22	0.26	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	-0.01	0.27	0
4	-0.41	0.24	0
4	-0.01	0.26	0
4	0.46	0.21	0
4	0.34	0.24	0
4	0.12	0.27	0
4	0.07	0.37	0
4	-0.15	0.23	0
4	-0.01	0.27	0
4	0.02	0.23	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	**0.83**	**0.27**	**1**
5	**0.93**	**0.22**	**1**
5	**0.92**	**0.26**	**1**
5	**0.71**	**0.20**	**1**
5	**1.08**	**0.21**	**1**
5	**0.80**	**0.28**	**1**
5	**0.87**	**0.29**	**1**
5	**0.55**	**0.28**	**1**
5	**0.64**	**0.27**	**1**
5	**0.51**	**0.24**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	-0.05	0.22	0
6	-0.20	0.22	0
6	0.03	0.27	0
6	0.06	0.19	0
6	-0.05	0.23	0
6	0.12	0.21	0
6	-0.16	0.22	0
6	-0.25	0.24	0
6	0.13	0.20	0
6	0.16	0.19	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.02	0.22	0
7	-0.09	0.20	0
7	-0.25	0.27	0
7	-0.17	0.26	0
7	-0.17	0.26	0
7	0.01	0.21	0
7	-0.05	0.19	0
7	-0.18	0.26	0
7	-0.08	0.22	0
7	0.10	0.20	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.10	0.24	0
8	0.22	0.25	0
8	0.08	0.21	0
8	0.04	0.29	0
8	-0.10	0.27	0
8	0.06	0.39	0
8	0.06	0.30	0
8	0.07	0.20	0
8	0.06	0.20	0
8	0.19	0.20	0

Tabla 36. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 5 con muestras pretratadas EMSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

El modelo PLS-DA para las muestras sin pretratar y el grupo corte 6 (figura 43) resulta aceptable con un R^2 = 0.844, con la línea de regresión (azul) y la línea de regresión ideal (negra) próximas entre sí. Además se observa (línea roja) que sólo se superpone un valor previsto por el modelo y el real.

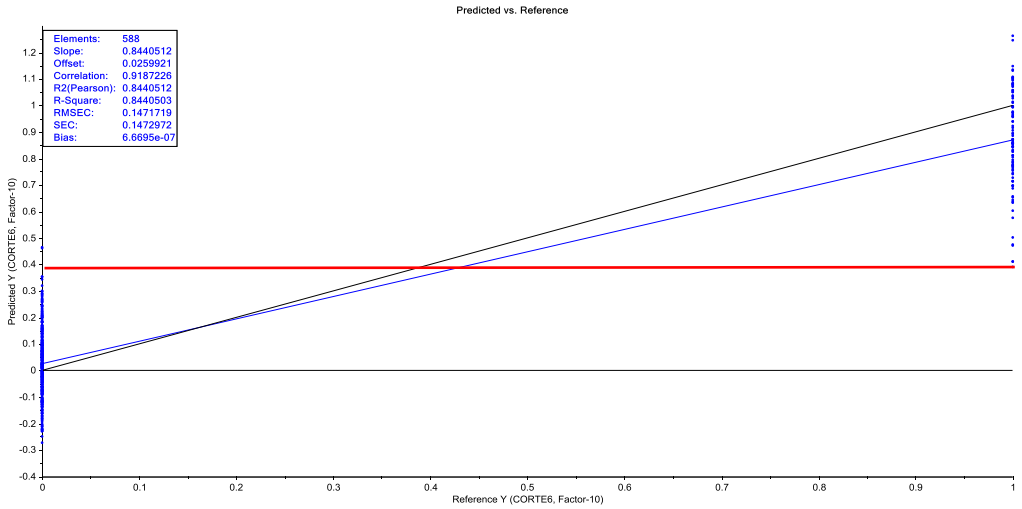


Figura 43. Resultado PLS-DA corte 6 con muestras sin pretratar

En validación externa (figura 43 y tabla 37), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras del corte 3. Todas las muestras de validación externa han sido bien agrupadas, pero hay una de ellas que teniendo en cuenta la desviación puede no clasificarse correctamente (tabla 28).

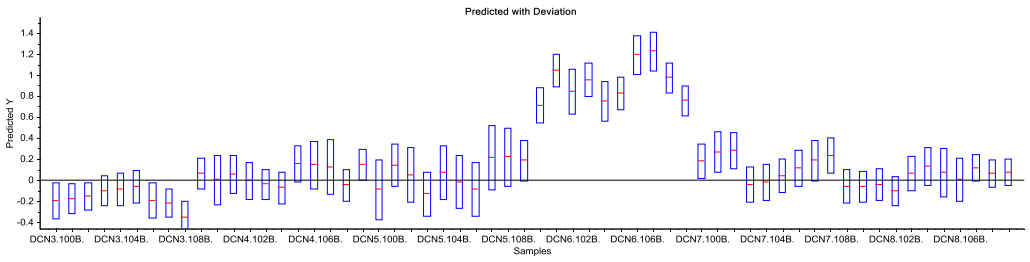


Figura 43. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 6 con muestras sin pretratar

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.20	0.17	0
3	-0.18	0.14	0
3	-0.16	0.13	0
3	-0.10	0.14	0
3	-0.09	0.15	0
3	-0.06	0.16	0
3	-0.19	0.17	0
3	-0.22	0.13	0
3	-0.36	0.15	0
3	0.06	0.15	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.00	0.23	0
4	0.05	0.18	0
4	-0.01	0.18	0
4	-0.04	0.14	0
4	-0.07	0.15	0
4	0.15	0.17	0
4	0.14	0.23	0
4	0.12	0.26	0
4	-0.05	0.15	0
4	0.14	0.14	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	-0.09	0.29	0
5	0.14	0.20	0
5	0.05	0.26	0
5	-0.13	0.21	0
5	0.07	0.25	0
5	-0.02	0.25	0
5	-0.09	0.25	0
5	0.22	0.31	0
5	0.22	0.28	0
5	0.18	0.20	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	**0.71**	**0.17**	**1**
6	**1.04**	**0.15**	**1**
6	**0.84**	**0.22**	**1**
6	**0.95**	**0.16**	**1**
6	**0.75**	**0.19**	**1**
6	**0.83**	**0.15**	**1**
6	**1.19**	**0.18**	**1**
6	**1.22**	**0.19**	**1**
6	**0.97**	**0.14**	**1**
6	**0.75**	**0.14**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	0.18	0.16	0
7	0.26	0.19	0
7	0.28	0.18	0
7	-0.04	0.17	0
7	-0.02	0.17	0
7	0.04	0.16	0
7	0.11	0.17	0
7	0.19	0.19	0
7	0.23	0.17	0
7	-0.06	0.16	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	-0.06	0.14	0
8	-0.05	0.15	0
8	-0.11	0.14	0
8	0.06	0.16	0
8	0.13	0.18	0
8	0.07	0.23	0
8	0.00	0.20	0
8	0.11	0.13	0
8	0.06	0.13	0
8	0.07	0.13	0

Tabla 37 Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 6 con muestras sin pretratar. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento MSC y el grupo corte 6, el modelo PLS-DA (figura 45) resulta aceptable con un R^2 = 0.832, aunque inferior al obtenido con muestras sin pretratamiento. Superponiéndose un valor previsto por el modelo y el real. Resultados muy parecidos a los obtenidos con las muestras sin pretratar del mismo grupo.

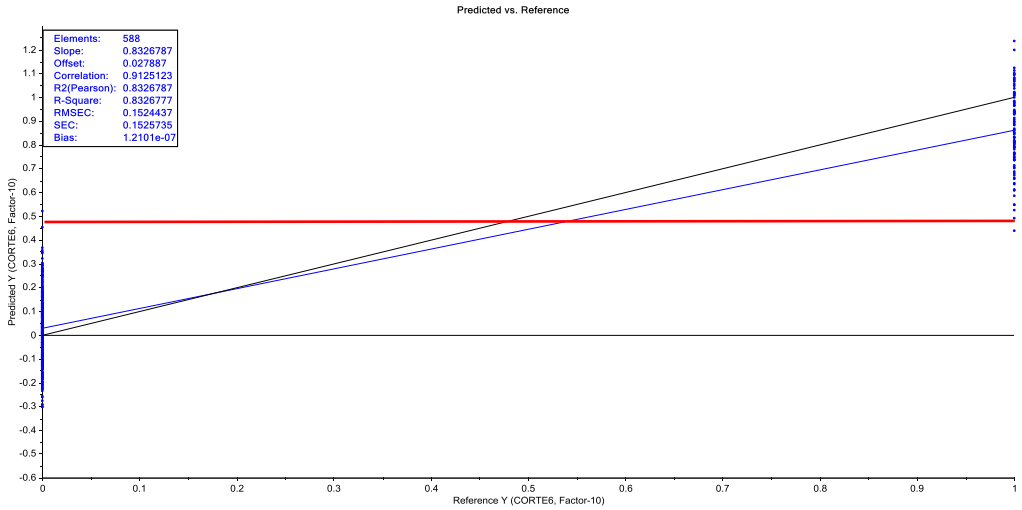


Figura 45. Resultado PLS-DA corte 6 con muestras pretratadas MSC

En validación externa (figura 46 y tabla 38), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras con pretratamiento MSC del corte 6. Como en el modelo anterior, el 100 % de las muestras se clasifican en su grupo, pero la desviación en una muestra es elevada y puede hacer que no se clasifique correctamente (tabla 38), aunque el resultado es mejor que el obtenido en las muestras sin pretratar.

