


## Estimación de la composición química de granos y pastas proteicas mediante espectroscopia (NIRS-FTIR)



Ricardo Basurto Gutiérrez <sup>a\*</sup>

Ericka Ramírez Rodríguez <sup>a</sup>

Gerardo Mariscal Landín <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, km 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, 76280, Colón, Querétaro, México.

\*Autor de correspondencia: [basurto.ricardo@inifap.gob.mx](mailto:basurto.ricardo@inifap.gob.mx)

### Resumen:

El objetivo de este estudio fue utilizar la espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS) para estimar la composición química de ingredientes para cerdos. Se recolectaron muestras (n=118) de granos (maíz y sorgo) y harinas (soya y canola). Las muestras se analizaron para materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PB), extracto etéreo (EE), fibra detergente neutro (FDN) o fibra detergente ácido (FDA), almidón total (almidón y energía bruta (EB) y fueron escaneadas con un espectrofotómetro FTIR. Con esta información, ecuaciones de calibración (ECS) fueron desarrolladas con el uso de un paquete de programa (TQ Analyst; Thermo Fisher Scientific). La selección de CE se basó en la minimización de los errores estándar de calibración (EEC), de la validación cruzada (EEVC) y de predicción (EEP), y la maximización de los coeficientes de determinación de la calibración ( $R^2_{cal}$ ), y validación. ( $R^2_{val}$ ). El poder predictivo de la ECS se evaluó mediante la estadística RPD (tasa/desviación de predicción). Excepto MS, las estadísticas de MO (0,99, 0,21, 0,39, 0,999, 0,34 y 7,3), PC (0,99, 0,62, 0,95, 0,998; 0,99 y 28,2), EE (0,98, 0,15, 0,31, 0,963, 0,22 y 3,7), FDN (0,98, 0,60, 1,82, 0,962; 1,38 y 3,6), ADF (0,99, 0,70, 1,43, 0,979, 1,04 y 4,6), almidón (0,99, 2,31, 3,34, 0,994; 3,03 y 9,7) y EB (0,98, 22,8, 34,9, 0,976; 36,0 y 4,2),  $R^2_{cal}$ , EE, EEVC,  $R^2_{val}$ , EEP y RPD, respectivamente, apoyan la conclusión de que

los ECS tienen una capacidad predictiva aceptable de la composición química de ingredientes para la alimentación de cerdos.

**Palabras clave:** Espectroscopía, Alimentos, Cerdos.

Recibido: 03/02/2024

Aceptado: 22/04/2025

En las tablas del National Research Council y del Institut National de la Recherche Agronomique se reporta la composición química promedio de los ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de raciones; sin embargo, debido a diferentes factores agronómicos, ambientales o clima bajo los cuales se cultivan las plantas, la composición de los ingredientes locales puede diferir sustancialmente de lo que se muestra en las tablas nutricionales. Aunque el uso de valores tabulares permite tener estimaciones rápidas de la composición química, su uso estaría limitado a ingredientes comunes y de composición conocida<sup>(1)</sup>. Esto hace imperativo el uso del laboratorio para conocer la composición química actual de los ingredientes locales con el objetivo de conocer la calidad de los insumos que se adquieren, y formular raciones que llenen con precisión los requerimientos nutricionales de los animales. Esto sin duda, repercutirá en la mejora de la eficiencia alimenticia y en la reducción de los costos de alimentación.

No obstante, los costos de los análisis químicos y la necesidad de utilizar frecuentemente el laboratorio con el ingreso de cada nuevo lote de ingredientes, puede elevar substancialmente los costos de producción. Una opción viable, es el análisis de los ingredientes mediante la tecnología NIRS, que tienen varias ventajas, ya que si se cuenta con una amplia colección de muestras, se puede generar una ecuación de calibración que prediga con precisión la composición química de los ingredientes de una manera expedita y a un menor costo<sup>(2)</sup>. Así, la tecnología NIRS ha predicho el contenido de humedad, proteína cruda y EE de granos de soya molidos o enteros<sup>(3)</sup> o la composición química (cenizas, proteína cruda, EE, fracciones de fibra, lignina y almidón) de granos de sorgo<sup>(4)</sup> con excelente precisión. Asimismo, con la tecnología NIRS es posible preseleccionar granos intactos de sorgo para el contenido de almidón, amilosa o amilopectina de granos<sup>(5)</sup>. Usualmente la tecnología NIRS se ha utilizado para determinar la composición de ingredientes específicos, por ejemplo sorgo<sup>(4,5,6)</sup> o soya<sup>(3)</sup>; sin embargo, aun cuando el conjunto de ingredientes es amplio respecto a la matriz, es decir, que se incluyen diversos ingredientes, se han obtenido calibraciones robustas que predicen el contenido químico con precisión<sup>(2,7)</sup>. Estas capacidades de la tecnología NIRS han sido aprovechadas ampliamente en la industria de procesamiento de alimentos, ya que la espectroscopía permite evaluar rápidamente varios constituyentes de un gran número de

muestras. Finalmente, existen pocos estudios destinados para el análisis de ingredientes para su uso en la industria porcina.

