

Desarrollo y validación de curvas NIRS para determinar la composición química de pastos tropicales

Luis Alberto Sandoval Mejia

Honduras
Diciembre, 2005

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Desarrollo y validación de curvas NIRS para determinar la composición química de pastos tropicales

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en
Agroindustria en el Grado de Académico de Licenciatura

Presentado por:

Luis Alberto Sandoval Mejia

Honduras
Diciembre, 2005

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Luis Alberto Sandoval Mejía

Honduras
Diciembre, 2005

Desarrollo y validación de curvas NIRS para determinar la composición química de pastos tropicales

Presentado por:

Luis Alberto Sandoval Mejia

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Edward Moncada, M.A.E.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Miguel Vélez, Ph.D.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A mis padres Luis Alberto y Ana Elizabeth por todo el amor y apoyo que me han dado.

A mi hermano José Luis.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano por todo el apoyo que me han dado para la realización de mis estudios.

A Ismael Alfredo por su paciencia y amistad incondicional.

Al Dr. Francisco Javier Bueso por sus consejos y apoyo para la realización de este proyecto.

A mis amigos Carlos y Oscar por todos los buenos momentos.

A todos mis amigos en Zamorano por haber tan hecho tan especiales estos cuatro años.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A FANTEL, por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Instituto Salvadoreño de Formación Profesional (INSAFORP), por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Fondo Dotal Suizo por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

RESUMEN

Sandoval, L. 2005. Desarrollo y validación de curvas NIRS para la composición química de pastos. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 30p.

La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) es usada en la actualidad como una técnica rápida y exacta en la industria alimentaria para medir la composición química de alimentos terminados y materias primas. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar curvas de calibración NIRS para medir la composición química de pastos en el Centro de Evaluación de Alimentos (C.E.A.) de Zamorano. Un total de ciento treinta y una muestras de pastos secos colectadas de enero a julio del año 2005 en los potreros de Zamorano y otras provenientes de clientes externos del C.E.A. todas con edades entre los 14 y 35 días fueron analizadas para proteína cruda (PC), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y humedad por métodos tradicionales de laboratorio y NIRS para desarrollar la curva de calibración. NIRS predijo con alto grado de exactitud PC, FND y FAD. Los coeficientes de determinación en la validación (R^2), el error estándar de la validación (EEV) y coeficiente de variación (CV) fueron 0.976 (EEV: 0.247; CV: 4.45) para PC, 0.899 (EEV: 0.960; CV: 1.54) para FND, 0.916 (EEV: 0.600; CV: 1.48) para FAD y 0.593 (EEV: 0.297; CV: 3.5) para humedad. Los resultados obtenidos durante el estudio demuestran la confiabilidad de NIRS para el análisis de rutina de PC, FND y FAD de pastos en el C.E.A. de Zamorano. Las principales ventajas de la utilización de la tecnología NIRS en el C.E.A. para el análisis de PC, FND y FAD en pastos son: aumento en la eficiencia de laboratorio pudiendo analizarse en un día el mismo número de muestras que por lo métodos tradicionales se analizan en doce, reducción del uso de reactivos en 96% y mejores condiciones de trabajo para el analista del laboratorio.

Palabras clave: Análisis CPM, espectroscopía de reflectancia, fibra ácido detergente, fibra neutro detergente, humedad, infrarrojo cercano, pastos, proteína cruda,

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xi
Índice de anexos.....	xii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2 ANTECEDENTES.....	2
1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1.4 LÍMITES DEL ESTUDIO.....	2
1.5 LIMITANTES.....	2
1.6 OBJETIVOS.....	3
1.6.1 Objetivo general.....	3
1.6.2 Objetivos específicos.....	3
2 REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 DEFINICIÓN DE ESPECTROSCOPÍA EN EL INFRARROJO CERCANO.....	4
2.2 PRINCIPIOS DE LA ESPECTROSCOPÍA EN EL INFRARROJO CERCANO.....	5
2.3 BANDAS DE ABSORCIÓN EN EL NIRS.....	6
2.4 CALIBRACIÓN DEL NIRS.....	6
2.5 VALIDACIÓN DEL NIRS.....	8
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	9
3.2 MATERIALES.....	9
3.3 CONSTITUYENTES A EVALUAR EN LOS PASTOS.....	9
3.4 PROCEDIMIENTO.....	9
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS DE REFERENCIA.....	10
3.6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	11
3.7 ESPECTROS DE LAS MUESTRAS.....	11
3.8 CALIBRACIÓN DE LA CURVA.....	11

3.9	CUADRADOS MÍNIMOS PARCIALES MODIFICADO (CMPM)	11
3.10	VALIDACIÓN DE LAS CURVAS.....	12
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MUESTRAS.....	13
4.2	CALIBRACIÓN DE LA CURVA.....	13
4.3	VALIDACIÓN DE LA CURVA.....	16
5	CONCLUSIONES	17
6	RECOMENDACIONES	18
7	BIBLIOGRAFÍA	19
8	ANEXOS	21

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Bandas de absorción de los principales componentes orgánicos de los alimentos	6
2. Estadística descriptiva de pastos o alimentos animales utilizados en estudios similares.	7
3. Resumen de métodos estadísticos y tratamientos matemáticos utilizados en estudios similares.	7
4. Resumen de estadísticas de validación utilizando NIRS para predecir la composición química de pastos, granos y alimentos para animales.	8
5. Tipo de pasto y número de muestras utilizadas para la calibración.	10
6. Componentes evaluados en las muestras y el análisis de referencia utilizado.	10
7. Composición promedio de las muestras utilizadas para la calibración de la curva por los métodos de referencia.	13
8. Estadística descriptiva de los valores de predicción de las muestras de pastos utilizadas para la calibración.	14
9. Comparación del ajuste de los modelos de regresión y tratamientos matemáticos usados por WINISI.	15
10. Estadística descriptiva de las muestras utilizadas para la calibración.	15
11. Estadística descriptiva de la validación de la curva.	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Espectro Electromagnético.....	4
2. Espectros NIRS del total de muestras utilizadas para la calibración.	14

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Diagrama de dispersión para los valores de FND. Análisis de referencia versus predicción NIRS.....	22
2. Diagrama de dispersión para los valores de proteína. Análisis de referencia versus predicción NIRS.....	23
3. Diagrama de dispersión para los valores de FAD. Análisis de referencia versus predicción NIRS.....	24
4. Diagrama de dispersión para los valores de humedad. Análisis de referencia versus predicción NIRS.....	25
5. Composición química de las muestras utilizadas para la calibración y validación de la curva NIRS.....	26
6. Comparación de datos de composición química de las muestras utilizadas para la validación por métodos de referencia y NIRS.....	30

1. INTRODUCCIÓN

La espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), es uno de los métodos más rápidos para estimar componentes químicos, siendo las áreas en las que ha tenido mayor desarrollo la agricultura, la industria petroquímica, la farmacéutica y la alimentaria (Borjas, 2002).

El primer uso que NIRS tuvo en la agricultura fue estimar el contenido de humedad de semillas oleaginosas. Proteína cruda, fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), digestibilidad *in vitro* y digestibilidad aparente *in vivo* fueron estimados hasta 1976 (Coleman, 2000).

De acuerdo con Castro (1999), los pastos constituyen la principal fuente de alimentos para las ganaderías tanto de carne como de leche de los países centroamericanos. Por lo tanto, es necesario conocer su calidad nutricional para determinar factores limitantes y poder diseñar estrategias de manejo que permitan una explotación racional y rentable de la actividad ganadera.

Los análisis químicos de laboratorio son tradicionalmente usados para determinar la composición de los pastos. Sin embargo, presentan ciertos inconvenientes como tiempo requerido, costos y en ocasiones la utilización de químicos peligrosos (Lavrencic, 2001).

Por medio de la utilización de la tecnología NIRS se pueden estimar los componentes químicos de los pastos con exactitud y precisión derivándose beneficios como ahorro de tiempo, no destrucción de la muestra, menor contaminación por la no utilización de químicos y no es necesario de personal capacitado para análisis de rutina.

La tecnología NIRS es una técnica secundaria que requiere de calibraciones apropiadas con muestras representativas de la población para la que se desea utilizar (Coleman, 2000).

1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El Centro de Evaluación de alimentos de Zamorano no cuenta con curvas apropiadas para el análisis de pastos por medio de NIRS.

1.2 ANTECEDENTES

En los años 2001 y 2002 fueron desarrolladas curvas de calibración NIRS para control de calidad en jamón virginia, queso cabañas y leche fluida. El equipo no es usado para el análisis de otros alimentos o materias primas debido a que no se cuenta con las curvas apropiadas.