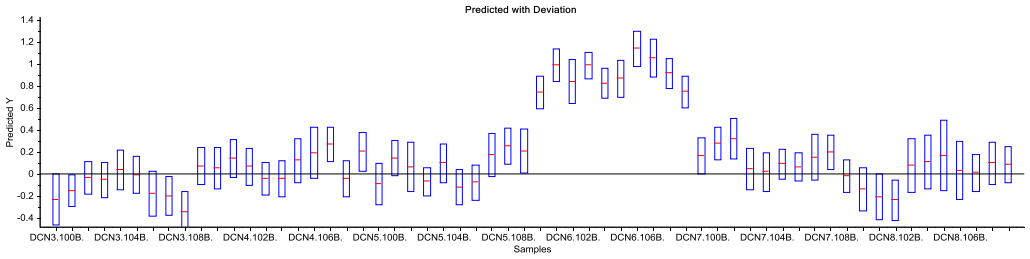


Figura 46. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 6 con muestras pretratadas MSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.23	0.23	0
3	-0.15	0.15	0
3	-0.04	0.15	0
3	-0.05	0.16	0
3	0.04	0.18	0
3	-0.01	0.17	0
3	-0.18	0.21	0
3	-0.20	0.18	0
3	-0.34	0.19	0
3	0.07	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.05	0.19	0
4	0.14	0.17	0
4	0.07	0.16	0
4	-0.04	0.15	0
4	-0.04	0.16	0
4	0.12	0.20	0
4	0.19	0.23	0
4	0.27	0.16	0
4	-0.04	0.17	0
4	0.20	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	-0.09	0.18	0
5	0.14	0.16	0
5	0.06	0.22	0
5	-0.07	0.13	0
5	0.10	0.18	0
5	-0.12	0.16	0
5	-0.08	0.16	0
5	0.17	0.19	0
5	0.25	0.16	0
5	0.21	0.20	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	**0.74**	**0.15**	**1**
6	**0.99**	**0.15**	**1**
6	**0.84**	**0.20**	**1**
6	**0.99**	**0.12**	**1**
6	**0.82**	**0.14**	**1**
6	**0.87**	**0.17**	**1**
6	**1.14**	**0.16**	**1**
6	**1.05**	**0.17**	**1**
6	**0.91**	**0.14**	**1**
6	**0.75**	**0.14**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	0.17	0.16	0
7	0.28	0.14	0
7	0.32	0.19	0
7	0.05	0.19	0
7	0.02	0.18	0
7	0.09	0.13	0
7	0.06	0.13	0
7	0.15	0.21	0
7	0.20	0.16	0
7	-0.02	0.15	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	-0.14	0.20	0
8	-0.21	0.21	0
8	-0.24	0.18	0
8	0.08	0.25	0
8	0.11	0.24	0
8	0.17	0.32	0
8	0.03	0.26	0
8	0.01	0.17	0
8	0.10	0.19	0
8	0.09	0.16	0

Tabla 38 Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 6 con muestras de pretratamiento MSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento EMSC y el grupo corte 6, el modelo PLS-DA (figura 47) resulta aceptable con un R^2 = 0.842, aunque inferior al obtenido con muestras sin pretratamiento, sí resulta superior al tratamiento MSC. Y al igual que ocurría anteriormente, superponiéndose valores previsto por el modelo y el real.

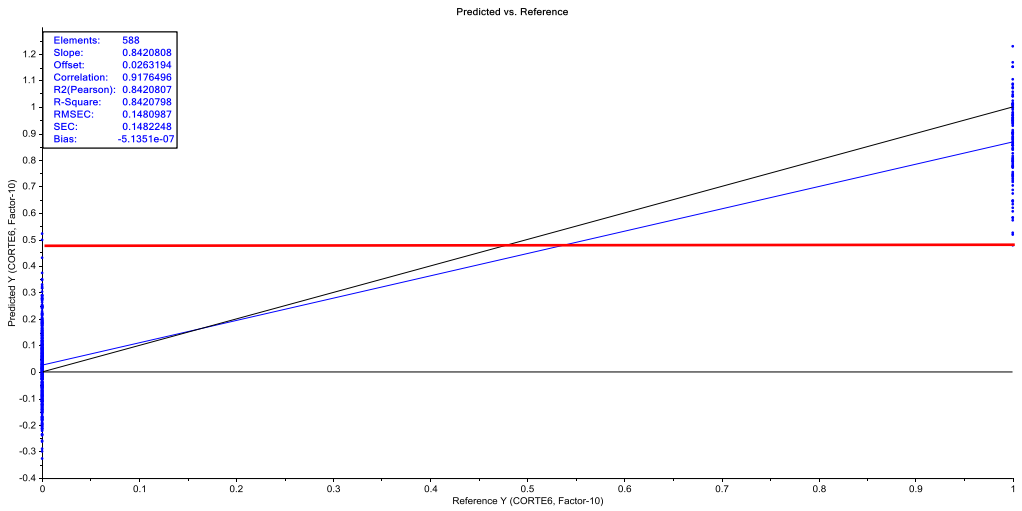


Figura 47. Resultado PLS-DA corte 6 con muestras pretratadas EMSC

En validación externa (figura 48 y tabla 39), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras con pretratamiento EMSC del corte 6. Como en los dos casos anteriores, se clasifican correctamente todas las muestras (tabla 38), aunque los resultados obtenidos en las muestras sin pretratar y con tratamiento MSC son inferiores a los obtenidos con el tratamiento EMSC.

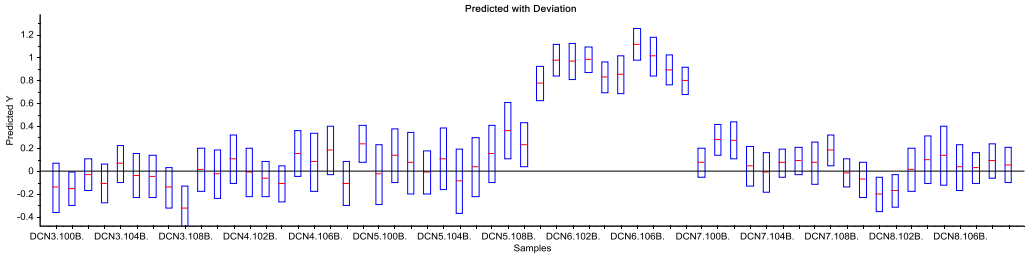


Figura 48. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 6 con muestras pretratadas EMSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.15	0.22	0
3	-0.16	0.15	0
3	-0.03	0.14	0
3	-0.11	0.17	0
3	0.06	0.16	0
3	-0.04	0.19	0
3	-0.05	0.19	0
3	-0.14	0.18	0
3	-0.33	0.20	0
3	0.01	0.19	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	-0.03	0.21	0
4	0.11	0.22	0
4	-0.01	0.21	0
4	-0.07	0.16	0
4	-0.11	0.16	0
4	0.16	0.20	0
4	0.08	0.26	0
4	0.18	0.21	0
4	-0.11	0.19	0
4	0.24	0.16	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	-0.03	0.26	0
5	0.14	0.24	0
5	0.07	0.27	0
5	-0.01	0.19	0
5	0.11	0.27	0
5	-0.09	0.28	0
5	0.04	0.26	0
5	0.15	0.25	0
5	0.36	0.25	0
5	0.23	0.20	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	**0.77**	**0.15**	**1**
6	**0.98**	**0.14**	**1**
6	**0.97**	**0.16**	**1**
6	**0.98**	**0.12**	**1**
6	**0.82**	**0.14**	**1**
6	**0.85**	**0.16**	**1**
6	**1.12**	**0.14**	**1**
6	**1.01**	**0.17**	**1**
6	**0.89**	**0.13**	**1**
6	**0.80**	**0.12**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	0.07	0.13	0
7	0.28	0.14	0
7	0.27	0.16	0
7	0.04	0.18	0
7	-0.01	0.17	0
7	0.07	0.12	0
7	0.09	0.12	0
7	0.07	0.19	0
7	0.18	0.14	0
7	-0.02	0.13	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	-0.07	0.15	0
8	-0.21	0.15	0
8	-0.17	0.14	0
8	0.01	0.19	0
8	0.10	0.21	0
8	0.13	0.26	0
8	0.03	0.20	0
8	0.03	0.13	0
8	0.09	0.15	0
8	0.06	0.15	0

Tabla 39. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 6 y muestras con pretratamiento EMSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras sin pretratamiento del grupo corte 7, el modelo PLS-DA (figura 49) resulta aceptable con un $R^2 = 0.845$. Sólo se superpone un valor previsto por el modelo y el real.