El objetivo fue desarrollar calibraciones mediante el uso de espectroscopia de reflectancia en el cercano infrarrojo (NIRS, por sus siglas en inglés), basada en la tecnología FT-IR para estimar la composición química de ingredientes destinados a la alimentación de cerdos. De diversos estados de México, se colectaron 118 muestras de ingredientes utilizados para la alimentación de cerdos, de las cuales 28, 30, 30 y 30 muestras correspondieron a grano de maíz, grano de sorgo, pasta de canola y pasta de soya, respectivamente. Las muestras se llevaron al laboratorio de Nutrición Animal del Centro Nacional de Investigaciones en Fisiología y Mejoramiento Animal para su procesamiento.

Cada muestra molida se colocó en una copa (4 pulgadas de diámetro) con una ventana de cuarzo. Así las muestras se expusieron a un espectrofotómetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, 2000-2007<sup>(8)</sup>) equipado con una esfera de integración para generar los espectros de absorbancia en la región electromagnética entre 4,000 y 10,000 ondas  $\text{cm}^{-1}$  en una resolución 4 nm y con 72 escaneos. Con la ayuda del Software OMNIC™ 8.0 (Thermo Fisher Scientific, 2000-2007<sup>(8)</sup>), los valores de las absorbancias se transformaron al  $\log(1/\text{Reflectancia})$  y, entonces, los espectros fueron almacenados en la computadora.

Para obtener las calibraciones individuales para cada componente analítico, se utilizó el programa TQ Analyst (v8.0; Thermo Fisher Scientific ,2000-2007<sup>(8)</sup>) y con un modelo multivariado de cuadrados mínimos parciales (PLS). El pre-tratamiento matemático de los espectros se basó en el grado de la derivada (primera o segunda) y en el filtro Savitzky-Golay, que tienen como finalidad reducir (suavizar) el ruido espectral. Este filtro se basa en el número de puntos del segmento (NP) y el orden del polinomio (OP) a suavizar. Asimismo, las muestras se dividieron en dos grupos: un conjunto se utilizó para el desarrollo del modelo, grupo calibración (GC) y un segundo conjunto para validar el modelo, grupo de validación (GV). Para asegurar la uniformidad de la dispersión de la composición química entre los conjuntos, las muestras se ordenaron en forma ascendente dentro de ingrediente. Se seleccionaron dos muestras para el GC y la siguiente muestra se integró al GV, repitiéndose este procedimiento hasta el final de la lista<sup>(9,10)</sup>.

La selección de la ecuación o modelo de calibración para cada componente se basó en la maximización del coeficiente de determinación de la calibración ( $R^2_{\text{cal}}$ ), y la minimización del error estándar de la calibración (EEC) que evalúa la exactitud del modelo<sup>(11)</sup>:

$$EEC = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} (\hat{y}_{ij} - y_{ij})^2}{N_{\text{cal}}}}$$

Donde,  $\hat{y}_i$  es valor predicho de la  $i$ -ésima muestra del GC,  $y_i$  es el valor actual o de laboratorio de la  $i$ -ésima muestra del GC y  $N_{cal}$  es el número de observaciones del GC.

En una aproximación similar para evaluar la capacidad de predicción del modelo<sup>(12)</sup>, se consideró la maximización del coeficiente de determinación de la validación ( $R^2_{val}$ ), y la minimización del error estándar de la predicción (EEP), que se calculó como:

$$EEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{val}} (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_{val}}}$$

Donde,  $\hat{y}_i$  es valor predicho de la  $i$ -ésima muestra del GC,  $y_i$  es el valor actual o de laboratorio de la  $i$ -ésima muestra del GV y  $N_{val}$  es el número de observaciones del GV.

Además, se realizó una segunda aproximación de la validación interna del modelo<sup>(11,13,14)</sup>, que consiste en determinar el error estándar de la validación cruzada (EEVC) y, además, remueve algo del sesgo cuando el programa calcula el número de factores recomendados (Thermo Fisher Scientific Inc, 2000-2007<sup>(8)</sup>). Para calcular EEVC, se realiza el procedimiento de calibración sin una de las muestras del conjunto y se estiman los estadísticos; el proceso se repite tantas veces como número de muestras en el conjunto de calibración. Al final se calcula el promedio de las desviaciones cuadráticas y se aplica la raíz cuadrada. La ecuación de la EEVC<sup>(12)</sup> es:

$$EEVC = \sqrt{\frac{1}{I_c - 1} \sum_{i=1}^{I_c} (\hat{y}_i - y_i)^2}$$

Donde,  $\hat{y}_i$  es valor predicho con la  $i$ -ésima observación removida,  $y_i$  es el valor actual o de laboratorio de la  $i$ -ésima observación e  $I_c$  es el número de observaciones en el conjunto de calibración.

