

Research paper**Ecuaciones de calibración en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales***Near infrared spectroscopy (NIRS) calibration equations to predict nutritional quality parameters of tropical forages*MARTHA LUCÍA MOLANO^{1,2}, MARÍA LUCÍA CORTÉS², PATRICIA ÁVILA², SIRIWAN D. MARTENS² Y LUZ STELLA MUÑOZ¹¹Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. www.palmira.unal.edu.co²Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Palmira, Colombia. www.ciat.cgiar.org**Resumen**

El estudio tuvo como objetivo desarrollar y evaluar ecuaciones de calibración para predecir los parámetros de calidad nutritiva de especies forrajeras tropicales utilizando espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS, por su sigla en inglés). En total fueron analizadas 1,991 muestras de tejido de gramíneas y leguminosas heterogéneas por su edad de rebrote, estado fenológico y partes de las plantas recolectadas, época de muestreo y sitio o lugar de procedencia. En grupos aleatorios de muestras se realizaron análisis químicos de referencia para proteína cruda (n=315), fibra detergente neutro (n=243), fibra detergente ácido (FDA) (n=156), digestibilidad in vitro de la materia seca (n=449) y digestibilidad de fibra detergente neutro (DFDN) (n=238). Las curvas de calibración se calcularon mediante el uso de errores estándar de calibración, validación cruzada (SEVC) y predicción. La precisión de cada ecuación se calculó por el coeficiente de determinación (R^2) y el índice RPD (relación entre la desviación estándar y el SEVC). La validación se realizó con muestras externas resultando coeficientes de correlación (r) >0.90 para los parámetros, con excepción de FDA ($r=0.72$). Los resultados indican que la predicción de los parámetros de calidad nutritiva con el uso de NIRS en forrajes tropicales es confiable y rápida; no obstante la determinación de la fracción de FDA por este método analítico requiere un mayor ajuste para incrementar su confiabilidad.

Palabras clave: Calidad nutritiva, gramíneas, leguminosas, métodos analíticos, nutrición animal.**Abstract**

The objective of this study was to develop NIRS calibration curves to predict nutritional quality parameters of tropical forage species. For this a total of 1,991 samples of tropical forages (grasses and legumes) were employed. These samples showed a high heterogeneity in regrowth age, vegetative state and parts of the plants collected, sampling period and sample origin. Chemical analysis was performed to determine crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber (ADF), in vitro digestibility of dry matter and digestibility of neutral detergent fiber. A group of samples was used for each chemical parameter to develop the calibration curves. The curves were chosen taking into account the standard errors of: calibration; cross validation (SECV); and prediction. To evaluate the accuracy of each equation the coefficient of determination (R^2) and the RPD (ratio performance deviation) index (relation between standard deviation and SECV), which assesses the predictive power of the equations, were calculated. Validation was performed with external samples and results showed correlation coefficients (r) of >0.90 for all parameters except for ADF ($r=0.72$), demonstrating the precision of the predictive equations. However, the determination of ADF by this analytical method requires further work to increase its reliability.

Keywords: Analytical methods, animal nutrition, forage quality, grasses, legumes.

Correspondence: S.D. Martens, Saxon State Office for Environment, Agriculture and Geology, Am Park 3, 04886 Köllitsch, Alemania.
E-mail: siriwan@gmx.net

Introducción

Los forrajes son la principal fuente de alimento para bovinos; por tanto, el conocimiento de su valor nutritivo en forma oportuna y confiable es de vital importancia para el éxito del negocio ganadero, ya que condiciona directamente el desempeño productivo y reproductivo de los animales. Los análisis químicos tradicionales utilizados para determinar la composición de los forrajes representan altos costos en el tiempo, requerimiento de mano de obra calificada, y utilización de reactivos químicos que en algunos casos pueden ser contaminantes peligrosos. La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS, sigla en inglés) es una técnica considerada como una herramienta rápida y confiable para la determinación de parámetros de calidad de forrajes, principalmente gramíneas y leguminosas en pasturas, ensilaje y henos, entre otros (Castro et al. 2005; Ibáñez y Alomar 2008).

El presente trabajo tuvo como objetivo específico desarrollar curvas de calibración NIRS para una rápida y confiable determinación de proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y digestibilidad de fibra detergente neutro (DFDN) en muestras de plantas forrajeras tropicales (gramíneas y leguminosas), con el fin de apoyar programas de selección y mejoramiento de forrajes tropicales.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Calidad de Forrajes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), localizado en el municipio de Palmira (Valle del Cauca, Colombia). El equipo NIRS se mantiene en ambiente estable (21.3 °C y humedad relativa de 53%).