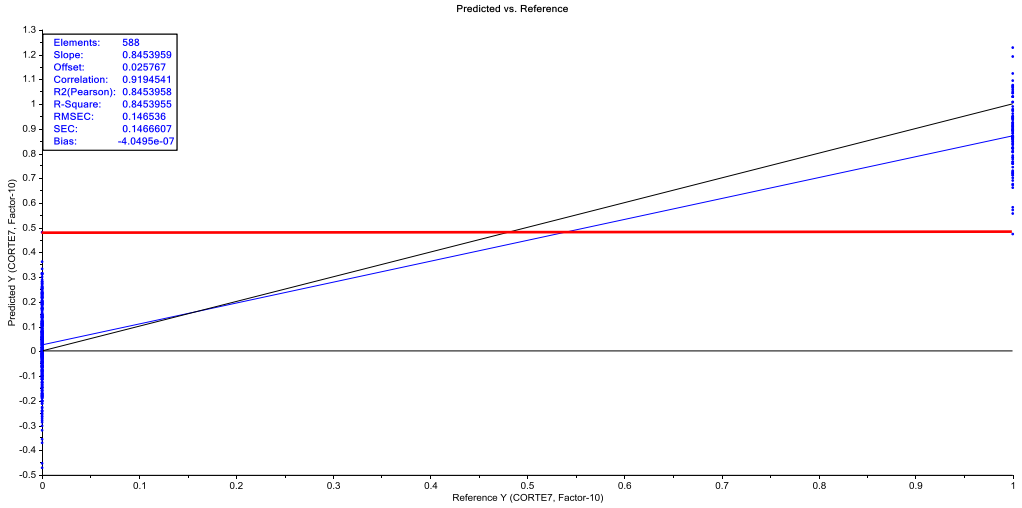


Figura 49. Resultado PLS-DA corte 7 con muestras sin pretratar

En validación externa (figura 50 y tabla 40), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras sin pretratamiento del corte 7. El 100 % de las muestras son correctamente clasificadas en su grupo (tabla 40), pudiendo ser considerado un buen dato.

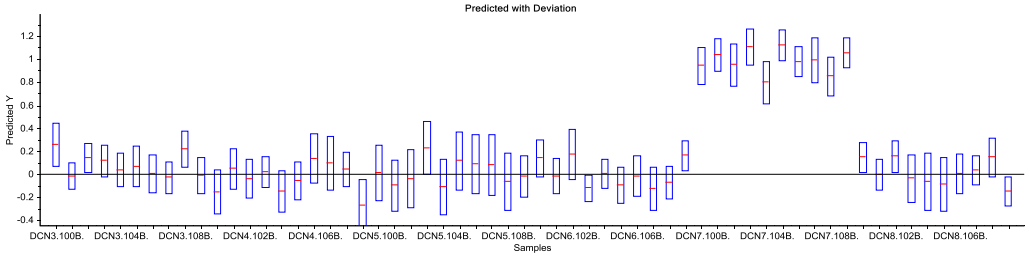


Figura 50. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 7 con muestras sin pretratar

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	0.26	0.19	0
3	-0.02	0.11	0
3	0.14	0.12	0
3	0.11	0.14	0
3	0.03	0.15	0
3	0.07	0.18	0
3	0.00	0.17	0
3	-0.03	0.14	0
3	0.22	0.16	0
3	-0.01	0.16	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	-0.16	0.19	0
4	0.05	0.18	0
4	-0.04	0.17	0
4	0.02	0.13	0
4	-0.15	0.18	0
4	-0.06	0.17	0
4	0.14	0.21	0
4	0.09	0.24	0
4	0.04	0.15	0
4	-0.27	0.22	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.01	0.24	0
5	-0.10	0.22	0
5	-0.04	0.25	0
5	0.23	0.23	0
5	-0.11	0.24	0
5	0.11	0.25	0
5	0.09	0.26	0
5	0.08	0.26	0
5	-0.07	0.25	0
5	-0.02	0.18	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.14	0.16	0
6	-0.02	0.15	0
6	0.17	0.22	0
6	-0.12	0.11	0
6	0.00	0.13	0
6	-0.10	0.16	0
6	-0.02	0.18	0
6	-0.13	0.19	0
6	-0.08	0.14	0
6	0.16	0.13	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	**0.94**	**0.16**	**1**
7	**1.04**	**0.14**	**1**
7	**0.95**	**0.19**	**1**
7	**1.11**	**0.16**	**1**
7	**0.80**	**0.18**	**1**
7	**1.12**	**0.14**	**1**
7	**0.98**	**0.13**	**1**
7	**0.99**	**0.20**	**1**
7	**0.85**	**0.17**	**1**
7	**1.06**	**0.13**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.14	0.13	0
8	0.00	0.13	0
8	0.15	0.14	0
8	-0.04	0.21	0
8	-0.07	0.25	0
8	-0.09	0.23	0
8	0.00	0.17	0
8	0.03	0.13	0
8	0.14	0.17	0
8	-0.15	0.13	0

Tabla 40. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 7 con muestras sin pretratar. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento MSC y el grupo corte 7, el modelo PLS-DA (figura 51) resulta aceptable con un R^2 = 0.871, superior al obtenido con muestras sin pretratamiento. Además, no se superpone ningún valor previsto por el modelo y el real. Resultados mejores a los obtenidos con las muestras sin pretratar del mismo grupo.

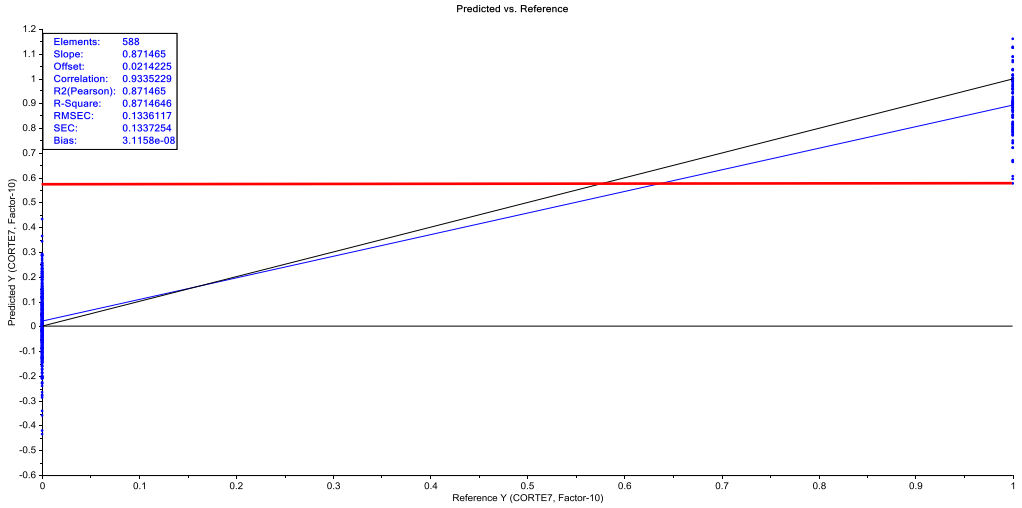


Figura 51. Resultado PLS-DA corte 7 con muestras pretratadas MSC

En validación externa (figura 52 y tabla 41), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras con pretratamiento MSC del corte 7. Igual que en el caso anterior, todas las muestras se clasifican correctamente (tabla 41), siendo incluso mejor el resultado obtenido en las muestras sin pretratar.