El programa TQ Analyst v8.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) limita el número máximo (10) de factores o componentes en la ecuación. Adicionalmente, el programa selecciona el modelo con el valor más bajo de EECV.

Para evaluar la robustez y precisión de las ecuaciones de calibración, RPD [tasa de la (error estándar) Predicción a la Desviación (estándar)]. por sus siglas en inglés), específicamente la relación entre el error estándar de la predicción (EEP) y la desviación estándar del GV (DE val)<sup>(9,15,16,17)</sup>:

$$RPD = \frac{DE\ val}{EEP}$$

Donde, DE val= desviación estándar de los valores de laboratorio para el GV y EEP= error estándar de la predicción (EEP).

Así, si  $RPD < 2.3$  el modelo no es confiable y no es recomendado para su uso; si  $RPD > 2.4$  y  $< 3.0$ , indica que modelo tiene una pobre capacidad predicción y solo es útil para una selección muy tosca; si  $RPD > 3.0$  y  $> 4.9$  significa que la calibración tiene una capacidad de predicción buena y puede ser utilizada para una selección aceptable; si RPD está entre 5.0 y 6.4, sugiere que la calibración tiene buena capacidad de predicción y puede usarse para procesos de control de calidad; si  $RPD > 6.5$  y  $> 8.0$  indica que la ecuación de calibración tiene una muy buena capacidad de predicción y se puede usar para fines analíticos o procesos de control<sup>(9)</sup>.

Con los procedimientos y las funciones del paquete estadístico de SAS<sup>(18)</sup>, se evaluó la pendiente entre los valores actuales y predichos del GV, bajo la hipótesis nula de que la pendiente es igual a uno, utilizando el procedimiento REG y la función PROBT. Además, como una medición del sesgo de la predicción NIRS, se evaluó si la diferencia esperada entre los valores actuales y los predichos del GV difiere de cero con el uso del procedimiento TTEST y la función PAIRED. Finalmente, se evaluó la normalidad (Shapiro-Wilk) de la distribución de los errores de predicción con el procedimiento UNIVARIATE. En el laboratorio las muestras se molieron con un molino tipo Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), a través de una criba de 1 mm Ø para su almacenamiento y, entonces, se analizaron para materia seca a 100°C (MS; Método 967.03, AOAC<sup>(19)</sup>), cenizas (CEN, método 942.05, AOAC<sup>(19)</sup>; 600°C x 4 h); materia orgánica (MO; calculado como MO=100-CEN), proteína cruda (PC; método 976.05, AOAC<sup>(19)</sup>), extracto etéreo (EE; método AOAC 920.85, AOCS<sup>(20)</sup>), fracciones de fibra (Van Soest *et al*<sup>(21)</sup>): fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA), reportadas en base a la materia orgánica. El contenido de almidón total se determinó con el kit de Megazyme-L KTSTA (AOAC<sup>(19)</sup>, método 996.11). La determinación del contenido de energía bruta (EB, kcal/kg) se realizó utilizando una bomba calorimétrica adiabática (modelo 1281; Parr, Moline, IL, USA).

En el Cuadro 1 se muestran los estadísticos descriptivos de las variables de estudio del total de las muestras colectadas (T). Se consultaron varias bases de datos: National Animal Nutrition Program<sup>(22)</sup>, NRC<sup>(23)</sup>, Tejada<sup>(24)</sup>, Ramírez *et al.*<sup>(6)</sup> y Feedipedia<sup>(25)</sup> que reportan el número de muestras analizadas, el promedio y la desviación estándar para MS, MO, PC, EE, fracciones de fibra, almidón y EB de los ingredientes analizados en el presente estudio. La mayoría de las medias de los componentes de los ingredientes del presente estudio fueron diferentes ( $P < 0.05$ ) a las medias de Feedipedia<sup>(25)</sup>, exceptuando las medias para MO, EE y almidón del grano de maíz y MO de la pasta de canola. Ramírez *et al*<sup>(6)</sup> analizaron 216

muestras de grano de sorgo para PC (media= 8.2 % y una desviación estándar de 1.09 %); la media de este grupo de muestras resultó ser menor en 0.88 % unidades porcentuales ( $P < 0.05$ ), respecto a la media del contenido de PC de los granos de sorgo del presente estudio. Estas comparaciones podrían sugerir que los valores tabulares deben utilizarse con precaución, ya que diversos factores pueden explicar las diferencias, como son: diferentes técnicas de análisis entre laboratorios, diferencias de las variedades disponibles a través del tiempo, el avance en el mejoramiento genético de las variedades y en el manejo agronómico, entre otros.