Muestras

En total fueron analizadas 1,991 muestras de forrajes tropicales, de las cuales previamente existían análisis químicos de diferentes parámetros, representando 62 especies de leguminosas herbáceas y arbustivas y 26 especies de gramíneas. Entre las leguminosas se incluyeron *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia* sp., *Centrosema brasilianum*, *Clitoria ternatea*, *Cratylia argentea*, *Cratylia mollis*, *Cratylia* sp., *Desmodium velutinum*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea virgata*, *Flemingia macrophylla*, *Leucaena diversifolia*, *Leucaena* sp., *Leucaena trichandra*, *Stylosanthes guianensis*, *Tadehagi triquetrum* y *Vigna unguiculata*. Entre las gramíneas predominaban híbridos de *Brachiaria* y *Brachiaria humidicola*; además en el parámetro DFDN se utilizaron *B. brizantha*, *B. mutica*, *Axonopus* sp. y

Alopecurus pratensis entre otras. Las muestras provinieron de diferentes localidades en Colombia: Popayán (Cauca), Palmira (Valle del Cauca), Pasto (Nariño) y Santander de Quilichao (Cauca), y distintas edades de rebrote (4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16 y 20 semanas) que crecieron en épocas secas o lluviosas. Para los análisis se utilizaron hojas o plantas enteras.

Obtención de los espectros

Las muestras fueron escaneadas en un equipo monocromador FOSS-NIRSystem II modelo 6500 (Foss NIRSystem, Silver Spring, Washington, USA), con un rango de longitudes de onda de 400 a 2,500 nm de reflectancia. Las muestras fueron colocadas en celdas "simple cup" (Black), circulares metálicas de 3.5 cm de diámetro interno y 1 cm de espesor, provistas de una ventana de cuarzo para muestras en harina [US-ISIH-0307 (FOSS and Infrasoft International, USA, 2005)]. Cada muestra se escaneó por duplicado, utilizando el software ISIScan (IS-2250) versión 2.71 (FOSS and Infrasoft International, USA, 2005). Una vez recolectados los espectros se generó un archivo .nir.

Determinación de composición química de referencia (LAB)

Las muestras de tejido frescas fueron secadas en un horno a 60 °C (gramíneas) o liofilizadas (leguminosas) durante 96 h y pasadas por un molino Thomas Wiley Laboratory Mill Model 4 con mallas de 1 mm. En un número de muestras seleccionadas aleatoriamente se determinaron PC, FDN, FDA, DIVMS y DFDN para análisis de referencia, siguiendo los protocolos propuestos por los autores de las referencias que aparecen en el Cuadro 1. Para la determinación de FDN y FDA se utilizaron submuestras independientes; el procedimiento no fue secuencial. En el proceso de análisis de FDN no se aplicó enzima amilolítica. Se adicionó sulfito de sodio solo en las leguminosas arbustivas que presumiblemente contenían taninos.

Una vez obtenidos los datos de referencia se generó un archivo .txt.

Cuadro 1. Protocolos desarrollados para análisis de referencia (LAB).

Parámetro	Análisis de referencia
PC	Micro Kjeldahl, Temminghoff (2010)
DIVMS	Tilley and Terry modificado por Moore (1970)
FDN	Van Soest et al. (1991)
FDA	Van Soest et al. (1991)
DFDN	Hoffman et al. (2006), Hall and Mertens (2008)

Calibración

Una vez obtenidos los análisis de referencia (LAB) para PC, FDN, FDA, DIVMS y DFDN, la información se guardó en un archivo Excel con extensión .txt para formar un colectivo para cada parámetro. A partir de los archivos creados (.txt y .nir) se generó un archivo .cal utilizando el software WinISI III (IS-1485) version 1.6 (FOSS and Infrasoft International, USA, 2005). Este archivo se sometió a un análisis estadístico RMS (Root Mean Square) para evaluar la repetitividad espectral de los datos (Urbano-Cuadrado 2004). Dependiendo de la complejidad del parámetro se estableció un límite de selección. En los casos de PC, FDA y DIVMS se utilizó un RMS de 6,000, mientras que para FDN y DFDN se trabajó con un RMS de 3,000.