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Para realizar un análisis de proteína, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y humedad a una muestra de pastos en el Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano se requieren dos días más uno de preparación de la muestra. Por lo general el tiempo de entrega de resultados a los clientes toma de cinco a siete días después del recibo de la muestra.

Con la utilización de NIRS el tiempo de entrega de resultados se acorta a un día, pudiendo entregarse estos el mismo día si la muestra es recibida seca. Como ejemplo de la eficiencia de NIRS se tiene que en un periodo de ocho horas se pueden analizar de ochenta a cien muestras para proteína cruda, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y humedad. El mismo número de análisis por los métodos tradicionales de laboratorio puede tomar entre doce y quince días laborales.

1.4 LÍMITES DEL ESTUDIO

La curva NIRS será desarrollada sólo para evaluar pastos tropicales.

1.5 LIMITANTES

Las pasturas en Zamorano que se encuentran en condiciones óptimas para el estudio se limitan a las utilizadas actualmente por el establo.

El Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano no cuenta con la cristalería y equipo suficiente para satisfacer la demanda de análisis existente.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer y validar una curva de calibración NIRS para pastos.

1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido de humedad, proteína cruda, fibra neutro detergente y fibra ácido detergente de los pastos por medio de los métodos recomendados por la A.O.A.C. para validar las curvas NIRS.
- Desarrollar una curva de calibración NIRS para pastos.
- Determinar la composición química de pastos por medio de NIRS.
- Validar la curva de calibración para pastos.

2. REVISION DE LITERATURA

NIRS es usado en la industria alimentaria para evaluar la calidad de las materias primas y del producto terminado. Su uso se ha popularizado a pesar de la necesidad de desarrollar y validar curvas de calibración para los diferentes productos debido a las múltiples ventajas que presenta.

La espectroscopía en el infrarrojo cercano obtiene la información basándose en el principio de que los enlaces moleculares de los componentes químicos de la muestra absorben frecuencias específicas de luz entre 750 y 2500 nm (Shenk *et al.*, 1993). Según FOSS, fabricante del modelo FOSSNIR SY-3650-II, el aparato debe de ser previamente calibrado con un mínimo de 50 muestras analizadas por métodos oficiales.

2.1 DEFINICIÓN DE ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO

Según Barton (2002), la historia del infrarrojo cercano comienza en el año 1800 con Herschel, cuyos experimentos para filtrar calor de un telescopio demostraron que había radiación de luz más allá de lo que conocemos como espectro visible.

La luz infrarroja se encuentra entre las porciones de luz visible y las microondas del espectro electro magnético. Las longitudes de onda del infrarrojo cercano se encuentran más próximas al espectro de luz visible mientras que el infrarrojo lejano se encuentra más cerca de las microondas. Las ondas del infrarrojo lejano son perceptibles en forma de calor mientras que las del infrarrojo cercano transmiten tan poco calor que no las podemos percibir (Figura 1).

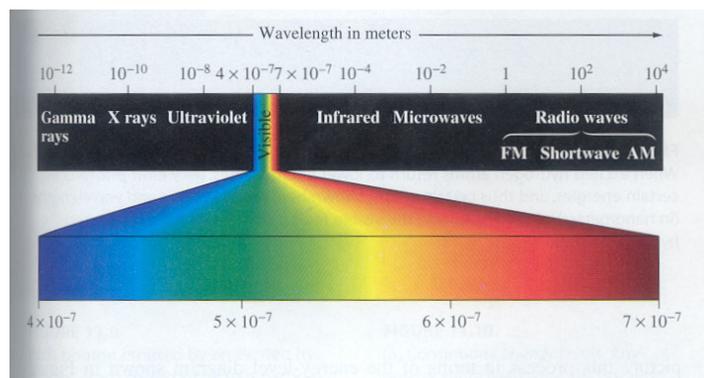


Figura 1. Espectro Electromagnético.

La espectroscopía en el infrarrojo cercano funciona con luz directa que ha sido separada en longitudes de onda específicas, irradiadas hacia la muestra y medida la cantidad de luz que se refleja. Con dichas medidas, las muestras pueden ser analizadas matemáticamente y determinados sus componentes basándose en la correlación con las concentraciones reales de los mismos, obtenidas utilizando métodos tradicionales de laboratorio (Alomar *et al.*, 1997).

La espectroscopía usando radiación electromagnética en el rango de infrarrojo cercano es una tecnología de reciente aplicación para el análisis no destructivo de la composición química de alimentos. Su uso se popularizó a finales de los 90s en centros de acopio de trigo para determinaciones rápidas del contenido de humedad y de proteína (Bueso, 2004).

2.2 PRINCIPIOS DE LA ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO

El principio del NIRS es la iluminación de la muestra con luz de frecuencia específica y conocida en la región de infrarrojo cercano. Cada tipo de enlace de las moléculas refleja una o varias longitudes de onda, que permite conocer la composición química de la muestra por medio del número y tipo de enlaces que la componen (Alomar *et al.*, 1997).

De acuerdo con Barton (2002), la energía radiante reflejada, reflectancia especular, que es emitida por la superficie no brinda información de utilidad sobre el contenido químico del producto, pero aquella radiación que penetra la muestra y luego emerge de ésta con ángulos de 180 grados al azar, sí nos presenta información válida de la composición de la muestra. Dicha radiación es conocida como reflectancia difusa.

Según Alomar y Fuchslocher (2002), en cada longitud de onda, la intensidad de la luz reflejada por la muestra es comparada con la intensidad reflejada de un material no absorbente, como la cerámica, así, la reflectancia es calculada por la siguiente fórmula:

$$R = I / I_0$$

Donde:

R = Reflectancia.

I = Intensidad de la radiación reflejada de la muestra a longitud de onda dada.

I₀ = Intensidad de radiación reflejada de la referencia a al misma longitud de onda.

Según Barton (2002), los análisis proximales con NIRS, requieren el desarrollo de modelos de regresión específicos para cada tipo de producto que reflejen la relación entre la absorbancia a ciertas longitudes de onda con los componentes individuales del producto. Dichos modelos deben presentar la suficiente flexibilidad para medir con exactitud el contenido de cada componente en los rangos con que generalmente son recibidas las muestras.

Para asegurar exactitud es necesario corroborar periódicamente los resultados del NIRS con los análisis químicos de referencia.

2.3 BANDAS DE ABSORCIÓN EN EL NIRS

La espectroscopía en el infrarrojo cercano se basa en la absorción por grupos funcionales que tienen un átomo de hidrógeno unido a uno de carbono, nitrógeno u oxígeno. Estas absorciones son expresadas como sobretonos o picos. Dichos enlaces son los más abundantes en los constituyentes de los alimentos como agua, proteínas lípidos y carbohidratos (Shenk *et al.*, 2002). El Cuadro 1 muestra los principales componentes orgánicos de los alimentos y sus longitudes de onda de absorción.

Cuadro 1. Bandas de absorción de los principales componentes orgánicos de los alimentos.

Constituyente	Absorción	Longitud de onda (nm)
Agua	O-H	1920-1950
		1400-1450
Proteínas	N-H	2080-2220
		1560-1670
Lípidos	C-H, CH ₂ Y CH ₃	2300-2350
		1680-1760
Carbohidratos	C-O, O-H	2060-2150

Fuente: Wehling, 1998.

2.4 CALIBRACIÓN DEL NIRS

Uno de los primeros aspectos que se plantean al desarrollar una calibración, es el número de muestras necesario para obtener resultados satisfactorios. No existe un número mínimo definido, sino que éste dependerá de la entidad a predecir y de la naturaleza del producto a evaluar. Cuando se pretende analizar entidades químicas simples, de productos relativamente homogéneos, como el nivel de nitrógeno (para estimar proteína bruta) en granos de trigo, puede bastar con 30 a 40 muestras; en cambio, si se pretende evaluar el contenido de proteína en productos más heterogéneos, o productos con mayores niveles y variedad de proteínas, se requieren más de 100 muestras (Cozzolino, 2002b).

El Cuadro 2 muestra el tipo de pasto o alimento animal, número de muestras, media y desviación estándar por autor de estudios similares.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de pastos o alimentos animales utilizados en estudios similares.

Autor	Producto	Componente	n	Media	DE*
Woolnough y Foley (2000).	Pastos de la sabana tropical semi-árida	Nitrógeno total	80	1.03	0.57
		FND	87	68.11	10.7
		FAD	82	39.67	6.36
Cozzolino, (2002b).	Diferentes alimentos animales	PC	375	18.7	8.5
		FND	215	33.1	9.5
		FAD	290	11.6	4.7
Cozzolino, (2002a).	Ensilaje de maíz	PC	200	7.9	1.5
		FND	200	59.8	8.8
		FAD	200	31.3	4.2

DE*: Desviación estándar.