**Cuadro 1:** Estadísticos descriptivos para la composición química de granos (maíz y sorgo) y de pastas proteínicas (soya y canola) utilizados para el desarrollo de las ecuaciones NIRS

Variable	Análisis químico			
	Número	Media	Rango	DE
MS	117	90.11	8.24	1.75
MO	115	95.90	8.59	2.86
PC	114	24.21	41.78	17.20
EE	111	2.04	4.44	1.15
FDN	117	12.00	20.16	6.60
FDA	117	8.34	22.86	6.61
Almidón	117	31.40	75.66	31.52
EB	115	4115	601	148

DE= desviación estándar; MS= materia seca (%); MO= materia orgánica (%); PC= proteína cruda (%); EE= extracto etéreo (%); FDN= fibra detergente neutro (% MO); FDA= fibra detergente ácido (% MO), Almidón total (% MS); EB= energía bruta (kcal/kg).

Los componentes de MS, MO, PC, EE, FDN, FDA, almidón y EB de los granos de maíz y de sorgo y de las pastas de canola y de soya para los grupos de GC y GV se muestran en el Cuadro 2. No hay diferencias ( $P > 0.05$ ) en el valor promedio y en la varianza entre los conjuntos; esto sugiere que el método de selección permitió obtener dos grupos, GC y GV, estadísticamente similares

**Cuadro 2:** Estadísticos descriptivos para la composición química actual de granos (maíz y sorgo) y de pastas proteínicas (soya y canola) por grupo calibración (GC) o grupo de validación (GV), utilizados en el desarrollo de las ecuaciones NIRS

Variable	Análisis químico				
	Grupo	Número	Media	Rango	DE
MS	GC	79	90.21	8.24	1.76
	GV	38	89.92	7.02	1.72
MO	GC	77	95.81	8.53	2.90
	GV	38	96.08	7.42	2.83
PC	GC	78	24.04	41.78	17.16
	GV	36	24.58	41.45	17.53
EE	GC	75	2.06	4.12	1.15
	GV	36	1.99	4.35	1.16
FDA	GC	79	12.04	20.16	6.68
	GV	38	11.91	18.63	6.52
FDN	GC	79	8.34	22.30	6.63
	GV	38	8.35	19.71	6.64
Almidón	GC	78	31.17	75.66	31.34
	GV	38	30.75	70.95	31.97
EB	GC	79	4,114	601	148
	GV	36	4,116	456	148

DE= desviación estándar; MS= materia seca (%); MO= materia orgánica (%); PC=proteína cruda (%); EE= extracto etéreo (%); FDN= fibra detergente neutro (% MO); FDA= fibra detergente ácido (% MO); almidón total (% MS); EB= energía bruta (kcal/kg).

Los estadísticos de las ecuaciones de calibración desarrolladas se muestran en el Cuadro 3. Exceptuando el modelo para la variable materia seca, es notorio que los modelos de calibración explicaron más del 96 % de la variación. El modelo de calibración para la materia seca explicó solo el 79 % de la variación de las muestras.

**Cuadro 3:** Estadísticos de las ecuaciones de calibración y validación NIRS para estimar la composición química de ingredientes utilizados en la nutrición de cerdos

Componente	Ecuación de calibración			Calibración interna	Validación			
	N	R <sup>2</sup> cal	EEC	EEVC	N	R <sup>2</sup> val	EEP	RPD
MS	79	0.98	0.26	1.15	38	0.791	0.99	1.74
MO	77	0.99	0.21	0.39	38	0.999	0.34	7.26
PC	78	0.99	0.62	0.95	36	0.998	0.99	28.24
EE	75	0.98	0.15	0.31	36	0.963	0.22	3.74
FDN	79	0.99	0.60	1.82	38	0.962	1.38	3.58
FDA	79	0.99	0.70	1.43	38	0.979	1.04	4.64
Almidón	78	0.99	2.31	3.34	39	0.994	3.03	9.67
EB	79	0.98	22.80	34.9	36	0.976	36	4.24

<sup>1</sup>N= número de muestras; <sup>2</sup>R<sup>2</sup>cal= coeficiente de determinación de la ecuación de calibración; EEC= error estándar de error de calibración; EEVC= error estándar de la validación cruzada; R<sup>2</sup>val=coeficiente de determinación de la ecuación de validación; EEP= error estándar de la predicción; RPD= tasa del error de predicción a la desviación (por sus siglas en inglés); MS= materia seca (%); MO= materia orgánica (%); PC= proteína cruda (%); EE= extracto etéreo (%); FDN= fibra detergente neutro (% MO); FDA= fibra detergente ácido (% MO); almidón total (% MS); EB= energía bruta (kcal/kg).