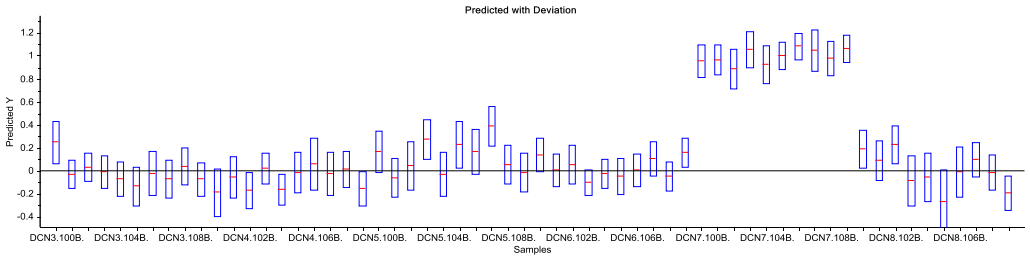


Figura 52. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 7 con muestras pretratadas MSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	0.24	0.19	0
3	-0.03	0.12	0
3	0.03	0.12	0
3	-0.01	0.14	0
3	-0.08	0.15	0
3	-0.14	0.17	0
3	-0.03	0.19	0
3	-0.08	0.16	0
3	0.03	0.16	0
3	-0.08	0.14	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	-0.19	0.21	0
4	-0.06	0.18	0
4	-0.18	0.16	0
4	0.01	0.13	0
4	-0.17	0.13	0
4	-0.02	0.18	0
4	0.05	0.23	0
4	-0.03	0.19	0
4	0.01	0.16	0
4	-0.16	0.15	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.16	0.18	0
5	-0.07	0.17	0
5	0.04	0.21	0
5	0.27	0.17	0
5	-0.03	0.19	0
5	0.22	0.20	0
5	0.16	0.20	0
5	0.38	0.18	0
5	0.05	0.17	0
5	-0.02	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.13	0.15	0
6	0.00	0.14	0
6	0.05	0.17	0
6	-0.11	0.11	0
6	-0.03	0.13	0
6	-0.05	0.16	0
6	0.00	0.14	0
6	0.10	0.15	0
6	-0.05	0.13	0
6	0.15	0.13	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	**0.95**	**0.14**	**1**
7	**0.96**	**0.13**	**1**
7	**0.88**	**0.17**	**1**
7	**1.05**	**0.16**	**1**
7	**0.92**	**0.17**	**1**
7	**1.00**	**0.12**	**1**
7	**1.08**	**0.12**	**1**
7	**1.05**	**0.18**	**1**
7	**0.97**	**0.15**	**1**
7	**1.06**	**0.12**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.19	0.17	0
8	0.08	0.17	0
8	0.22	0.16	0
8	-0.09	0.22	0
8	-0.06	0.21	0
8	-0.27	0.28	0
8	-0.01	0.22	0
8	0.09	0.15	0
8	-0.02	0.15	0
8	-0.20	0.15	0

Tabla 41. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 7 con muestras pretratadas MSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento EMSC y el grupo corte 7, el modelo PLS-DA (figura 53) resulta aceptable con un R^2 = 0.870 y superior al obtenido con muestras sin pretratamiento y con pretratamiento MSC, y, al igual que ocurría anteriormente, no se superponen valores previsto por el modelo y el real.

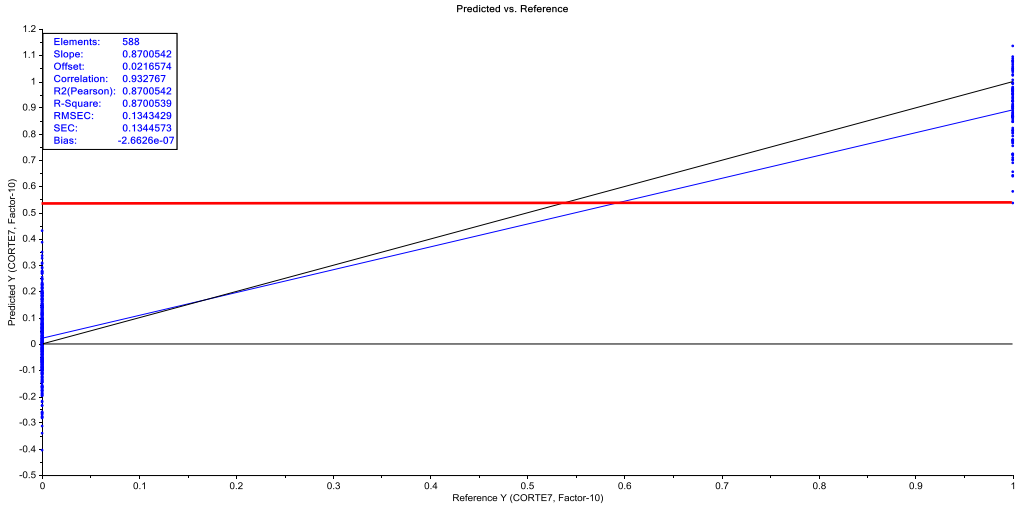


Figura 53. Resultado PLS-DA corte 7 con muestras pretratadas EMSC

En validación externa (figura 54 y tabla 42), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras con pretratamiento EMSC del corte 7. Todas las muestras han sido correctamente clasificadas (tabla 42), pero con mejor resultado que en las muestras sin pretratar y con tratamiento MSC. Por lo tanto, con el pretratamiento EMSC es con el que mejor se clasifican las muestras del corte 7.

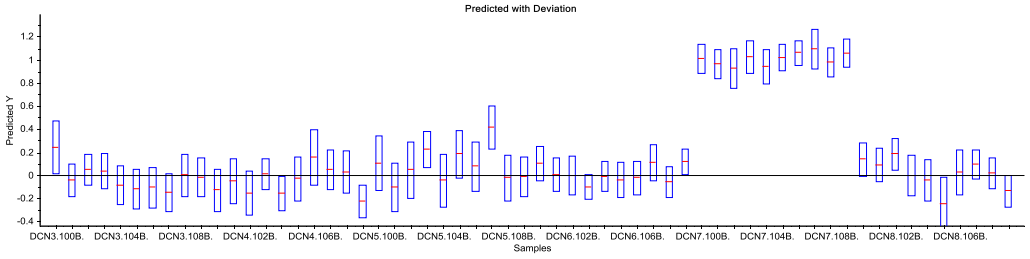


Figura 54. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 7 con muestras pretratadas EMSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	0.24	0.23	0
3	-0.04	0.14	0
3	0.05	0.14	0
3	0.03	0.15	0
3	-0.09	0.17	0
3	-0.12	0.17	0
3	-0.11	0.18	0
3	-0.15	0.17	0
3	0.00	0.18	0
3	-0.02	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	-0.13	0.18	0
4	-0.05	0.19	0
4	-0.15	0.19	0
4	0.01	0.14	0
4	-0.16	0.15	0
4	-0.03	0.19	0
4	0.16	0.24	0
4	0.05	0.17	0
4	0.03	0.18	0
4	-0.23	0.14	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.10	0.23	0
5	-0.11	0.21	0
5	0.05	0.24	0
5	0.23	0.16	0
5	-0.05	0.23	0
5	0.18	0.21	0
5	0.08	0.22	0
5	0.41	0.19	0
5	-0.02	0.20	0
5	-0.02	0.17	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.10	0.15	0
6	0.00	0.14	0
6	0.00	0.17	0
6	-0.10	0.10	0
6	-0.01	0.13	0
6	-0.04	0.15	0
6	-0.02	0.15	0
6	0.11	0.15	0
6	-0.06	0.13	0
6	0.12	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	**1.01**	**0.13**	**1**
7	**0.96**	**0.12**	**1**
7	**0.92**	**0.17**	**1**
7	**1.02**	**0.14**	**1**
7	**0.94**	**0.15**	**1**
7	**1.02**	**0.11**	**1**
7	**1.06**	**0.11**	**1**
7	**1.09**	**0.17**	**1**
7	**0.98**	**0.13**	**1**
7	**1.06**	**0.12**	**1**

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	0.14	0.15	0
8	0.09	0.14	0
8	0.18	0.14	0
8	0.00	0.17	0
8	-0.05	0.18	0
8	-0.25	0.23	0
8	0.02	0.19	0
8	0.10	0.13	0
8	0.02	0.13	0
8	-0.14	0.13	0

Tabla 42. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 7 con muestras pretratadas EMSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras sin pretratamiento y el grupo corte 8, el modelo PLS-DA (figura 55) obtiene buenos resultados, con un R^2 = 0.938, y al igual que ocurría con el corte anterior, no se superponen valores previsto por el modelo y el real.