Finalmente, se realizó un primer análisis de componentes principales (PCA) para reducir la variación de referencia, mejorar las características espectrales y excluir muestras denominadas como anómalas u “outliers”, las cuales arrojaran un GH (distancia de Mahalanobis) >3.0 . Una vez depurado el colectivo, se sometió nuevamente a PCA para seleccionar para la validación del 10–20% del número de muestras que conforman el colectivo de calibración.

Para la calibración se implementaron los 3 modelos de regresión disponibles en el programa WinISI: regresión de componentes principales (PCR), cuadrados mínimos parciales (CMP), y cuadrados mínimos parciales modificados (CMPM). Se realizaron diferentes combinaciones de tratamientos matemáticos, donde el primer término indicaba el orden de la derivación o diferenciación (primera o segunda derivada), el segundo término la amplitud o distancia entre segmento a sustraer, el tercer término la longitud del segmento que debería ser suavizado, y el cuarto término el número de veces que se promedió cada segmento. El modelo de corrección implementado fue la combinación de SNV (variable estándar normal) y DETREND, donde SNV corrige los problemas ópticos mientras que DETREND corrige la tendencia de los datos. Las diferentes combinaciones se realizaron con las longitudes de onda completa (400–2,500 nm) e infrarrojo (1,100–2,500 nm).

Selección de las ecuaciones

La selección de las mejores ecuaciones de calibración para cada parámetro está dada por la relación entre el coeficiente de determinación (RSQ) más alto, error estándar de calibración (SEC), error estándar de

validación cruzada ($SEVC$) y error estándar de predicción ($SEPC$) más bajo y homogéneo entre sí (Solis et al. 2001; Alomar et al. 2003; Vásquez et al. 2004). La evaluación de las ecuaciones en relación con su grado de precisión se hizo a través del índice RPD (ratio performance deviation), el cual es una herramienta estadística que evalúa la relación entre la desviación estándar del análisis químico y el error estándar de validación cruzada ($SD/SEVC$), siendo considerada como una ecuación con alto poder de predicción si la relación es >3 (Cozzolino y Moron 2004; Arana et al. 2005; Shenderoy et al. 2010).

Validación

Una vez seleccionadas las ecuaciones, se realizó la validación cruzada utilizando las muestras de los colectivos y la validación externa mediante la determinación del coeficiente de correlación (r) entre datos de referencia y los datos de predicción.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados y verificados con el paquete estadístico SAS 9.2 para LINUX (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2008). Los colectivos definidos para la calibración se sometieron a un análisis de estadísticas descriptivas [media, desviación estándar (DE), valor máximo (max), valor mínimo (min) y coeficiente de variación (CV)]. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, la correlación (r) entre los resultados de referencia (LAB) y los datos de predicción por NIRS; estos análisis fueron realizados tanto con los datos de calibración como de validación. Se usó el test de Kolmogorov-Smirnov (Zar 1984), que consiste en una prueba no paramétrica para determinar la bondad del ajuste entre sí de 2 distribuciones de probabilidad, ya que compara las funciones de distribución empírica de la muestra vs. la que se desea contrastar. Si la probabilidad del estadístico de la prueba es $P>0.05$, no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula, indicando que la distribución de los datos obtenidos a partir del modelo NIRS (predicción) es igual a la distribución de los datos de referencia.

Resultados

En el Cuadro 2 se presenta un resumen de la caracterización química de las muestras utilizadas en la calibración, indicando el número de muestras (N) que conforman cada colectivo con representación de

leguminosas y gramíneas forrajeras. Para el caso de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) se obtuvieron 2 ecuaciones que compartieron las mismas muestras de leguminosas, pero las muestras de gramíneas eran de edades de corte diferentes (5 y 20 semanas). Los resultados mostraron que el coeficiente de variación (% CV) fue amplio y representó la heterogeneidad del colectivo debido a la variabilidad en familia, género, edad de corte, origen de las muestras y partes de la planta cosechada. Estos factores se tomaron en cuenta al momento de generar el colectivo de calibración.

Los resultados de los parámetros estadísticos muestran que la eficiencia predictiva de las ecuaciones expresadas como errores estándar (SEC, SEVC y SEP_C) fue baja (Cuadro 3). El coeficiente de determinación que indica el ajuste del modelo fue de $R^2 > 0.90$. El índice RPD (relación DE/SEVC) fue > 3 lo cual indica que el poder de predicción de las ecuaciones seleccionadas es alto.

Una vez seleccionadas las ecuaciones se realizaron las validaciones respectivas., utilizando las mismas muestras de los colectivos de calibración (Cuadro 3). Los coeficientes de correlación (r) calculados, que relacionan los valores de predicción obtenidos por la técnica NIRS con los de referencia, presentaron valores superiores a 0.90 ($P < 0.001$), lo cual fue confirmado con el test de Kolmogorow-Smirnov (Cuadro 3), con una probabilidad $P > 0.05$.