Las ecuaciones de calibración cuantifican la relación de absorción del NIRS y los datos de referencia de laboratorio. La precisión es medida como el error estándar de calibración y el error estándar de predicción (Cozzolino, 2002a).

Al desarrollar una calibración, se relaciona la información espectral con la información de referencia (composición química), definiendo entre otras cosas, el tratamiento matemático de los datos, el segmento del espectro a incluir y el método de regresión a emplear. Entre las técnicas disponibles están la regresión múltiple, regresión múltiple paso a paso, componentes principales y cuadrados mínimos parciales. En general se encuentran mejores resultados con las últimas dos técnicas, en que se reduce toda la información espectral a un grupo más pequeño de variables independientes (componentes principales) y al mismo tiempo se controla el riesgo de sobreajuste (Foss Nirsystems, 2004).

El Cuadro 3 muestra los métodos estadísticos y tratamientos matemáticos utilizados por otros autores, que varían de acuerdo a la naturaleza de los componentes evaluados.

Cuadro 3. Resumen de métodos estadísticos y tratamientos matemáticos utilizados en estudios similares.

Autor	Método estadístico	Tratamientos matemáticos
Woolnough y Foley (2000).	CMPM	2,5,5
		2,8,8
Cozzolino, (2002a).	CMPM	1,4,4
Cozzolino, (2002b).	CMPM	1,5,5

2.5 VALIDACIÓN DEL NIRS

Estudios previos de otros autores han demostrado la precisión y exactitud del NIRS para predecir la composición química de distintos tipos de pasto y diferentes condiciones ambientales. El Cuadro 4 da un resumen de estadísticas de validación de estudios realizados en NIRS para predecir la composición de pastos y granos, el R^2 obtenido para proteína tiende a ser alto positivo en comparación con el R^2 para predecir FND y FAD que suele estar entre 0.85 y 0.95 debido a la complejidad de las moléculas.

Cuadro 4. Resumen de estadísticas de validación utilizando NIRS para predecir la composición química de pastos, granos y alimentos para animales.

Descripción de Forraje y país de estudio	PC		FND		FAD		Fuente
	R^2	EE	R^2	EE	R^2	EE	
Cosechas cultivadas, USA	0.99	0.74	0.98	2.39	0.96	1.56	Norris <i>et al</i> (1976).
Granos cultivados, USA	0.96	0.95	0.95	2.64	0.86	2.31	Shenk <i>et al</i> (1979).
Pastos semi-áridos, USA.	0.98	0.37	-	-	0.90	1.26	Ward <i>et al</i> . (1982).
Pastos y leguminosas templados, USA.	1.0	0.03	1.0	0.09	1.0	0.36	Brooks <i>et al</i> . (1984).
Pastos y leguminosas semi-naturales, España.	0.95	0.56	0.91	1.97	0.87	1.24	García-Ciudad <i>et al</i> . (1993).
Pastos de la sabana semi-árida tropical. Australia.	0.99	0.04	0.98	1.49	0.89	1.22	Woolnough <i>et al</i> . (2000).
Leguminosas anuales, Australia.	-	-	0.93	0.31	0.91	0.44	Kellaway y Stimson (1993).
Distintos alimentos animales	0.98	1.3	0.8	5.3	0.93	1.4	Cozzolino (2002).
Ensilaje de maíz	0.94	0.54	0.9	3.8	0.91	1.8	Cozzolino <i>et al</i> . (2002).
Pastos semi-áridos, Argentina.	0.90	0.31	0.94	0.43	-	-	Rabotnikof <i>et al</i> . (1995).

Fuente: Woolnough y Foley, 2002.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio fue realizado en el Centro de Evaluación de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana localizada a 32 km al SE de Tegucigalpa, Departamento de Francisco Morazán, Honduras.

3.2 MATERIALES

155 muestras de Pastos.
FOSS NIR SY-3650 II, Modelo 5000.
Monocromador Sistema II.
Módulo detector de reflectancia.
Módulo de transporte de muestras.
Paquete de Software WINISI®. V 1.5
Equipo de laboratorio y reactivos necesarios para los análisis de referencia.

3.3 CONSTITUYENTES A EVALUAR EN LOS PASTOS

Proteína Cruda (PC).
Fibra neutro detergente (FND).
Fibra ácido detergente (FAD).
Humedad.

3.4 PROCEDIMIENTO

Para poder desarrollar la calibración de la curva fueron utilizadas muestras de pastos colectadas en los potreros Zamorano de Enero a Julio del año 2005 así como muestras analizadas en el CEA por solicitud de clientes externos con edades entre los catorce y treinta y cinco días.

Los pastos utilizados fueron: Mulato (*Brachiaria sp.*), Tobiata (*Panicum maximum*), King grass (*Pennisetum purpureum*), Guinea (*Panicum maximum*), Estrella (*Cynodon nlemfuensis*), Pasto de elefante (*Pennisetum purpureum*), Andropogon (*Andropogon gayanus*), Guatemala (*Tripsacum laxum*), Transvala (*Digitaria eriantha*) y Tanzania

(*Panicum maximum*). En el Anexo 5 se indican los pastos utilizados y su composición química obtenida por los métodos de referencia.

La distribución de las muestras en la población no fue homogénea debido a la disponibilidad de las mismas. El Cuadro 5 muestra el tipo de pasto y el número de muestras utilizadas para el desarrollo de la curva.

Cuadro 5. Tipo de pasto y número de muestras utilizadas para la calibración.

Pasto	N
Tobiatá	33
Mulato	32
Transvala	30
Tanzania	16
Guinea	11
Brachiaria	11
King grass	7
Andropogón	5
Estrella	5
Elefante	2
Guatemala	2
	155

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS DE REFERENCIA

Para poder calibrar la curva fueron necesarios análisis químicos de referencia que son la base del desarrollo de la ecuación de calibración. Para obtener análisis de referencia confiables se utilizaron los métodos recomendados por la A.O.A.C. (1993). El Cuadro 6 indica los componentes evaluados y el análisis de referencia utilizado.

Cuadro 6. Componentes evaluados en las muestras y el análisis de referencia utilizado.

Componente	Análisis de referencia
Proteína cruda	Micro Kjeldhal(A.O.A.C. 984.13)
Fibra neutro detergente	Van Soest (A.O.A.C. 973.18)
Fibra ácido detergente	Van Soest (A.O.A.C. 973.18)
Humedad	Horno 105°C (A.O.A.C. 930.15)

3.6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron recibidas en el Centro de Evaluación de Alimentos (CEA) de Zamorano y secadas por 48 horas en horno a 60°C, luego fueron molidas utilizando un molino tipo Thomas-Wiley modelo 4 con malla de 2mm y almacenadas a temperatura ambiente.

3.7 ESPECTROS DE LAS MUESTRAS

La captura de los espectros fue realizada a una temperatura ambiente de 21.53°C con una temperatura máxima de 21.9°C y una temperatura mínima de 21.3°C utilizando un equipo FOSSNIR SY-3650 II, Modelo 5000, de los 1100 a los 2500 nm con una cubeta rectangular de vidrio de cuarzo para el transporte de las muestras. Uno de los principales factores que afectan la medición del NIRS es la temperatura tanto de las muestras como del ambiente, por lo cual al haber hecho la captura de los espectros a una temperatura constante se disminuyó la variación de las lecturas.

Los datos de reflectancia se guardan con el logaritmo 1/R (R = Reflectancia) a 2nm de intervalo (Alomar y Fuchslocher, 1997).

3.8 CALIBRACIÓN DE LA CURVA

La calibración de la curva fue realizada por medio del programa WINISI® versión 1.50 utilizando el método de validación cruzada. Se probaron los tres análisis estadísticos disponibles en el programa que son: análisis de componentes principales (PCR), cuadrados mínimos parciales (CMP) y cuadrados mínimos parciales modificados (CMPM) y los tratamientos matemáticos: 2,5,5; 2,10,10; 1,4,4; 1,5,5 que son los recomendados por otros autores (Cozzolino, 2002a).

Luego de la calibración de la curva se procedió a realizar un monitoreo de la misma para evaluar los R^2 obtenidos y determinar qué combinación de análisis estadístico y tratamiento matemático ofreció un mejor ajuste de la calibración. Los R^2 son obtenidos de la comparación de los análisis de referencia de todas las muestras con las predicciones del NIR.

3.9 CUADRADOS MÍNIMOS PARCIALES MODIFICADO (CMPM)

Este método es más preciso y estable que el de cuadrados mínimos parciales (CMP) y análisis por componentes principales (RCP) porque los residuales EIC en cada longitud de onda, obtenidos después de calcular cada factor, son estandarizados antes de calcular el siguiente factor (Foss Nirsystems, 2004).