El estadístico de la validación cruzada (EEVC) se muestra en el Cuadro 3. De acuerdo con Williams<sup>(9)</sup>, la EEVC es útil para detectar muestras atípicas u “outlier” durante el proceso de calibración. Por ejemplo, si el SEP es grande pero más pequeño que el SEC, esto indica la existencia de muestras atípicas que deben identificarse y eliminarse antes de la recalibración. En el presente estudio, los EEVC<sup>(9)</sup> fueron mayores al EEC de cada una de las calibraciones. Asimismo, la EEVC<sup>(9)</sup> indica que es útil para optimizar el pretratamiento matemático de los espectros, al determinar el mejor modelo de los modelos de calibración evaluados, siendo el mejor modelo aquel con el más alto valor de R<sup>2</sup>cal, EEP y el valor mayor de RPD.

En el Cuadro 4 se muestran los factores y los algoritmos que se utilizaron en el pretratamiento matemático de los espectros de los modelos seleccionados, y que se consideraron como los mejores del presente estudio. En el análisis de la variación contenida en los espectros, se determinan los factores ortogonales o fuentes de variación independientes<sup>(8)</sup>, que explican la mayor proporción de la variación. Además, se estableció que el número factores en el modelo no sean mayor a 10 para evitar la sobre-parametrización del mismo<sup>(26)</sup>. El EEP expresa la diferencia entre los valores predichos y los valores actuales de las muestras de validación, por lo que valores bajos se relacionan con modelos de mayor precisión<sup>(27)</sup>. Previo a generar los modelos de calibración, se utilizaron varios procedimientos matemáticos para procesar los espectros con el objetivo de corregir la dispersión, la intensidad de la línea base y la sobreposición de los picos para mejorar la precisión de los modelos de calibración<sup>(28)</sup>. En el presente estudio, se utilizaron el filtro Savitzky-Golay y los procedimientos: multiplicative

scatter correction y standard normal variate. La selección de los métodos para la corrección de los espectros se realizó empíricamente con prueba y error, evaluando la precisión de la calibración y el número factores en la calibración<sup>(17,28)</sup>. En el Cuadro 4, se muestran los valores de los filtros y métodos utilizados para la calibración de cada componente y los valores de la suma de los cuadrados de los errores residuales predichos (PRESS, por sus siglas en inglés).

**Cuadro 4:** Factores y pre-tratamiento matemático de los espectros en el desarrollo de las ecuaciones de calibración NIRS y los estadísticos PRESS

Componente	Derivada <sup>1</sup>	Filtro <sup>2</sup>	NP <sup>3</sup>	OP <sup>4</sup>	Factores <sup>5</sup>	PRESS <sup>6</sup>
MS <sup>7</sup>	1	SG	7	5	7	101.00
MO <sup>8</sup>	1	SG	5	1	6	13.72
PC <sup>9</sup>	1	SG	35	5	8	71.89
EE <sup>10</sup>	1	SG	9	2	9	6.98
FDN <sup>11</sup>	1	SG	7	3	7	268.58
FDA <sup>12</sup>	1	SG	11	3	7	154.62
Almidón <sup>13</sup>	1	SG	21	3	7	818.06
EB <sup>14</sup>	1	SG	13	3	10	84.60

<sup>1</sup>Derivada=1 primer derivada; 2= Savitzky-Golay (filtro matemático);<sup>3</sup>NP= número de puntos del segmento; <sup>4</sup>OP= orden del polinomio; <sup>5</sup>Factores= componentes independientes de la ecuación; <sup>6</sup>PRESS= suma de los cuadrados de los errores residuales predichos; <sup>7</sup>MS= materia seca (%); <sup>8</sup>MO= materia orgánica (%); <sup>9</sup>PC= proteína cruda (%); <sup>10</sup>EE= extracto etéreo (%); <sup>11</sup>FDN= fibra detergente neutro (% MO); <sup>12</sup>FDA= fibra detergente ácido (% MO); <sup>13</sup>almidón total (% MS); <sup>14</sup>EB= energía bruta (kcal/kg).

Idealmente el valor predicho debería variar en una unidad cuando el valor actual en las muestras cambia en una unidad; es decir la pendiente del modelo sería igual a uno. Por lo que, la pendiente de la regresión lineal entre los valores actuales o de laboratorio y los predichos de cada componente fueron evaluados mediante una prueba de *t* con un nivel de confianza del 95% (Cuadro 5). En caso de que la pendiente sea diferente estadísticamente de uno, sugiere que el modelo calibración tiene un sesgo en la estimación<sup>(29,30)</sup>. En la prueba actual, las pendientes de regresión entre los valores actuales y predichos para MS y FDN se detectaron que son diferentes a uno, indicando que existe un sesgo, específicamente en estos casos, la subestimación de la MS y FDN.