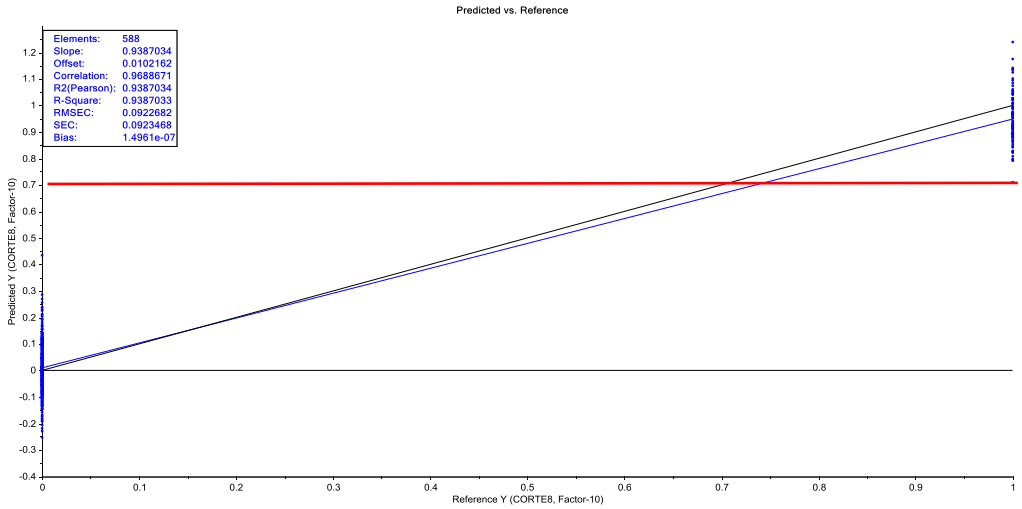


Figura 55. Resultado PLS-DA corte 8 con muestras sin pretratar

En validación externa (figura 56 y tabla 43), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras sin pretratamiento del corte 8. El total de muestras de validación externa han sido correctamente clasificadas en su grupo (tabla 43). Por lo tanto, el modelo PLS-DA es válido para clasificar las muestras sin pretratar del corte 8.

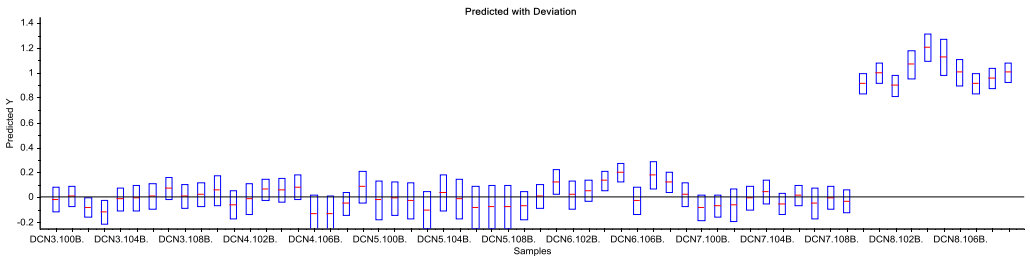


Figura 56. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 8 con muestras sin pretratar

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.02	0.10	0
3	0.00	0.08	0
3	-0.08	0.08	0
3	-0.12	0.10	0
3	-0.02	0.09	0
3	-0.01	0.10	0
3	0.01	0.10	0
3	0.07	0.09	0
3	0.00	0.10	0
3	0.02	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.05	0.12	0
4	-0.06	0.11	0
4	-0.01	0.13	0
4	0.06	0.08	0
4	0.06	0.09	0
4	0.08	0.10	0
4	-0.13	0.15	0
4	-0.13	0.14	0
4	-0.05	0.09	0
4	0.08	0.13	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	-0.02	0.16	0
5	-0.01	0.14	0
5	-0.03	0.14	0
5	-0.10	0.15	0
5	0.03	0.15	0
5	-0.02	0.16	0
5	-0.08	0.17	0
5	-0.08	0.17	0
5	-0.08	0.18	0
5	-0.07	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.01	0.10	0
6	0.12	0.10	0
6	0.02	0.12	0
6	0.05	0.09	0
6	0.13	0.08	0
6	0.20	0.07	0
6	-0.03	0.11	0
6	0.18	0.11	0
6	0.12	0.08	0
6	0.02	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.09	0.10	0
7	-0.07	0.09	0
7	-0.06	0.13	0
7	-0.01	0.10	0
7	0.04	0.10	0
7	-0.05	0.09	0
7	0.01	0.08	0
7	-0.05	0.12	0
7	0.00	0.10	0
7	-0.03	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	**0.91**	**0.08**	**1**
8	**1.00**	**0.08**	**1**
8	**0.90**	**0.09**	**1**
8	**1.07**	**0.11**	**1**
8	**1.21**	**0.11**	**1**
8	**1.13**	**0.15**	**1**
8	**1.00**	**0.11**	**1**
8	**0.91**	**0.08**	**1**
8	**0.95**	**0.08**	**1**
8	**1.00**	**0.08**	**1**

Tabla 43. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 8 con muestras sin pretratamiento. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento MSC del grupo corte 8, el modelo PLS-DA (figura 57) obtiene mejores resultados que con las muestras sin pretratamiento, con un R^2 = 0.951. Además, sigue sin superponerse valores previstos por el modelo y el real.

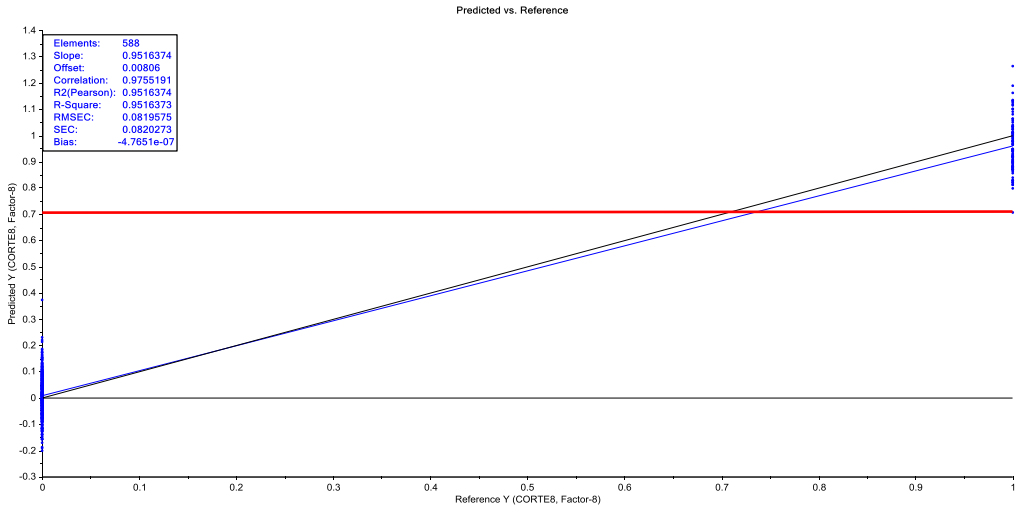


Figura 57. Resultado PLS-DA corte 8 con muestras pretratadas MSC

En validación externa (figura 58 y tabla 44), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras sin pretratamiento del corte 8 con pretratamiento MSC. Como en el caso anterior, las muestras se clasifican correctamente (tabla 43). Por lo tanto, el modelo PLS-DA con muestras pretratadas MSC tiene la misma validez que el modelo con muestras sin pretratar.

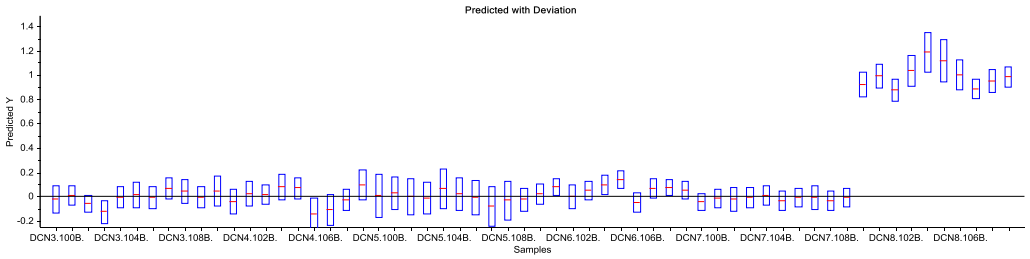


Figura 58. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 8 con muestras pretratadas MSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.02	0.11	0
3	0.01	0.08	0
3	-0.06	0.07	0
3	-0.13	0.09	0
3	-0.01	0.08	0
3	0.01	0.11	0
3	-0.01	0.09	0
3	0.07	0.09	0
3	0.04	0.10	0
3	-0.01	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	0.04	0.12	0
4	-0.04	0.10	0
4	0.02	0.10	0
4	0.01	0.08	0
4	0.08	0.11	0
4	0.07	0.08	0
4	-0.14	0.14	0
4	-0.11	0.12	0
4	-0.03	0.09	0
4	0.09	0.12	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.01	0.18	0
5	0.03	0.13	0
5	0.00	0.15	0
5	-0.01	0.13	0
5	0.06	0.16	0
5	0.02	0.13	0
5	-0.01	0.14	0
5	-0.08	0.16	0
5	-0.03	0.16	0
5	-0.02	0.09	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.02	0.09	0
6	0.08	0.07	0
6	0.00	0.10	0
6	0.05	0.07	0
6	0.09	0.08	0
6	0.14	0.07	0
6	-0.05	0.08	0
6	0.07	0.08	0
6	0.07	0.06	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.05	0.07	0
7	-0.02	0.08	0
7	-0.03	0.10	0
7	-0.01	0.08	0
7	0.01	0.08	0
7	-0.04	0.08	0
7	-0.01	0.08	0
7	-0.01	0.10	0
7	-0.03	0.08	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	**0.92**	**0.10**	**1**
8	**0.99**	**0.10**	**1**
8	**0.88**	**0.09**	**1**
8	**1.03**	**0.13**	**1**
8	**1.19**	**0.16**	**1**
8	**1.12**	**0.17**	**1**
8	**1.00**	**0.13**	**1**
8	**0.89**	**0.08**	**1**
8	**0.95**	**0.09**	**1**