3.10 VALIDACIÓN DE LAS CURVAS

El programa estadístico WINISI® valida las curvas de calibración por medio de un proceso conocido como validación cruzada, tomando la población de espectros almacenados que poseen sus valores de referencia de laboratorio (DRL), como base a partir de la cual selecciona una de las muestras y predice su composición, dato que luego es comparado con el DRL original de dicha muestra (Alomar *et al.*, 2002).

Según Cozzolino (2002a), la validación es realizada con el objetivo de predecir la composición de otras muestras que no incluyen las usadas para la calibración. Para un conjunto de 100 muestras del 50-70% pueden usarse para la calibración, mientras que el 30-50% restante puede ser usado para la validación.

Para la validación de la curva se utilizaron 24 muestras de pasto Victoria no utilizadas durante la calibración. Las muestras fueron evaluadas tanto por métodos de referencia como por NIR para proteína cruda, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y humedad.

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de regresión lineal utilizando el programa estadístico SAS® System V8. (1995).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MUESTRAS

El Cuadro 7 muestra los resultados por medio de los análisis químicos realizados a las muestras utilizadas para la calibración de la curva. La composición química de las muestras se ubicó dentro de los rangos usualmente encontrados en pastos tropicales y presentan una alta variabilidad que permite desarrollar una curva con la capacidad de leer muestras en un rango amplio de composición química.

Cuadro 7. Composición promedio de las muestras utilizadas para la calibración de la curva por los métodos de referencia.

Componentes	Número de muestras	Media aritmética %	Desviación estándar	Mínimo %	Máximo %
Proteína	131	9,85	±3,49	1.89	22.33
FND*	131	59,83	±5,55	41.52	73.27
FAD°	131	37,69	±4,67	26.15	52.39
Humedad	131	8,66	±2,95	2.32	18.52

FND*: Fibra neutro detergente

FAD°: Fibra ácido detergente

4.2 CALIBRACIÓN DE LA CURVA

Los resultados de los valores de predicción indican la composición química de las muestras usadas para la calibración de acuerdo con la lectura tomada por el NIRS. El Cuadro 8 muestra los resultados de los valores de predicción.

La Figura 2 muestra la distribución de los espectros de las muestras utilizadas para la calibración de la curva. Como se observa, ésta fue bastante variable indicando que se tienen muestras en un rango amplio de composición química.

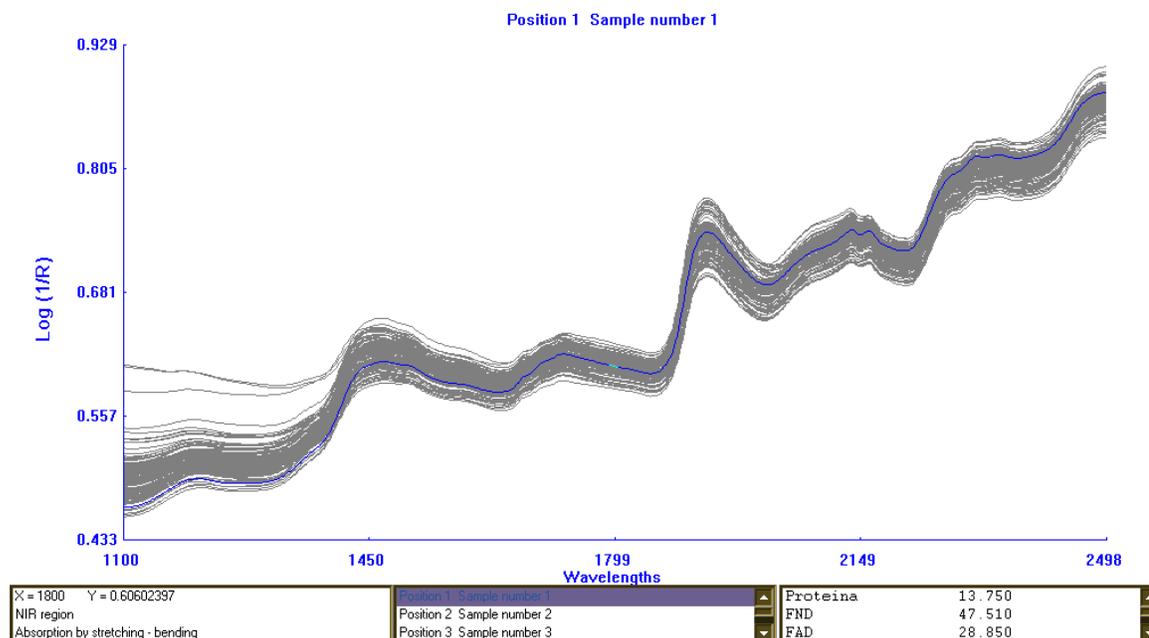


Figura 2. Espectros NIRS del total de muestras utilizadas para la calibración.

Cuadro 8. Estadística descriptiva de los valores de predicción de las muestras de pastos utilizadas para la calibración.

Componente	Número de muestras	Media aritmética %	Desviación estándar	Mínimo %	Máximo %
Proteína	131	9.54	±3.03	3.27	15.54
FND*	131	60.30	±5.44	46.73	75.92
FAD°	131	38.12	±4.21	27.71	46.82
Humedad	131	8.7	±2.98	4.33	18.45

*FND: Fibra neutro detergente.

°FAD: Fibra ácido detergente.

Los valores máximos y mínimos de cada componente indican los rangos dentro de los cuales la curva tiene capacidad de lectura. Cuando se presentan valores fuera de estos rangos se recomienda una extensión de la curva incluyendo la nueva muestra.

Cuadro 9. Comparación del ajuste de los modelos de regresión y tratamientos matemáticos usados por WINISI.

ANAEST	TRT	Proteína	FND	FAD	Humedad
RCP	2,5,5	0,866	0,869	0,813	0,919
	2,10,10	0,901	0,895	0,859	0,923
	1,4,4	0,909	0,884	0,842	0,916
	1,5,5	0,907	0,88	0,839	0,917
CMP	2,5,5	0,925	0,934	0,888	0,923
	2,10,10	0,908	0,933	0,886	0,933
	1,4,4	0,915	0,952	0,882	0,932
	1,5,5	0,915	0,951	0,882	0,932
CMPM	2,5,5	0,926	0,938	0,887	0,939
	2,10,10	0,93	0,95	0,884	0,942
	1,4,4	0,923	0,956	0,887	0,939
	1,5,5	0,934	0,952	0,886	0,937

ANAEST: Análisis estadístico, TRT: Tratamiento matemático, RCP: Análisis por componentes principales; CMP: cuadrados mínimos parciales, CMPM: Cuadrados mínimos parciales modificados.

Debido a que el contenido de proteína es uno de los factores más importantes al momento de formular raciones se hizo especial énfasis en las combinaciones que ofrecían un R^2 más alto para este componente, siendo el mejor modelo de regresión el de cuadrados mínimos parciales modificados (CMPM) con el tratamiento matemático 1,5,5.

El Cuadro 10 muestra la estadística descriptiva de las muestra utilizadas para la calibración utilizando el análisis estadístico de cuadrados mínimos parciales modificados y el tratamiento matemático 1,5,5.

Cuadro 10. Estadística descriptiva de las muestras utilizadas para la calibración.

Componente	N	Media	R^2	SEC	SECV
Proteína	119	9.54	0.960	0.43	0.60
FND	126	60.30	0.946	0.98	1.25
FAD	124	38.10	0.908	1.08	1.22
Humedad	127	8.69	0.941	0.62	0.72

N: número de muestras; SEC: error estándar de calibración; SECV: error estándar de la validación cruzada.

Los R^2 obtenidos para los componentes químicos fueron altos y tienen similitud con los citados por otros autores como Cozzolino (2002a). De igual manera los errores estándar de calibración y los errores estándar de validación cruzada resultaron bajos, demostrando la confiabilidad de la curva para predecir la composición química de futuras muestras.

En los diagramas de dispersión presentes en el Anexo 1, 2, 3 y 4 se puede observar la cercanía existente entre los datos obtenidos con análisis de laboratorio y la predicción realizada por el NIRS.

4.3 VALIDACIÓN DE LA CURVA

Para validar la curva se utilizó un total de 24 muestras no utilizadas durante la calibración. Los resultados obtenidos de la validación se muestran en el Cuadro 11.

Los altos R^2 , bajos errores estándar de validación y bajos coeficiente de variación para proteína cruda, fibra neutro y ácido detergente indican la confiabilidad para sustituir los métodos químicos de referencia en muestras futuras.