En el Cuadro 4 se incluyen los parámetros estadísticos de la validación con muestras externas tomando como base al error estándar de predicción (SEP_v), el coeficiente de determinación para validación (R^2_v), los valores GH (distancia de Mahalanobis al centro de la población) y NH (distancia de Mahalanobis al vecino más próximo).

Fue evidente una alta correlación entre la predicción por NIRS y datos de referencia (LAB), con excepción de FDA que presentó una correlación $r = 0.72$.

Cuadro 2. Caracterización química (% en base seca) de las muestras utilizadas en los colectivos de calibración.

Colectivo	N	Media (%)	DE	Min (%)	Max (%)	CV (%)
PC	315	16.4	6.7	4.4	30.6	41.2
FDN	243	55.2	17.3	20.0	79.7	31.4
FDA	156	24.8	7.2	14.5	48.0	29.2
DIVMS ¹ (5 sem)	204	63.3	8.3	32.1	75.0	13.2
DIVMS ¹ (20 sem)	245	56.8	8.7	24.0	72.2	15.4
DFDN	238	37.9	13.9	5.2	58.7	36.6

¹DIVMS incluyendo gramíneas de 5 resp. 20 semanas de rebrote.

N: Número de muestras; DE: Desviación estándar; Min: Valor mínimo; Max: Valor máximo; CV: Coeficiente de variación = (DE/Media) x 100.

Cuadro 3. Parámetros estadísticos y eficiencia predictiva de las ecuaciones de calibración.

Parámetro	N _C	SEC	SEVC	SEP _C	R ²	RPD	r	P
PC	310	0.8	0.9	0.9	0.99	7.3	0.99	0.95
FDN	228	1.5	3.5	3.2	0.99	4.9	0.98	0.98
FDA	155	1.7	2.1	1.6	0.95	3.5	0.97	0.90
DIVMS ¹ (5 sem)	195	1.7	2.0	1.8	0.95	4.4	0.97	0.52
DIVMS ¹ (20 sem)	243	1.8	2.0	1.6	0.96	4.7	0.98	0.92
DFDN	230	2.1	3.2	3.6	0.95	4.4	0.96	0.86

¹DIVMS incluyendo gramíneas de 5 resp. 20 semanas de rebrote.

N_C: Número de muestras para calibración; SEC: Error estándar de calibración; SEVC: Error estándar de validación cruzada (error del NIRS); SEP_C: Error típico de predicción (calibración); R²: Coeficiente de determinación; RPD: Relación DE/SEVC; r: Coeficiente de correlación; P: Probabilidad según test de Kolmogorow-Smirnov.

Cuadro 4. Parámetros estadísticos de validación externa.

Parámetro	N _v	SEP _v	R ² _v	GH	NH	r
PC	32	1.8	0.83	2.6	1.3	0.94
FDN	30	4.0	0.74	0.8	0.1	0.98
FDA	20	4.2	0.52	0.9	0.4	0.72
DIVMS ¹ (5 sem)	21	6.7	0.81	0.0	0.0	0.93
DIVMS ¹ (20 sem)	26	6.3	0.85	4.2	1.9	0.89
DFDN	40	4.3	0.93	0.8	0.1	0.96

¹DIVMS incluyendo gramíneas de 5 resp. 20 semanas de rebrote.

N_v: Número de muestras para validación; SEP_v: Error típico de predicción (validación); R²_v: Coeficiente de determinación (validación); GH: Distancia de Mahalanobis al centro poblacional; NH: Distancia de Mahalanobis al vecino más próximo; r: Coeficiente de correlación.

Discusión

Los resultados de este estudio mostraron una marcada variación en las concentraciones de diferentes parámetros de calidad de los forrajes tropicales evaluados, lo cual sugiere que se usaron muestras muy representativas de la calidad. Según Cozzolino et al. (2003) y Valenciaga y Saliba (2006) no existe un número mínimo definido de muestras para una calibración satisfactoria; no obstante es necesario evaluar productos heterogéneos con un mínimo de 100 muestras. Los colectivos de calibración desarrollados en este trabajo contenían un número superior a 150 muestras para cada parámetro con sus respectivos datos de laboratorio, lo cual sugiere una alta representatividad de las muestras usadas.