Tabla 44. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 8 con muestras pretratadas MSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Para las muestras con pretratamiento EMSC del grupo corte 8, el modelo PLS-DA (figura 59) obtiene mejores resultados que con las muestras sin pretratamiento, pero inferior al pretratamiento MSC, con un R^2 = 0.939. Además, sigue sin superponerse valores previstos por el modelo y los reales

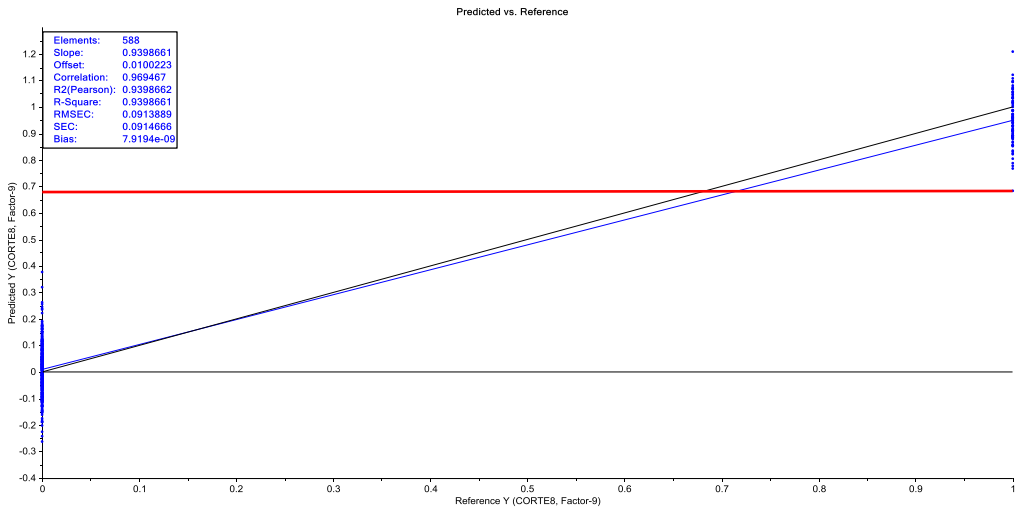


Figura 59. Resultado PLS-DA corte 8 con muestras pretratadas EMSC

En validación externa (figura 60 y tabla 45), este modelo tiene un buen comportamiento en la clasificación de las 10 muestras sin pretratamiento del corte 8 con pretratamiento EMSC. Como en los dos casos anteriores, las muestras se agrupan correctamente (tabla 45). Por lo tanto, el modelo PLS-DA con muestras pretratadas EMSC es peor que con muestras pretratadas MSC, pero sigue siendo válido para clasificar las muestras del corte 8.

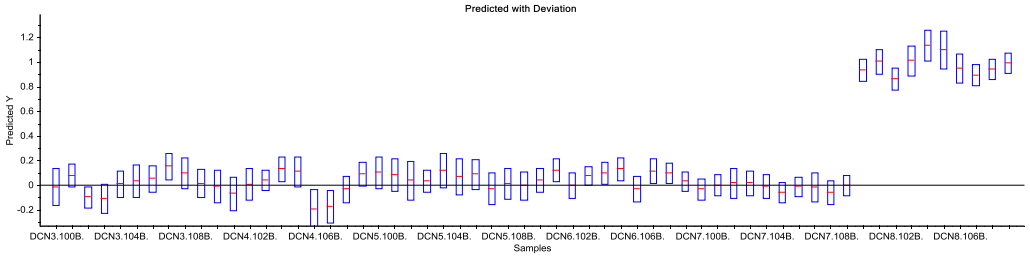


Figura 60. Representación gráfico de la validación externa para el PLS-DA del corte 8 con muestras pretratadas EMSC

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
3	-0.01	0.15	0
3	0.08	0.09	0
3	-0.10	0.09	0
3	-0.11	0.12	0
3	0.01	0.11	0
3	0.03	0.13	0
3	0.05	0.11	0
3	0.15	0.11	0
3	0.10	0.13	0
3	0.01	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
4	-0.01	0.13	0
4	-0.07	0.14	0
4	0.01	0.13	0
4	0.04	0.08	0
4	0.13	0.10	0
4	0.11	0.12	0
4	-0.20	0.17	0
4	-0.17	0.13	0
4	-0.03	0.11	0
4	0.09	0.10	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
5	0.10	0.13	0
5	0.09	0.13	0
5	0.04	0.15	0
5	0.03	0.09	0
5	0.12	0.14	0
5	0.07	0.14	0
5	0.09	0.12	0
5	-0.03	0.13	0
5	0.01	0.12	0
5	0.00	0.11	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
6	0.04	0.10	0
6	0.12	0.09	0
6	0.00	0.10	0
6	0.08	0.07	0
6	0.10	0.09	0
6	0.13	0.09	0
6	-0.03	0.10	0
6	0.12	0.10	0
6	0.10	0.08	0
6	0.03	0.08	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
7	-0.03	0.08	0
7	0.00	0.09	0
7	0.02	0.12	0
7	0.02	0.10	0
7	-0.01	0.10	0
7	-0.06	0.08	0
7	-0.01	0.08	0
7	-0.02	0.12	0
7	-0.06	0.09	0
7	0.00	0.08	0

Corte	Previsto	Desviación	Referencia
8	**0.93**	**0.09**	**1**
8	**1.00**	**0.10**	**1**
8	**0.86**	**0.09**	**1**
8	**1.01**	**0.12**	**1**
8	**1.14**	**0.13**	**1**
8	**1.10**	**0.15**	**1**
8	**0.95**	**0.12**	**1**
8	**0.89**	**0.09**	**1**
8	**0.94**	**0.08**	**1**
8	**0.99**	**0.08**	**1**

Tabla 45. Resultados de la validación externa del PLS-DA del corte 8 con muestras pretratadas EMSC. Referencia 1 = pertenencia al grupo; Referencia 0 = excluido del grupo

Los párrafos siguientes son un resumen de los resultados obtenidos con los modelos supervisados y su correspondiente discusión.

Con muestras sin pretratar se ha conseguido mejor resultado en el modelo del corte 6. Con muestras pretratadas MSC se obtienen las mejores R^2 en los modelos de los cortes 4, 7 y 8. En el resto de modelos PLS-DA, cortes 3 y 5, los mejores resultados se alcanzan con las muestras pretratadas con EMSC.

Comparando los resultados obtenidos en este capítulo, en validación cruzada Young *et al*. (2011) obtuvieron una correlación de 0.83% utilizando este mismo modelo para diferenciar muestras de *Scrophulariae radix* en función de su origen geográfico y con muestras pretratadas con MSC. Ivorra *et al.* (2013) alcanzaron un R^2 de 0.82 % en la clasificación de muestras de salmón envasado caducado y no caducado. Éstos resultados hay que considerarlos buenos teniendo en cuenta que son modelos más sencillos que los expuéstos en el capítulo, existiendo dificultades en la diferenciación vegetativa entre los distintos cortes por haber pocas diferencias en las estructuras que componen el triticale.

En cualquier caso, la corrección del ruido espectral mediante MSC/EMSC proporciona una mayor seguridad en los resultados de clasificación mediante PLS-DA. Ello es así no tanto por el valor final asignado a una muestra, 0 ó 1 en función de la pertenencia, sino como por la disminución de la incertidumbre estadística en el valor proporcionado.

Si se compara el modelo PLS-DA con el SIMCA se comprueba que con el primero se obtienen mejores resultados. En el mismo sentido se pronuncian Galtier *et al.* (2011), quienes comprobaron que la clasificación mediante PLS-DA era mejor que la clasificación SIMCA para diferenciar aceites de oliva virgen, con un 100% de buenos resultados con la clasificación PLS-DA, al contrario que con el SIMCA que no obtuvo buenos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

AMIGO J.M., MARTÍ I. Y GOWEN A. (2013) Hyperspectral Imaging and Chemometrics: A Perfect Combination for the Analysis of Food Structure, Composition and Quality. In Federico Marini, editor: Data Handling in Science and Technology, Vol. 28, Amsterdam: The Netherlands, 2013, pp. 343-370

BERTRAND D. Y DUFOUR E. (2000) La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Paris, Francia. Ediciones TEC & DOC.