**Cuadro 5:** Límites de confianza al 95% de la pendiente entre los valores actuales ( $XX_{LAB}^1$ ) y los predichos ( $XX_{NIRS}^2$ ) y la prueba de  $t$  para determinar si la pendiente ( $\rho$ ) difiere estadísticamente de uno

Componente	$\rho^3$	EEM <sup>4</sup>	$t$ cal <sup>5</sup>	LCI <sup>6</sup>	LCS <sup>7</sup>	Valor $p^8$	Dtn <sup>9</sup>
$MS_{LAB} - MS_{NIRS}^{10}$	0.66	0.077	4.36	0.51	0.82	0.001	$H_A: \rho \neq 1$
$MO_{LAB} - MO_{NIRS}^{11}$	0.96	0.019	1.99	0.92	1.00	0.055	$H_0^1$
$PC_{LAB} - PC_{NIRS}^{12}$	1.01	0.010	0.79	0.99	1.03	0.434	$H_0$
$EE_{LAB} - EE_{NIRS}^{13}$	0.94	0.031	1.81	0.88	1.01	0.079	$H_0$
$FDN_{LAB} - FDN_{NIRS}^{14}$	0.91	0.032	2.88	0.84	0.97	0.007	$H_A: \rho \neq 1$
$FDA_{LAB} - FDA_{NIRS}^{15}$	0.95	0.025	1.90	0.90	1.00	0.065	$H_0$
Almidón <sub>LAB</sub>	-						
Almidón <sub>NIRS</sub> <sup>16</sup>	0.98	0.015	1.30	0.95	1.01	0.202	$H_0$
$EB_{LAB} - EB_{NIRS}^{17}$	0.92	0.040	1.97	0.84	1.00	0.056	$H_0$

<sup>1</sup> $XX_{LAB}$ = valor actual o real de la muestra; <sup>2</sup> $XX_{NIRS}$ =valor estimado por NIRS; <sup>3</sup> $\rho$ = pendiente; <sup>4</sup>EEM= error estándar de la media, <sup>5</sup> $t$  cal= valor del estadístico  $t$ ; <sup>6</sup>LCI= límite de confianza inferior; <sup>7</sup>LCS= límite de confianza superior; <sup>8</sup> $p$ = valor de  $\alpha$  al cual  $H_0: \rho=1$  es rechazada; <sup>9</sup>Dtn= dictamen:  $H_0$ = insuficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula ( $\rho=1$ );  $H_A: \rho \neq 1$ . <sup>10</sup>MS= materia seca (%); <sup>11</sup>MO= materia orgánica (%), <sup>12</sup>PC= proteína cruda (%), <sup>13</sup>EE= extracto etéreo (%); <sup>14</sup>FDN= fibra detergente neutro (% MO); <sup>15</sup>FDA= fibra detergente ácido (% MO), <sup>16</sup>almidón total (% MS); <sup>17</sup>EB= energía bruta (kcal/kg).

En el Cuadro 6 se presenta la comparación de las medias de los valores actuales y predichos, mediante una prueba de medias pareadas. En ninguna de las comparaciones se detectó ( $P > 0.05$ ) que hubiera diferencias entre las medias de los valores actuales y predichos. De acuerdo con John *et al*<sup>(30)</sup>, esto sugiere que los modelos son aplicables para la predicción. Por otro lado, el estadístico RPD tiene como propósito relacionar el error estándar de la predicción (EEP) a la desviación estándar del GC<sup>(9,17)</sup>, con lo cual se puede evaluar la capacidad de predicción del modelo de calibración. Así, los modelos con valores de RPD < 2.3, se consideran que no tienen poder de predicción, así la calibración para estimar la MS (RPD=1.7) no puede ser recomendable para su uso. En contraste, los modelos de calibración para MO, PC y almidón tienen muy buen poder de predicción porque todos sus estadísticos ( $R^2$  y RPD y EEP y EECV) tienen valores altos y bajos, respectivamente. Los modelos para EE, EB, FDN y FDA tienen buen poder de predicción.