Por diseño, los coeficientes de variación (CV) para los diferentes parámetros de calidad medidos en este estudio fueron altos (13.2–41.2%) debido a la heterogeneidad de las muestras en relación con familia, género, especie, partes de la planta cosechada, origen de las muestras y edad de rebrote (Cuadro 2). En DIVMS se ha encontrado un CV del 20.1% para *Panicum maximum* (Vásquez et al. 2004).

Según Shenk y Westerhaus (1996) y Williams (2003) la precisión para la calibración con base en los valores de R² se puede definir en los niveles siguientes: valores de R² entre 0.50 y 0.65 indican que se puede discriminar entre valores altos y bajos (por ej., para selección en mejoramiento genético); valores de R² entre 0.66 y 0.81 para hacer predicciones aproximadas; valores de R² entre 0.82 y 0.90 indican una precisión de las predicciones muy alta; y ecuaciones con valores de R² mayores que 0.91 permiten predicciones excelentes. Con las ecuaciones generadas en este trabajo se obtuvieron R² >0.95 (Cuadro 3) que indican una muy alta confiabilidad de estas ecuaciones para predecir calidad nutritiva de gramíneas y leguminosas forrajeras tropicales.

Como se mencionó anteriormente, la selección de la mejor ecuación de calibración está dada por la relación entre el coeficiente de determinación (R²) más alto y los errores más bajos. Para PC, FDA, DIVMS (5 semanas) y DIVMS (20 sem), los SEC, SEVC y SEP_c registrados presentan una diferencia muy baja. Para FDN y DFDN se encontraron valores con una marcada diferencia en los SEVC y SEP al ser comparados con el SEC (Cuadro 3). Estas diferencias son posiblemente el resultado de la complejidad bioquímica de la pared celular en el grupo de las especies tropicales analizadas.

Cada una de las ecuaciones obtenidas en este trabajo presenta valores de RPD superiores a 3 (Cuadro 3), lo cual representa el valor límite para aceptar una ecuación en función de su capacidad de predicción. El valor de RPD más alto reportado se encontró en PC (7.3) y el más bajo en FDA (3.5). Esto se reflejó en las altas correlaciones (r) obtenidas al comparar los datos de referencia (LAB) con la predicción por NIRS para las mismas muestras de los colectivos de calibración (Cuadro 3), lo que demuestra el alto poder de predicción de las ecuaciones obtenidas en este estudio. Lo anterior fue confirmado al comparar la distribución empírica (test de Kolmogorow-Smirnov) donde se obtuvo en todas las ecuaciones de P>0.05. Esto demostró, además, que existe una alta relación entre la distribución de los datos obtenidos a partir del modelo NIRS y la distribución de los datos de referencia (LAB), mostrando así la alta relación existente entre lo esperado a nivel biológico con lo obtenido en la predicción (Cuadro 3).

Las ecuaciones seleccionadas se validaron con el colectivo de muestras externas (Cuadro 4) obteniendo un R² >0.80, obteniéndose buenas predicciones. Para FDN y FDA, teniendo en cuenta los diferentes niveles de precisión presentados por Williams (2003) para estos parámetros, se sugiere utilizar estas ecuaciones únicamente para discriminar valores altos y bajos, por

ejemplo, en trabajos de selección y mejoramiento genético. Para FDA se sugiere mejorar el colectivo con muestras con valores altos de FDA y de esta forma incrementar la confiabilidad de este método de determinación.

En este estudio se observaron correlaciones de 0.89 ($P < 0.001$) para DIVMS o por encima de 0.90 para otros parámetros. Sin embargo, para FDA se presentó una correlación de 0.72 ($P < 0.001$) entre valores estimados con la ecuación y valores medidos por medio de análisis químico.

En comparación con resultados reportados en trabajos anteriores, las ecuaciones obtenidas en esta investigación presentan una eficiencia de predicción alta, siendo respaldada esta afirmación por estadísticas comparativas donde se obtuvieron correlaciones superiores a 0.90, mostrando así que las ecuaciones generadas pueden ser utilizadas con confianza en análisis de uso rutinario.

Conclusión

Los resultados de esta investigación permitieron comprobar la viabilidad de la técnica NIRS para la predicción de parámetros de calidad en forrajes tropicales, mostrando dicha predicción una alta correlación con los datos de laboratorio y por ende con la información a nivel biológico.

Agradecimientos

Al personal del Programa de Forrajes Tropicales del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); a la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira; a la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Brasil, por el financiamiento; y al Dr. Mario Cuchillo (Programa de Forrajes Tropicales, CIAT) por la revisión y aporte al artículo.