Cuadro 11. Estadística descriptiva de la validación de la curva.

Componente	N	R^2	EEV	CV, %
PC	24	0.976	0.247	4.45
FND	24	0.899	0.960	1.54
FAD	22	0.916	0.600	1.48
Humedad	24	0.593	0.297	3.50

PC: Proteína cruda, EEV: error estándar de validación, CV: coeficiente de variación.

Sin embargo, el bajo R^2 obtenido para humedad indica que la curva no se encuentra lista para la predicción de dicho componentes en muestras futuras. Los datos de composición química de las muestras utilizadas para la validación por los métodos de referencia y NIRS se pueden observar en el Anexo 6.

Posiblemente el bajo R^2 para humedad se debió a la contracción o expansión de las moléculas que la componen debido a la temperatura a que fueron tomadas las mediciones en NIR. Las mediciones en NIR deben tomarse a temperatura constante, sin embargo no se encuentra en la literatura estudios que indiquen temperaturas óptimas a las que deban de evaluarse los constituyentes de los alimentos.

Además, el contenido de humedad tiende a variar con el tiempo de almacenaje en laboratorio entre los análisis químico y NIRS.

El análisis de referencia recomendado para humedad en NIR es titulación por Karl Fisher (Cozzolino, 2002b) y no el horno a 105°C como fue hecho en este estudio; lo cual puede explicar el bajo R^2 obtenido en la validación.

5. CONCLUSIONES

- El NIRS fue capaz de predecir con exactitud y precisión similar a los métodos de referencia la composición química de pastos para los componentes de proteína cruda, fibra neutro detergente y fibra ácido detergente.
- El NIRS predijo con mayor exactitud y precisión el contenido de proteína cruda que el de fibra neutro detergente y fibra ácido detergente.
- El mejor análisis estadístico y tratamiento matemático para el desarrollo de la calibración fue cuadrados mínimos parciales modificados y 1,5,5.
- Los resultados obtenidos en este estudio muestran la confiabilidad del NIRS para los análisis de PC, FND y FAD en el Zamorano.
- El análisis de humedad por el método de referencia horno 105°C no fue el más apropiado para la calibración de la curva.

6. RECOMENDACIONES

- Monitorear la curva por medio de los métodos de referencia con una (1) de cada veinticinco (25) muestras que son evaluadas en el NIRS para confirmar la precisión de las mediciones.
- Expandir la curva con muestras de pastos no utilizados en este estudio que presenten PC menor a 3.27 y mayor a 15.54, FND menor a 46.73 y mayor a 75.92 y FAD menor a 27.71 y mayor a 46.82 con el objetivo de aumentar la capacidad de la curva para la lectura de muestras futuras.
- Debido a la similitud de los espectros de pastos y ensilajes se recomienda evaluar si la curva de pastos puede ser usada también para ensilajes.
- Recalibrar la humedad con el método de referencia de titulación Karl Fisher.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alomar, D. y Fuchslocher, R. 1997. Fundamento de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. Consultado 09/06/04. Disponible en: www.agrosur.com

A.O.A.C. 1993. Official methods of analysis. 15th Ed. Vol 1. Virginia, USA.

Barton, F. 2002. Theory and Principles of near infrared spectroscopy. Folleto en línea. Consultado 25/08/04. Disponible en: http://www.spectroscopyeurope.com/NIR_14_01.pdf

Borjas, E. 2002. Establecimiento y validación de curvas de calibración NIRS para determinar la calidad química del jamón Virginia. Licenciatura. Francisco Morazán, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 35p.

Bueso, F. 2004. Espectroscopía de reflectancia en el Infrarrojo Cercano. Entrevista. 10/08/05.

Castro, M. 1999. Desarrollo de curvas de calibración por medio de espectrofotometría infrarroja para análisis de pastos. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Documento PDF. 1p.

Coleman, S. 2000. Forages and Pastures: Emerging techniques for predicting forage quality. New applications of near-infrared reflectance spectroscopy for forage quality assessment Journal of Animal Science. Vol 83. Suppl. 1. Document pdf. 1p.

Cozzolino, D. 2002a. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de ensilaje de maíz. Documento PDF. 7p.

Cozzolino D. 2002b. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. Agrociencia. Vol. VI pág 25-32. Uruguay. Documento pdf. 8p.

Foss Nirsystems. 2004. Consultado 05/08/04. Disponible en: <http://www.winisi.com/>

Lavrencic, A. 2001. Determination of chemical composition, *in vitro* dry matter digestibility and *in vitro* gas production of forage by near infrared reflectance spectroscopy. University of Ljubl. U.K. Kemet Zooteh, 78 (December, 2001)2, 151-160.

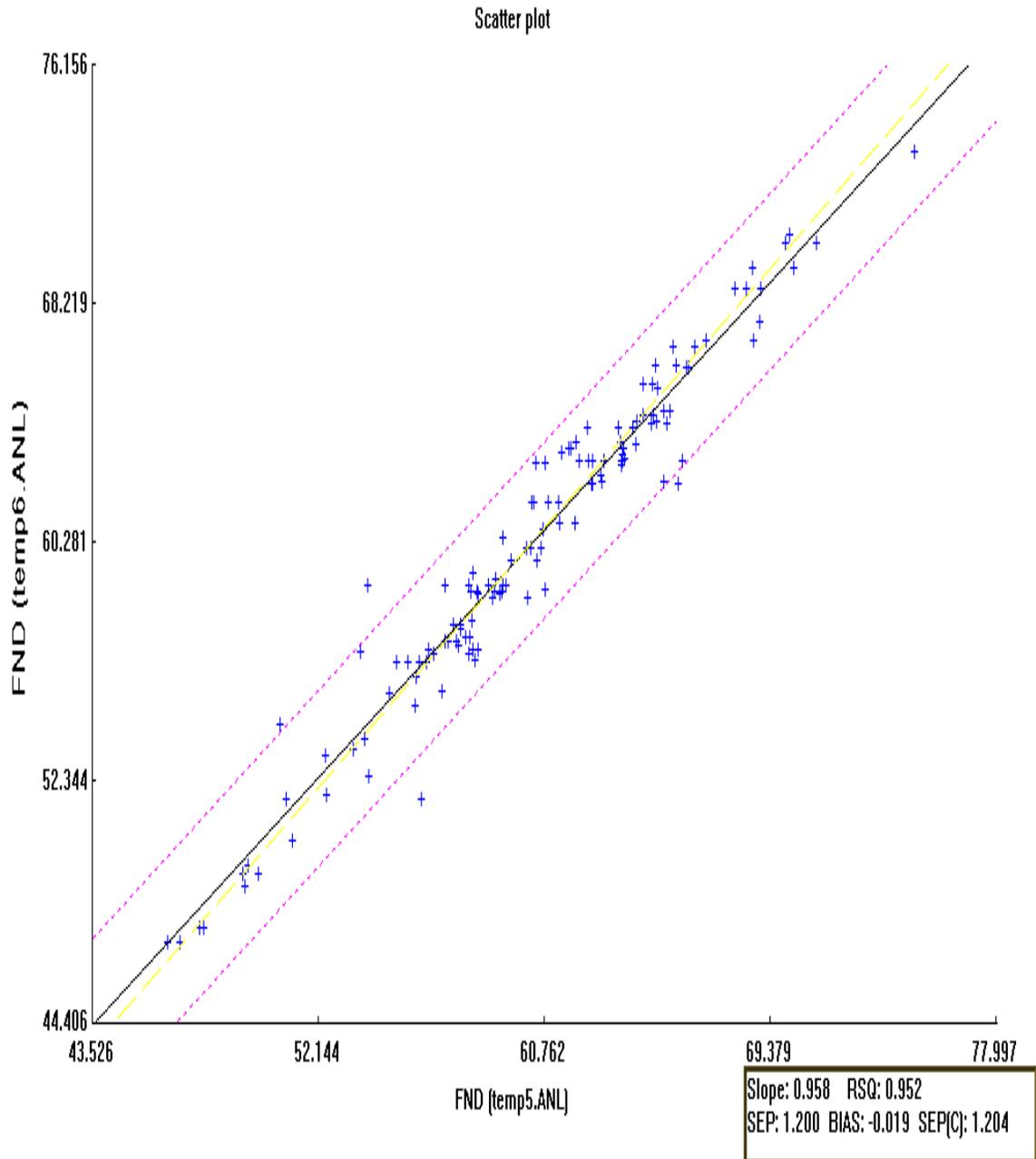
Shenk, J. y Werterhaus, M. 1993. Analysis of agriculture and food products by near infrared espectroscopy. Infracsoft international. Pennsylvania, USA. 116P.