**Cuadro 6:** Prueba de medias pareadas para evaluar la diferencia entre métodos ( $XX_{LAB}^1$  vs  $XX_{NIRS}^2$ ) para determinar el contenido químico de ingredientes utilizados en la nutrición de cerdos

Componente	Medias pareadas (unidades porcentuales)					Valor $\alpha^7$
	Diferencia	EEM <sup>3</sup>	LCI <sup>4</sup>	LCS <sup>5</sup>	Df <sup>6</sup>	
$MS_{LAB} - MS_{NIRS}^8$	-0.031	0.160	-0.36	0.29	37	0.85
$MO_{LAB} - MO_{NIRS}^9$	-0.045	0.056	-0.16	0.07	36	0.43
$PC_{LAB} - PC_{NIRS}^{10}$	-0.211	0.164	-0.54	0.12	35	0.21
$EE_{LAB} - EE_{NIRS}^{11}$	0.019	0.037	-0.06	0.09	35	0.62
$FDN_{LAB} - FDN_{NIRS}^{12}$	0.040	0.228	-0.42	0.50	37	0.86
$FDA_{LAB} - FDA_{NIRS}^{13}$	-0.049	0.189	-0.39	0.29	38	0.78
Almidón <sub>LAB</sub>	-					
Almidón <sub>NIRS</sub> <sup>14</sup>	0.248	0.623	-1.01	1.51	38	0.69
	Medias pareadas (kilocalorías / kg)					
$EB_{LAB} - EB_{NIRS}^{15}$	-0.954	6.086	-13.31	11.40	35	0.88

<sup>1</sup> $XX_{LAB}$ = valor actual o real de la muestra; <sup>2</sup> $XX_{NIRS}$ = valor estimado por NIRS; <sup>3</sup>EEM= error estándar de la media; <sup>4</sup>LCI= límite de confianza inferior; <sup>5</sup>LCS= límite de confianza superior; <sup>6</sup>df= grados de libertad de la prueba; <sup>7</sup>Valor  $\alpha$ = al cual  $H_0$ : diferencia entre medias no es diferente de 0 es rechazada; <sup>8</sup>MS= materia seca (%); <sup>9</sup>MO= materia orgánica (%), <sup>10</sup>PC= proteína cruda (%), <sup>11</sup>EE= extracto etéreo (%); <sup>12</sup>FDN= fibra detergente neutro (% MO); <sup>13</sup>FDA= fibra detergente ácido (% MO); <sup>14</sup>almidón total (% MS); <sup>15</sup>EB= energía bruta (kcal/kg).

En el Cuadro 3, se muestra la evaluación estadística (hipótesis nula =1) de las pendientes de regresión entre el valor actual (laboratorio) de los componentes químicos y el valor predicho de las muestras de validación. Se detectó que las pendientes de las ecuaciones para MS y FDN resultaron estadísticamente ( $P < 0.01$ ) diferentes a 1 (0.662 y 0.907, respectivamente), lo que indica que las ecuaciones están subestimando el valor actual de las muestras de validación.

Basados en el algoritmo de cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), se desarrollaron ecuaciones de predicción NIRS para estimar el contenido de proteína y almidón, entre otros componentes de accesiones del cultivo fríjol caupí (*Vigna unguiculata*)<sup>(10)</sup>. Los estadísticos de las ecuaciones de calibraciones fueron  $R^2 = 0.800$  y  $0.997$  y sus errores estándar de calibración  $1.23$  y  $0.063$ ; mientras que los estadísticos de la validación externa fueron  $R^2_{val} = 0.903$  y  $0.997$ ,  $EEM = 0.598$  y  $0.528$  y  $RPD = 2.80$  y  $5.32$  para PC y almidón, respectivamente; los autores<sup>(10)</sup> concluyeron que sus calibraciones tienen buen poder de predicción. Sin embargo, considerando los rangos de RPD que propone Williams<sup>(9)</sup>, el modelo de calibración para proteína cruda tendría un pobre poder de predicción<sup>(10)</sup>. Noel *et al*<sup>(7)</sup> colectaron ( $n = 858$ ) muestras de alimentos que se agruparon en tres diferentes tipos: cereales, subproductos de cereales y raciones para cerdos para

desarrollar ecuaciones de calibración basadas en espectroscopia en el cercano infrarrojo para estimar el contenido de PC, EE, FDN y FDA; las ecuaciones desarrolladas fueron para cada tipo de conjunto de ingredientes o una sola ecuación general que incluía todos los ingredientes. Las ecuaciones de calibración construida con solo muestras de cereales ( $n=212$ ), que incluía granos de trigo, cebada, centeno, sorgo, arroz y triticale, tenían estadísticos aceptables  $R^2_{cal}$  (0.95 y 0.97), EEC (0.04 y 0.08 %),  $R_{val}$  (0.91 y 0.89), EEP (0.55 y 0.40) y RDP (3.26 y 2.35) para PC y EE, respectivamente. En contraste, las ecuaciones de calibración<sup>(7)</sup> para almidón, FDN, FDA y energía bruta, explican relativamente bajos porcentajes de la variación ( $R^2=0.75, 0.89, 0.86$  y  $0.45$ , respectivamente) y sus EEC (3.0 %, 1.24 %, 0.73 % y 59.7 kcal/kg, respectivamente). Asimismo en ese estudio<sup>(7)</sup>, los estadísticos de la validación no son aceptables ( $R^2_{val}$  (0.46, 0.76, 0.49 y 0.46) y EEP (3.39 %, 1.5 %, 0.99 % y 62.11 kcal/kg) para almidón, FDN, FDA y EB, respectivamente).