Referencias

- Alomar D; Gallo C; Castañeda M; Fuchslocher R. 2003. Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science* 63:441–450. DOI: [10.1016/S0309-1740\(02\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00101-8)
- Arana I; Jarén C; Arazuri S. 2005. Maturity, variety and origin determination in white grapes (*Vitis vinifera* L.) using near infrared reflectance technology. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13:349–357. DOI: [10.1255/jnirs.566](https://doi.org/10.1255/jnirs.566)
- Castro P; Fernández-Lorenzo B; Valladares J. 2005. Análisis de pastos mediante NIRS. XLV Reunión Científica de la SEEP. Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural. Sesión: Producción Animal, Gijón 2005. Vol. 1:73–80. (Disponible en: <http://goo.gl/GRRDfd>).
- Cozzolino D; Fassio A; Fernández E. 2003. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agricultura Técnica* 63:387–393. DOI: [10.4067/S0365-2807200300040007](https://doi.org/10.4067/S0365-2807200300040007)
- Cozzolino D; Moron A. 2004. Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology* 111:161–173. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2003.08.001](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.08.001)
- Hall MB; Mertens DR. 2008. In vitro fermentation vessel type and method alter fiber digestibility estimates. *Journal of Dairy Science* 91:301–307. DOI: [10.3168/jds.2006-689](https://doi.org/10.3168/jds.2006-689)
- Hoffman PC; Lundberg KM; Bauman LM; Shaver RD. 2006. NDF digestibility: Reference values for forages, byproducts and total mixed rations. *Focus on Forage* Vol. 5, No. 17. University of Wisconsin, Madison, WI, USA. (Disponible en: <http://goo.gl/LS1qfy>).
- Ibáñez L; Alomar D. 2008. Prediction of the chemical composition and fermentation parameters of pasture silage by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Chilean Journal of Agricultural Research* 68:352–359. DOI: [10.4067/S0718-58392008000400005](https://doi.org/10.4067/S0718-58392008000400005)
- Moore J. 1970. Procedure of the two-stage in vitro digestion of forage. In: Harris LE, ed. *Nutrition research techniques for domestic and wild animals*. Vol. 1. Department of Animal Science, Utah State University, Logan, UT, USA. p. 5001–5003.
- Shenderey C; Shmulevich I; Alchanatis V; Egozi H; Hoffman A; Ostrovsky V; Lurie S; Ben Arie R; Schmilovitch Z. 2010. NIRS detection of moldy core in apples. *Food and Bioprocess Technology* 3:79–86. DOI: [10.1007/s11947-009-0256-1](https://doi.org/10.1007/s11947-009-0256-1)
- Shenk JS; Westerhaus MO. 1996. Calibration the ISI way. In: Davies AMC; Williams PC, eds. *Near Infrared Spectroscopy: The future waves*. NIR Publications, Chichester, Reino Unido. p. 198–202.
- Solís M; De Pedro E; Garrido A; García J; Silió L; Rodríguez C; Rodríguez J. 2001. Evaluación de la composición del lomo de cerdo ibérico mediante la tecnología NIRS. Foro de discusión sobre el cerdo ibérico y sus productos derivados. (Disponible en: <http://goo.gl/wE3LB6>).
- Temminghoff EJM. 2010. Methodology of chemical soil and plant analysis. Wageningen University, Wageningen, Países Bajos.
- Urbano-Cuadrado M.; Luque de Castro MD; Pérez-Juan PM; García-Olmo J; Gómez-Nieto MA. 2004. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology: Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines. *Analytica Chimica Acta* 527:81–88. DOI: [10.1016/j.aca.2004.07.057](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.07.057)
- Valenciaga D; Saliba EOS. 2006. La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y sus potencialidades para la evaluación de forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 40:259–267. (Disponible en: www.redalyc.org/pdf/1930/193017723001.pdf).

- Van Soest PJ; Robertson JB; Lewis BA. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74:3583–3597. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vásquez DR; Abadía B; Arreaza LC. 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 Corpoica* 5:49–55. (Disponible en: <https://goo.gl/0v9SsA>).
- Williams PC. 2003. Near-infrared technology – Getting the best out of light: A short course in the practical implementation of near-infrared spectroscopy for the user. PDK Projects Inc., Nanaimo, BC, Canadá.
- Zar JH. 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd Edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

(Received for publication 14 April 2016; accepted 13 July 2016)

© 2016



Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales is an open-access journal published by *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>