The Electromagnetic spectrum. Consultada 25/08/04. Disponible en: <http://imagers.gsfc.nasa.gov/ems/infrared.html>

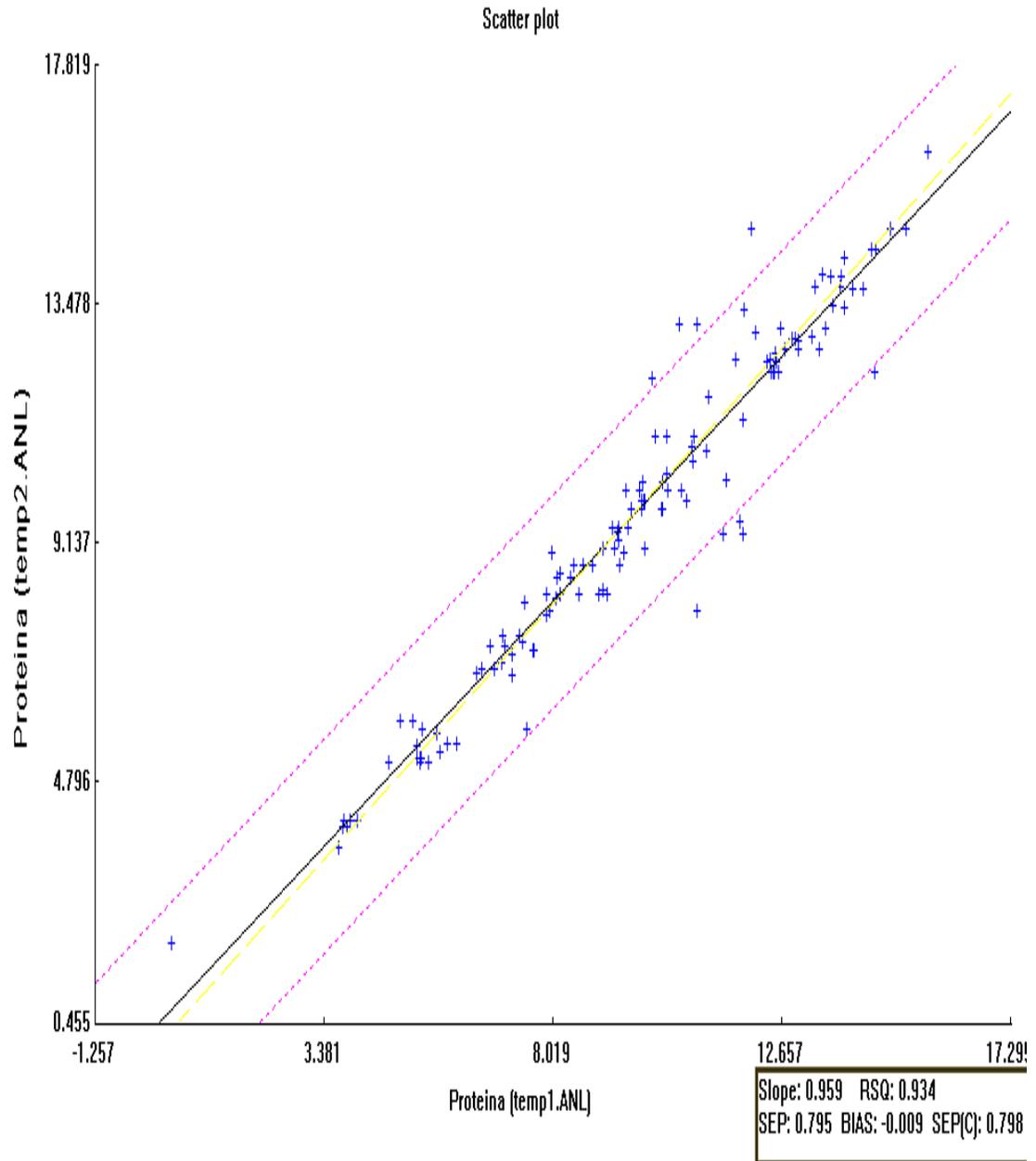
Woolnough, A. y Foley, W. 2002. Rapid evaluation of pasture quality for a critically endangered mammal, the northern hairy-nosed wombat (*Lasiorhinus krefftti*). Department of Zoology and Tropical Ecology. James Cook University. Australia. Document pdf 11p.

8 ANEXOS

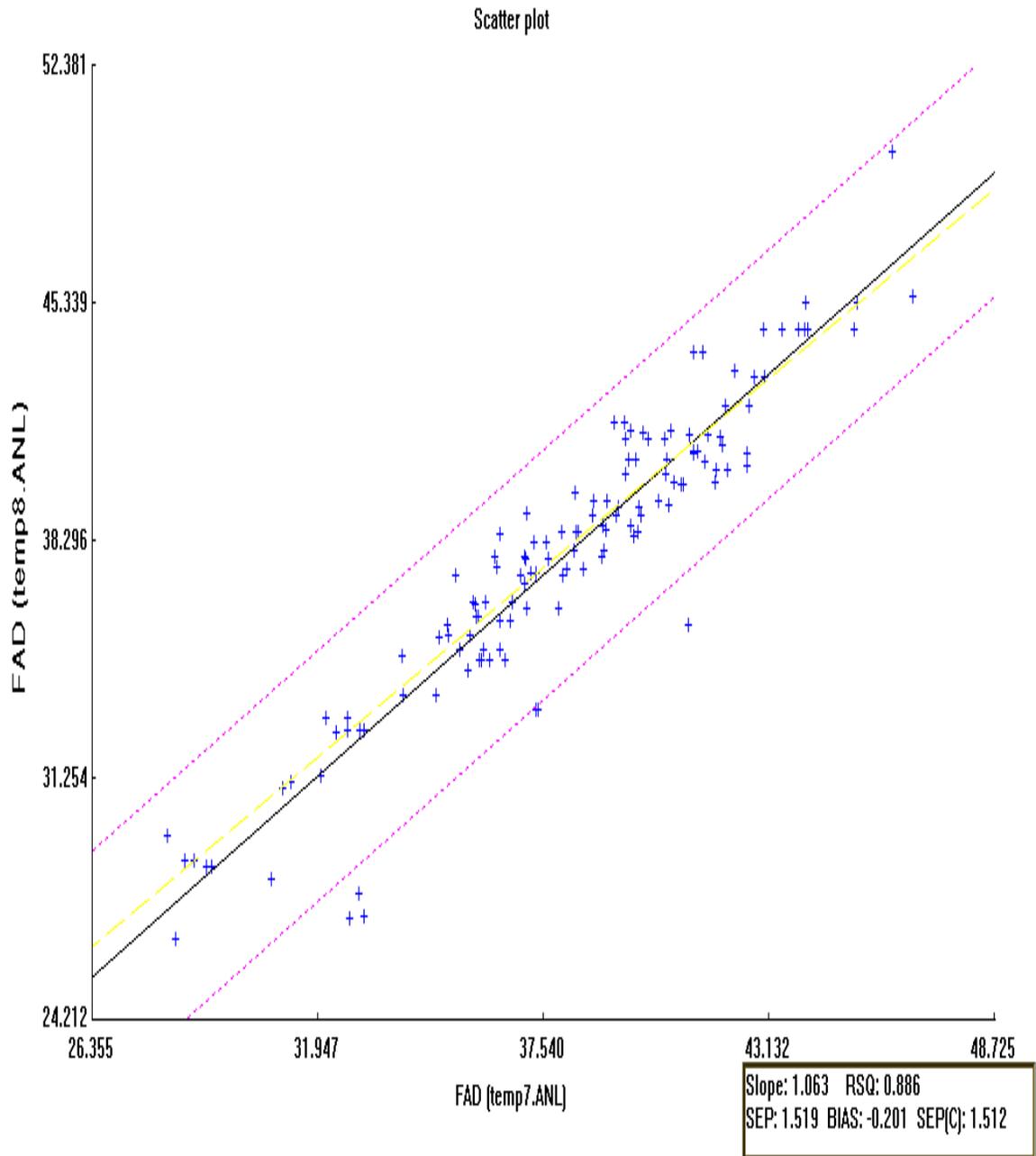
Anexo 1. Diagrama de dispersión para los valores de FND. Análisis de referencia versus predicción NIRS.