BJORSVIK H. Y MARTENS H. (2008) Data analysis: calibration of NIR instruments by PLS regression. En: D.A. Burns and E.W. (eds) Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd Ed). Ciurczak. CRC Press, Boca Raton, U.S.A.

BLASHFIELD Y ROGER K.(1976) Mixture model tests of cluster analysis: Accuracy of four agglomerative hierarchical methods. Blashfield, Roger K. Psychological Bulletin, 83(3), May 1976, 377-388

BRERETON R. (2009) Chemometrics for pattern recognition. John Willey & Sons, Ltd. Chichester, Inglaterra.

CAMO (2013). The Unscrambler methods. Camo Software AS. Oslo, Norway

CAMPO L., CASTRO P. Y MORENO J. (2007) Calibración NIRS para estimar la digestibilidad de la materia orgánica de la planta entera de maíz en híbridos Seleccionados para forraje. En: Neiker (ed) Los sistemas forrajeros: entre la producción y el paisaje, pp. 461-467. Vitoria-Gasteiz, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP).

CEBECI D., KWOK K., WANG P., TAYLOR L. Y BEN-AMOTZ D. (2013) Rapid classification of pharmaceutical ingredients with Raman spectroscopy using compressive detection strategy with PLS-DA multivariate filters. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 80, 63-68.

CHE-MA Y., SYAHARIZA Z., MIRGHANI M., JINAP S. Y BAKAR J. (2005) Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Food Chemistry, 90, 815−819.

CHING-CHING L., CHI-ON CHAN, FOO-TIM CHAU Y KAM-WAH MOK (2009), Rapid analysis of Radix puerariae by near-infrared spectroscopy. Journal of Chromatography, 1216, 2130–22135.

CHI-ON CHAN, CHING-CHING CHU, KAM-WAH MOK Y FOO-TIM CHAU (2007) Analysis of berberine and total alkaloid content in Cortex Phellodendri by near infrared spectroscopy (NIRs) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection, Analytica Chimica Acta, 592, 121–131.

COCCHI M., CORBELLINI M., FOCA G., LUCISANO M., PAGANI M.A., TASSI L. Y ULRICI A. (2005) Classification of bread wheat flours in different quality categories by a wavelet-based freature selection/classification algorithm on NIR spectra. Analytica Chimica Acta, 544 (1-2), 100-107.

COLLADO A. (2012) Aplicación de la técnica NIRs al estudio del balance nutritivo de ovejas en pastoreo: Estudio de las heces. Trabajo fin de Máster. Universidad de Extremadura.

DOWNEY G. (1996) Authentication of food and food ingredients by near infrared spectroscopy. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 4, 47-61.

DOWNEY G. (1999) Near Infrared Spectroscopy in the food industry: a tool for quality management. Dublín. Irlanda: Teagasc.The National Food Centre, 14.

EDELMANN A., DIEWOCK J., SCHUSTER K.C. Y LENDL B. (2001) Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1139−1145.

FERREIRA L. Y HITCHCOK D. (2009) Comparison of Hierarchical Methods for Clustering Functional Data. Communications in Statistics-Simulation and Computation, 38 (9).

GALLARDO T., OSORIO G., ZUÑIGA DE LOA M. Y RIVERA Y. (2009) Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. Food Research International, 42(3), 313−318.

GALTIER O., DUPUY N., LE DREAU Y., OLLIVER D., PINATEL C., KISTE J. Y ARTAUD J. (2007) Geographic origins and compositions of virgin olive oils determinated by chemometric analysis of NIR spectra. Analytica Chimica Acta, 595 (1-2), 136-144.

GALTIER O., ABBAS O., LE DRÉAU Y., REBUFA C., KISTER J., ARTAUD J. Y DUPUY N. (2011) Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions. Vibrational Spectroscopy, 55, 132-140.

GARCÍA B., LEÓN L. Y GARCÍA A. (1977) Determinación directa de proteína, NDF, ADF, lignina, DNDF y DMD en plantas herbáceas mediante reflectancia de infrarrojos. Pastos, 7, 112-126.

GARCÍA B., LEÓN L. Y GARCÍA A. (1978) Análisis y evaluación automática de forrajes por espectroscopía (R. I.). Longitudes de onda óptimas. Pastos, 8, 311-323.

GARRIDO A., GARCÍA-OLMO J. Y DE PEDRO E. (2000) Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRs). Una metodología para implementar en sistemas de aseguramiento de la calidad y trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. Sólo Cerdo Ibérico, 4, 39-44.

GIL A., LLERA F., GARCÍA A. Y RUFO S. (2009) Nuevas oportunidades de alimentación en la dehesa: el triticale. La agricultura y la ganadería extremeñas, informe 2008. pp 173-189.

GÓMEZ F., DORANTES L., GALLARDO T., OSORIO-REVILLA G., CALDERÓN G., MARTÍNEZ P. Y DE LA ROSA J.L. (2012) Determination of Trichinella spiralis in pig muscles using Mid-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (MID-FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA). Meat Science, 91.

HASSOUN P. Y BOCQUIER F. (2010) Alimentación del ganado ovino. En: Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Tablas INRA 2007. Acribia, Zaragoza.

HOLLAND J., KEMSLEY E. Y WILSON R. (1998) Use of FTIR spectroscopy and partial least squares regression for the detection of adulteration of strawberry purees. Journal of Science of Food and Agriculture, 76, 263−269.

INDAHL U. SAHNI N. KIRKHUS B. Y NAEST T. (1999) Multivariate strategies for classification based on NIR spectra, with application to mayonnaise. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 49, 19-31.

INDICO PRO (2013) Analytical Spectral Devices, Inc., dba ASD

ISAKSSON T. Y NAES T. (1988) The effect of Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy. Appl. Spectroscopy, 42 (7), 1273-1284.

IVORRA E., GIRON J., SANCHEZ A., VERDU S., BARAT J.M., GRAU R. (2013) Detection of expired vacuum-packed smoked salmon based on PLS-DA method using hyperspectral images. Journal of Food Engineering, 117, 342-349.

KRAMER K. Y EBEL S. (2000) Application of NIR reflectance spectroscopy for the identification of pharmaceutical excipients. Analytica Chimica Acta, 420, 155-161.

LAI Y., KEMSLEY W. Y WILSON R.H. (1995) Quantitative analysis of potential adulterants of extra virgin olive oil using infrared spectroscopy. Food Chemistry, 53, 95−98.

MARCOS I., PÉREZ J., FERNÁNDEZ E., GARCÍA C. Y MORENO B. (2002) Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 945, 281−286.

MARÍN, J.J. (2008) Los análisis cluster de tipo jerárquico y los dendrogramas. Una visión para la triangulación metodológica en los estudios comparativos regionales en América Latina. En Cairo Heriberto y de Sierra Gerónimo (compiladores). En: Alma Mater (Ed) América Latina, Una y diversa: Teorías y métodos para su análisis. San José, Costa Rica.

MARK H. (1992) Qualitative Discriminant Analysis. En: Donald A. Burns y Emil W. Ciurczak. Marcel Dekker, Inc (Eds) Handbook of Near Infrared Analysis. pp.329-363. Nueva York.

MARK H. (2008) Data analysis: calibration of NIR instruments by PLS regression. En: D.A. Burns and E.W. (eds) Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd Ed). Ciurczak. CRC Press, Boca Raton, U.S.A.

MARTENS H. Y NAES, T. (1989) Multivariate calibration. John Wiley and Sons Inc., Chichester, UK.

MARTENS H. Y STARK (1991) Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for NRs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 9 (8), 625-635.

MEZA M.O., GALLARDO T. Y OSORIO G. (2010) Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. Meat Science, 86.

MEZA M.O., GALLARDO T. DORANTES A.L., OSORIO R. Y DE LA ROSA J. (2011) FT-MIR and Raman spectroscopy coupled to multivariate analysis for the detection of clembuterol in murine model. Analyst, 136, 3355–3365.

NAES T., ISAKSSON T., FEARN T. Y DAVIES T. (2002) A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK.

NOTICIA M., STEVENS A., NOON C. Y WESEMAEL B. (2013) Prediction of soil organic carbon for different levels of soil moisture using Vis-NIR spectroscopy. Geoderma, 199, 37-42.

OOTAKE Y. Y KOKOT S. (1998) Discrimination between glutinous and non-glutinous rice by vibrational spectroscopy. II Effects of spectral pre-treatment on the classification of the two types of rice. J Near Infrared Spectrosc, 6, 251–258.

OTTESTAD S., ISAKSSON T., SAEYS W. Y WOLD J. (2010) Scattering correction by use of a priori information. Applied spectroscopy, 64 (7), 795-804.

OZAKI Y., MCCLURE W. Y CHRISTY A. (2007) Near-Infrared spectroscopy in food science and technology. Wiley-Interscience, A Jhon Wiley & Sons, Inc., Publication.

O'REAGAIN P.J. Y MC MENIMAN N.P. (2002) Nutrition of sheep under rangeland conditions. En: Sheep Nutrition. Ed. M. Freer and H. Dove. CABI Pub, Wallingford, United Kingdom.

REAL DECRETO 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueba los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias.

RODRÍGUEZ P. (2009) Evaluación de la calidad en el cerdo ibérico: uso de la técnica NIRs. Jornadas Técnicas en Espectroscopía y Ciencia Sensorial. Bonsai Technologies, Madrid.

SAID M., GIBBONS S., MOFFAT A. Y ZLOH M. (2011) Near infrared spectroscopy (NIRs) and chemometric analysis of Malaysian and UK paracetamol tablets: a spectral database study. International Journal of Pharmaceutics, 415, 102-109.

SHARAF M.A., ILLMAN D. Y KOWALSKI B.R. (1986) Chemometrics (Volume 82 in ChemicalAnalysis: ASeries of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications), JohnWiley & Sons, New York.

SOKAL R.R. Y SNEATH P.H.A. (1963) Principles of Numerical Taxonomy W.H.Freeman & Co.

SYAHARIZA Z.A., CHE-MAN Y.B., SELAMAT J. Y BAKAR J. (2005) Detection of lard adulteration in cake formulation by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Food Chemistry, 92(2), 365−371.

TAPP H.S., DEFERNEZ M. Y KEMSLEY E.K. (2003) FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographic origin of extra virgin olive oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(21), 6110−6115.

TEJERINA D., LOPEZ-PARRA M.M., GARCIA-TORRES S. (2009) Potential used of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat physico-chemical composition of guinea fowl (Numida meleagris) reared under different production systems. Food Chemistry, 113, 1290-1296.

TSENKOVA R. Y ATANASSOVA S. (2002) Mastitis diagnostics by near infrared spectra of cow's milk, blood and urine using soft independent modelling of class analogy classification. Davies A. y Cho R.K. (eds) NIR Publications. En: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings 10th International Conference, pp 123–128. Chichester, UK.

TURZA S., TOTH A. Y VARADI M. (1998) Multivariate classification of different soyabean varieties. J Near Infrared Spectrosc 6, 183–187.

UNDERSANDER D., MERTENS D. Y THIEX N. (1993) Forage analysis procedure. National Forage Testing Association, Omaha, U.S.A.

VERAS G., ARUJO A., CAMILO A., BIZERRA A., ALVES P. Y PAULO E. (2010) Classification of biodiesel using NIR spectrometry and multivariate techniques. Talanta 83, 565-568.

XIAOFANG L., YU. XIANG, WU. XIAOMING, YIYU CHENG Y QU. HAIBIN (2008) Rapid determination of Paeoniae Radix using near infrared spectroscopy, Microchemical Journal, 90, 8–12.

YOUNG D, SEUNG HYUN KIM, YOUNG CHOONG KIM, HYO JIN KIM, SANG HYUN SUNG (2011) Discrimination of Scrophulariae Radix according to geographical origin and determination of active constituents by near infrared spectroscopy (NIRs). Microchemical Journal, 99, 213-217.

ZADOKS J.C., CHANG T.T. Y KONZAK C.F. (1974)
A decimal code for the growth stages of cereals.
Weed Research, 14, 415-421.

6. Conclusiones

En las condiciones experimentales descritas y una vez realizado el estudio de los datos según los criterios iniciales, se puede concluir:

CAPÍTULO I

Campaña (efecto del ambiente)

Tanto la precipitación como la temperatura afectaron de manera significativa al contenido de proteína. A menor cantidad de agua y temperatura mayor contenido de proteína en el forraje de triticale.

La mayor temperatura media de la campaña 2009/2010 afectó al contenido de FB, FND, FAD y LAD aumentando sus valores significativamente respecto a la campaña 2010/2011.

Densidad de siembra

La densidad de siembra afectó a la FB y lo hizo aumentando su valor a medida que ésta aumentaba.

El resto de las variables estudiadas (PB, FND, FAD, LAD y VRF) no se vieron afectadas significativamente por la densidad de plantas.

Número de Aprovechamientos

El número de aprovechamientos ejerció una influencia altamente significativa sobre la PB, disminuyendo su valor al pasar del primer (21.05 %) al segundo (16.02 %) aprovechamiento.

También tuvo una influencia altamente significativa sobre la FB, aumentando su valor cuando se pasó del primer (23.87 %) al segundo (27.21 %) aprovechamiento.

No parece ejercer una influencia clara sobre los contenidos de FND, FAD y LAD, aunque existe una tendencia a disminuir el valor de la FND y FAD y aumentar el valor de la LAD al pasar del primer al segundo aprovechamiento.

El VRF aumenta, ligera y significativamente, en el segundo aprovechamiento (123.30) frente al primero (119.20).

Dosis de Nitrógeno

La dosis de nitrógeno influyó positivamente en el contenido de PB, ya que al aumentar la dosis de nitrógeno se produce un aumento significativo de la PB.

El contenido de FB no se ve influido significativamente por la dosis de nitrógeno.

La dosis de nitrógeno no tiene una influencia clara sobre la FND y FAD, aunque en alguna campaña se observaron ligeros aumentos al aumentar la dosis de nitrógeno. En la LAD no se observa ninguna influencia significativa atribuible a la dosis de nitrógeno.

Como consecuencia del aumento de los contenidos de la FND y FAD, el VRF disminuye al aumentar la dosis de nitrógeno.

Conclusión final del capítulo I

Los años lluviosos y con altas temperaturas ocasionan una disminución del contenido de proteína y un aumento de la fibra del forraje de triticale. Independientemente de la densidad de siembra utilizada, con un solo aprovechamiento y con una dosis de nitrógeno moderada (75 kg N ha^{-1}) se puede obtener una buena calidad de forraje de triticale. Con esta combinación el forraje obtenido es de 1ª calidad en relación al contenido de proteína (18.54 %) y de 2ª calidad con respecto al valor relativo del forraje (121.25).

CAPÍTULO II

Este trabajo demuestra que la tecnología NIRS puede ser una ser usada como herramienta para la predicción del contenido de PB en el forraje de triticale cv Verato, como alternativa a los métodos tradicionales de análisis. Aunque es necesario seguir trabajando en el ajuste de las ecuaciones de predicción en posteriores estudios con muestras similares.

La calibración obtenida para FB y LAD no ha conseguido los resultados óptimos que se esperaban, aunque para FB han sido aceptables. Esto es debido a que las muestras que se han utilizado, a pesar de tener un rango aparentemente óptimo, son las correspondientes sólo a dos periodos de tiempo, los concernientes a los dos aprovechamientos animales.

Respecto a la FND y FAD si han superando el mínimo del 75% recomendado para la fiabilidad a un análisis NIRS. A pesar de ello, y como se ha comentado en el párrafo anterior, son resultados mejorables.

CAPÍTULO III

Con el análisis de componentes principales, realizado con las muestras sin pretratamiento, se ha comprobado que éstas se agrupan sólo en función de la fecha de corte, siendo la clasificación más sencilla y suficiente para lograr una separación de las muestras según el periodo vegetativo en el que se encuentren. Cuando se utilizan las muestras con pretratamiento MSC ocurre lo mismo que con las muestras sin pretratar. Con las muestras pretratadas E-MSC se diferencian dos grupos dentro de los cortes, los tres primeros (período vegetativo) de los tres últimos (periodo reproductivo).

El método *k-means* con muestras originales, MSC y E-MSC, no cumplen los requisitos para poder separar muestras de triticale según su fecha de corte. A pesar de ello, el método *k-*

means con muestras E-MSC es el que mejor agrupa las muestras según fecha de corte. Con el análisis *k-medians* y las muestras originales no se han obtenido resultados adecuados para la clasificación de los forrajes según la fecha de corte. Con las muestras pretratadas MSC y E-MSC los resultados mejoran. En cuanto al análisis *cluster*, con los diferentes métodos de agrupación y medida de distancia euclídea al cuadrado y aunque sean limitados en sus capacidades de predicción, el basado en la medida Ward con muestras E-MSC resulta ser el más adecuado.

Respecto al procedimiento de clasificación supervisado SIMCA resulta adecuado para resolver el problema de clasificar los forrajes en función del periodo vegetativo en el que se realice el corte, siendo las muestras sin pretratar con las que mejor agrupamiento se consigue.

En el modelo PLS-DA, las muestras pretratadas MSC y E-MSC no mejoran el resultado respecto a las muestras sin pretratar. Aunque es un modelo suficiente para agrupar las muestras en función del periodo fenológico en el que se realice el corte.