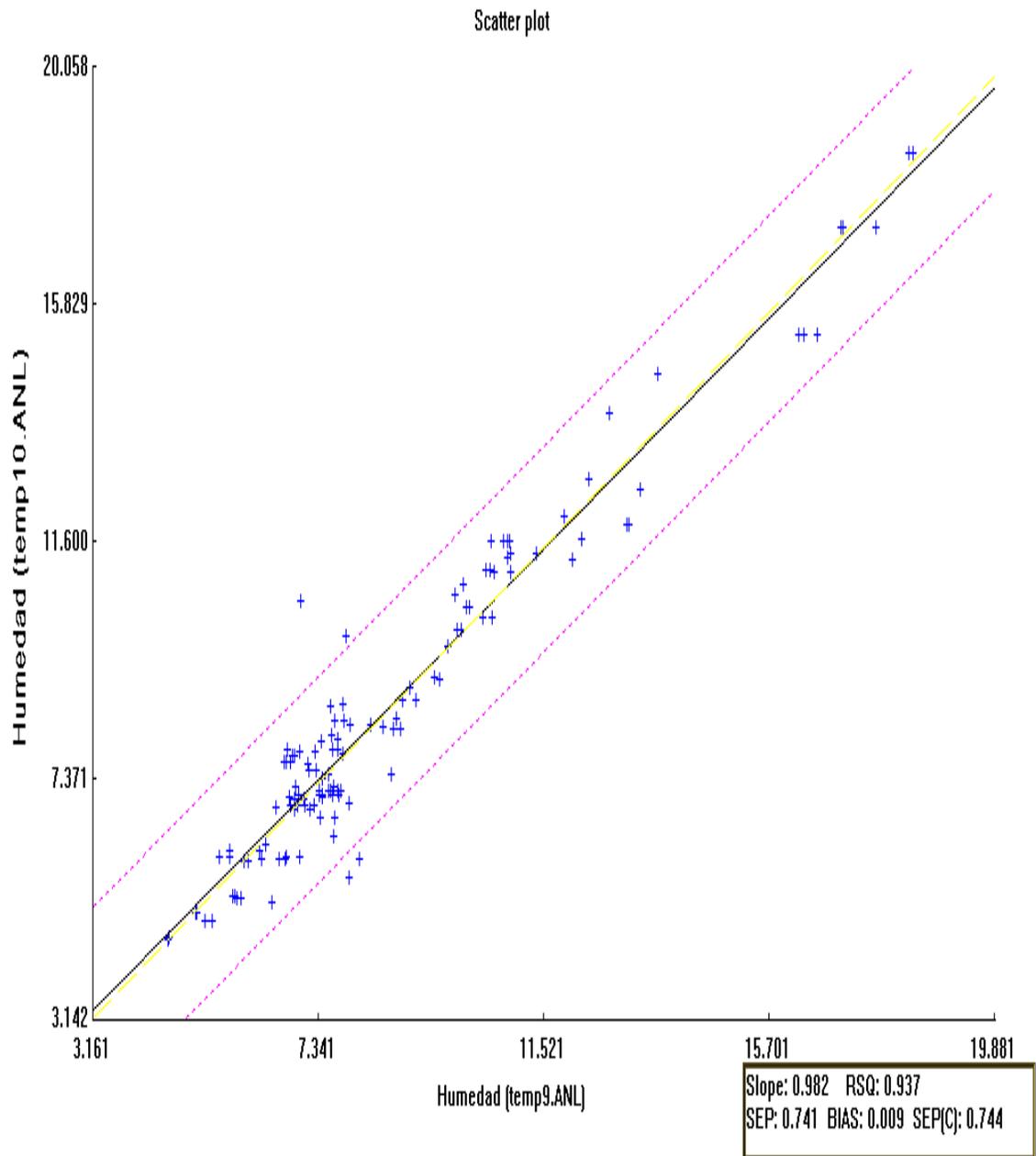
Anexo 2. Diagrama de dispersión para los valores de proteína. Análisis de referencia versus predicción NIRS.



Anexo 3. Diagrama de dispersión para los valores de FAD. Análisis de referencia versus predicción NIRS.



Anexo 4. Diagrama de dispersión para los valores de humedad. Análisis de referencia versus predicción NIRS.



Anexo 5. Composición química de las muestras utilizadas para la calibración y validación de la curva NIRS.

Código	Tipo de pasto	Edad	PC	FND	FAD	Humedad
274	Adropogon	6 semanas	8,95	57,72	39,74	7,06
277	Andropogon		12,60	56,42	36,42	7,24
283	Andropogon		10,39	56,89	39,11	6,88
285	Andropogon		12,81	57,44	37,31	6,24
121	Brachiaria		1,89	73,27	49,82	7,08
124	Brachiaria		8,73	59,70	35,96	7,12
367	Brachiaria	4 semanas	15,42	54,26	32,64	7,24
714	Brachiaria	4 semanas	15,63	54,26	32,64	7,24
718	Brachiaria	4 semanas	14,86	54,26	32,64	7,24
632	Brachiaria		8,73	59,70	35,96	7,12
273	Brachiaria	4 semanas	10,87	53,19	33,06	7,49
284	Elefante	4 semanas	3,33	51,19	42,32	6,46
219	Estrella		7,90	53,79	35,84	12,71
254	Estrella		5,49	59,76	29,50	10,61
288	Estrella		5,23	68,69	41,31	11,61
705	Estrella		5,23	68,69	41,31	11,61
723	Estrella		5,23	68,69	41,31	11,61
278	Guatemala		11,75	55,65	52,39	7,49
281	Guatemala		12,64	56,29	36,33	7,89
218	Guinea		6,86	63,62	37,37	8,81
253	Guinea		7,92	57,57	34,79	11,11
275	Guinea	21 días	12,65	55,38	37,51	7,04
282	Guinea		12,88	54,87	37,04	8,10
678	Guinea		6,86	63,62	37,37	8,81
681	Guinea		8,12	57,57	34,79	11,11
276	Guinea tanzania		20,78	55,08	37,76	6,93
279	Guinea tanzania		13,43	55,86	38,49	7,93
270	Guinea Tobiata	21 días	12,47	58,59	37,84	7,12
280	Guinea Tobiata		11,36	58,48	38,66	10,55
680	Guinea Tobiata		12,64	56,29	36,33	7,89
216	King grass		11,48	56,76	30,34	10,27
251	King grass		8,30	58,86	38,59	9,02
259	King grass		5,69	70,50	40,64	10,85
286	King grass		3,62	57,00	32,71	11,65
684	King grass		4,00	57,00	32,71	12,05
724	King grass		4,00	57,00	32,71	11,27
137	King grass Yuscaran		8,96	67,59	45,55	7,02
120	Mulato		5,18	60,48	34,47	5,95
212	Mulato		9,76	51,94	28,30	11,32
213	Mulato		14,02	58,84	33,06	8,07
211	Mulato		11,26	59,52	31,72	6,52
217	Mulato		9,90	56,63	37,81	9,21
220	Mulato		14,30	51,79	27,85	14,60

Código	Tipo de pasto	Edad	PC	FND	FAD	Humedad
227	Mulato		8,60	52,55	27,15	13,90
228	Mulato		8,23	56,65	31,38	9,74
245	Mulato		9,06	51,76	27,21	8,48
252	Mulato		5,50	58,62	33,72	11,05
258	Mulato		5,37	70,24	40,91	10,43
260	Mulato		5,77	61,59	37,47	10,03
287	Mulato		4,10	60,11	38,59	12,52
676	Mulato		9,76	51,94	28,30	11,32
677	Mulato		9,90	56,63	37,81	9,16
679	Mulato		5,50	58,62	33,72	11,05
682	Mulato		5,93	61,59	37,47	10,03
683	Mulato		5,92	70,24	40,91	10,43
715	Mulato	14 a 21 días	4,10	60,11	38,59	11,91
720	Mulato		4,10	60,11	38,59	11,93
61	Mulato Choluteca	21 días	13,75	47,51	28,85	10,25
191	Mulato Choluteca	21 días	12,48	48,87	31,20	7,39
197	Mulato Choluteca	21 días	13,45	49,55	30,97	11,39
628	Mulato Choluteca	21 días	13,75	47,51	28,85	10,25
63	Mulato Uyuca	21 días	14,86	49,33	28,68	8,28
195	Mulato Uyuca	21 días	22,33	41,52	26,15	9,95
630	Mulato Uyuca	21 días	14,86	49,33	28,68	8,28
136	Mulato Yuscaran	21 días	12,44	57,18	35,50	5,93
675	Mulato Yuscaran	21 días	12,44	57,18	35,50	5,93
65	Mulato Zamorano	21 días	11,80	47,05	29,58	8,30
193	Mulato Zamorano	21 días	16,24	47,03	26,54	11,41
164	Pasto desconocido		5,47	64,09	43,33	8,17
271	Pasto elefante	4 semanas	9,74	51,39	41,48	7,48
151	Pasto Mulato		5,43	51,44	38,59	5,63
612	Tanzania	14 a 21 días	10,61	65,54	39,99	4,85
613	Tanzania	14 a 21 días	9,54	66,12	40,93	5,02
614	Tanzania	14 a 21 días	10,11	63,18	40,51	7,16
615	Tanzania	14 a 21 días	8,22	65,44	44,57	6,93
616	Tanzania	14 a 21 días	9,91	61,65	42,30	7,19
617	Tanzania	14 a 21 días	12,95	62,32	39,47	7,09
618	Tanzania	14 a 21 días	13,98	63,31	41,82	9,93
619	Tanzania	14 a 21 días	15,24	65,92	41,59	10,04
685	Tanzania	14 a 21 días	8,22	63,00	44,57	6,93
694	Tanzania	14 a 21 días	15,24	65,74	41,59	10,04
695	Tanzania	14 a 21 días	10,80	65,54	39,99	4,85
696	Tanzania	14 a 21 días	10,29	66,12	40,93	5,02
697	Tanzania	14 a 21 días	13,39	62,89	40,72	7,09
703	Tanzania	14 a 21 días	13,98	60,75	41,82	5,63
711	Tanzania	2 a 3 semanas	9,91	61,65	42,30	7,19
725	Tanzania	14 a 21 días	8,22	62,34	44,57	6,93
590	Tobiatá	14 a 21 días	6,59	59,09	40,02	14,32
591	Tobiatá	14 a 21 días	12,14	62,55	35,80	6,93

Código	Tipo de pasto	Edad	PC	FND	FAD	Humedad
592	Tobiatá	14 a 21 días	7,14	63,55	39,36	6,36
593	Tobiatá	14 a 21 días	5,18	67,03	45,37	5,97
594	Tobiatá	14 a 21 días	10,24	62,99	40,74	6,70
595	Tobiatá	14 a 21 días	7,20	62,21	43,90	6,97
596	Tobiatá	14 a 21 días	8,22	64,23	44,55	7,68
597	Tobiatá	14 a 21 días	8,75	60,91	41,58	8,36
598	Tobiatá	14 a 21 días	10,09	58,87	39,09	7,93
599	Tobiatá	14 a 21 días	7,29	63,00	40,27	7,55
600	Tobiatá	14 a 21 días	7,47	64,29	40,39	7,56
601	Tobiatá	14 a 21 días	8,08	63,08	41,36	7,87
602	Tobiatá	14 a 21 días	6,80	64,09	41,13	7,64
688	Tobiatá	14 a 21 días	5,18	67,03	45,37	5,19
693	Tobiatá	14 a 21 días	7,20	62,21	43,90	6,97
699	Tobiatá	14 a 21 días	6,59	59,09	40,02	13,63
700	Tobiatá	14 a 21 días	10,24	63,03	40,74	6,70
701	Tobiatá	14 a 21 días	8,75	60,91	41,58	8,36
702	Tobiatá	14 a 21 días	12,14	63,85	35,80	9,74
704	Tobiatá	14 a 21 días	10,09	58,87	39,09	7,93
706	Tobiatá	14 a 21 días	7,29	63,00	40,27	7,55
716	Tobiatá	14 a 21 días	7,85	62,21	44,55	7,68
717	Tobiatá	14 a 21 días	7,47	64,29	40,39	7,56
719	Tobiatá	14 a 21 días	7,83	64,23	44,55	7,68
726	Tobiatá	14 a 21 días	10,09	58,87	39,09	7,93
62	Tobiatá Choluteca	21 días	12,23	56,29	36,09	7,17
629	Tobiatá Choluteca	21 días	12,23	56,29	36,09	7,17
64	Tobiatá Uyuca	21 días	12,84	58,64	34,78	8,71
188	Tobiatá Uyuca	21 días	9,36	59,07	38,45	10,66
631	Tobiatá Uyuca	21 días	12,84	58,64	34,78	8,67
66	Tobiatá Zamorano	21 días	10,91	55,72	37,28	2,32
186	Tobiatá Zamorano	21 días	14,24	53,46	34,92	7,85
192	Tobiatá Zamorano	21 días	9,18	55,27	35,47	11,62
272	Transvala	4 semanas	3,64	58,72	37,39	7,23
348	Transvala	21 días	7,35	63,42	37,29	18,52
349	Transvala	20 días	11,08	58,84	35,11	17,20
350	Transvala	19 días	9,41	56,70	36,48	15,28
366	Transvala	4 semanas	9,75	59,25	38,25	6,84
372	Transvala	18 días	8,51	64,49	43,15	8,42
274	Transvala	16 días	9,06	62,98	40,06	7,81
605	Transvala	14 a 21 días	13,05	63,44	38,01	5,99
606	Transvala	14 a 21 días	9,31	66,15	38,76	4,54
607	Transvala	14 a 21 días	13,61	66,63	37,80	6,10
608	Transvala	14 a 21 días	6,96	69,38	41,47	5,26
609	Transvala	14 a 21 días	12,25	64,66	39,48	5,30
610	Transvala	14 a 21 días	14,47	62,94	33,32	5,97
611	Transvala	14 a 21 días	13,10	66,81	39,29	6,01
686	Transvala	21 días	5,76	64,09	37,29	18,52
687	Transvala	14 a 21 días	8,51	64,49	43,15	8,42

Código	Tipo de pasto	Edad	PC	FND	FAD	Humedad
689	Transvala	14 a 21 días	12,25	64,66	39,48	5,30
690	TRansvala	14 a 21 días	14,47	62,94	33,32	5,97
691	TRansvala	14 a 21 días	9,31	66,15	38,76	4,56
692	TRansvala	14 a 21 días	13,05	63,44	38,01	5,99
698	Transvala	14 a 21 días	9,75	58,68	38,25	6,84
707	Transvala	20 días	11,08	58,84	35,11	17,20
708	Transvala	14 a 21 días	13,79	58,72	37,80	6,10
709	Transvala	19 días	9,41	56,70	36,48	15,28
710	Transvala	16 días	9,06	62,98	40,06	7,81
712	Transvala	14 a 21 días	6,75	69,38	41,47	5,26
713	Transvala	14 a 21 días	13,10	66,81	39,29	6,01
721	Transvala	20 días	11,08	58,84	35,11	17,20
722	Transvala	19 días	9,41	56,70	36,48	15,28
727	Transvala	14 a 21 días	13,79	58,49	37,80	6,10
		Media	9,85	59,83	37,69	8,66
		Desviación Estd	3,49	5,55	4,67	2,95
		Mínimo	1,89	41,52	26,15	2,32
		Máximo	22,33	73,27	52,39	18,52

Anexo 6. Comparación de datos de composición química de las muestras utilizadas para la validación por métodos de referencia y NIRS.

Resultados de Validación - Análisis de Referencia y NIR

PC		FND		FAD		Humedad	
Referencia	NIR	Referencia	NIR	Referencia	NIR	Referencia	NIR
5,244	5,371	63,742	60,937	36,0815822	38,047	9,817	8,786
5,474	5,822	63,427	60,706	36,3265306	38,042	9,932	8,946
3,922	4,114	66,039	62,807	39,7668038	41,439	9,726	8,742
4,234	4,688	67,479	64,625	39,7002255	40,174	9,474	8,158
4,573	4,423	66,579	63,141	42,4010217	42,376	9,774	8,734
3,101	3,517	67,571	64,791	37,4345198	38,07	10,018	8,934
5,496	5,546	63,938	61,046	42,0008383	41,586	9,214	8,630
3,837	3,623	66,787	64,889	43,2267678	43,056	9,385	8,294
3,229	3,407	68,724	66,265	43,0143605	42,873	9,323	7,727
3,058	3,219	68,783	66,968	36,3278065	39,414	8,803	7,915
4,126	4,623	70,635	66,695	40,0391992	41,069	8,604	7,382
5,222	5,166	66,859	63,182	42,053953	43,625	9,069	7,825
6,471	6,866	66,149	62,008	37,0384866	38,298	9,729	8,329
4,407	4,845	69,011	65,472	39,9488818	41,345	9,352	7,898
7,326	7,640	63,131	58,582	44,184112	43,342	9,599	8,541
6,011	6,696	64,915	61,073	36,3687783	38,553	10,005	8,374
4,220	4,706	68,907	65,379	35,561125	37,21	9,229	8,509
8,133	8,225	62,278	57,850	42,3596939	42,345	9,789	8,781
8,506	8,923	60,397	56,275	39,6812081	40,318	9,611	9,047
5,244	5,153	67,701	63,438	37,1410338	38,232	10,114	8,864
6,582	7,164	64,430	59,694	37,746246	39,567	9,802	9,112
7,369	7,420	62,737	58,978	40,3959044	41,593	9,785	8,494
6,290	6,782	64,987	59,131			10,160	8,728
4,985	5,204	66,872	61,770			9,603	8,708