En el presente estudio las pendientes entre los valores actuales y predichos (Cuadro 5), las pendientes para MS y FDN fueron menores a uno (subestimación), lo que sugiere que por cada unidad porcentual que se incrementa la MS o FDN en la muestra, el NIRS subestimó estos incrementos; la subestimación fue mayor para MS. En contraste, otros autores<sup>(7)</sup> reportaron que las pendientes para proteína cruda y energía bruta fueron similares a uno (1.01 y 0.99, respectivamente); el resto de las pendientes probablemente fueron diferentes a uno (1.07, 0.87, 1.10, 0.80 para EE, almidón, NDF y ADF, respectivamente), ya que no muestran los intervalos de confianza de la pendiente. Considerando la clasificación de RPD para medir la capacidad de predicción de las ecuaciones de calibración<sup>(9)</sup>, solo la ecuación para PC<sup>(7)</sup> tendría buena capacidad de predicción (3.26); sin embargo, este valor de RPD es mucho menor que el reportado en el presente estudio (28.24). Para las calibraciones de EE y FDN<sup>(7)</sup>, reportaron RPD de 2.35 y 2.49, respectivamente, indicando que las calibraciones son útiles para una selección de bajos o altos contenidos. Las calibraciones para EE y FDN del presente estudio tienen buena capacidad de predicción de acuerdo con valores del RPD de 3.74 y 3.58, respectivamente. Cuando Noel *et al*<sup>(7)</sup> construyeron una ecuación de calibración general para todos sus grupos, el incremento de la capacidad de predicción (RPD= 3.54 a 5.11) de sus ecuaciones mejoraron en forma sustancial, exceptuando para la estimación de la EB (RPD= 2.27).

El número de muestras, la diversidad de los matrices o una amplia variación en los contenidos nutricionales de las muestras determinan la construcción de ecuaciones de calibración con un buen poder de predicción. Por ejemplo, el error estándar de la validación se fue reduciendo en forma curvilíneal cuando las calibraciones incluyeron 15, 21,36 y 43 % de las muestras disponibles<sup>(31)</sup>. Estos autores<sup>(31)</sup> sugirieron que el aumento en la variación se debía a la sobreparametrización del modelo cuando el número de muestras en el conjunto de calibración era demasiado pequeño; por lo que recomendaron que las calibraciones incluyan más de 100 muestras, para que el error y el sesgo se acerquen a los valores obtenidos con el total de muestras ( $n=467$ ). Aunque otros autores<sup>(32)</sup> señalan que determinar el número de muestras

para construir modelos de calibración no es fácil, mencionan que las calibraciones basadas en conjuntos con menos de 50 muestras pueden no ser confiables. Asimismo, el número de muestras requeridas para la calibración también depende del tipo de población sobre la cual se desea hacer inferencias; por ejemplo, en una población cerrada que incluye solo muestras del mismo tipo (vg granos de sorgo), se podrían necesitar entre 50 a 100 muestras. En una población abierta, como en el presente estudio, se sugiere que es necesario incluir al menos 150 muestras para construir calibraciones confiables<sup>(31)</sup>. A pesar que los conjuntos de calibración estaban constituidas por 75 a 79 muestras, las calibraciones generadas tienen buena capacidad de predicción, lo que podría ser explicado por la diferencia en la tecnología de los equipos utilizados: monocromadores<sup>(7,31)</sup> vs el FTIR del presente estudio. En un estudio con 328 muestras<sup>(33)</sup> desarrollaron una ecuación de calibración para estimar el contenido de PC de cinco granos de cereal (maíz, sorgo y tres especies de mijos) y el conjunto de muestras tenía un rango del contenido de PC entre 6.0 a 21.5 %. Utilizando el modelo cuadrados mínimos parciales, estos autores<sup>(33)</sup> reportan que los estadísticos de su ecuación de calibración fueron  $R^2_{cal}= 0.90$  y  $EEP= 0.9$  y para la prueba de validación:  $R^2_{val}= 0.86$ , con una pendiente de 0.82,  $EEP= 1.09$  y un  $RPD= 3.08$ , concluyendo que su calibración tiene un excelente poder de predicción cuantitativa. No obstante que en el presente estudio se utilizaron un menor número de muestras, pero con un rango de valores más amplio (41 unidades porcentuales) y diferentes matrices, la mayoría de los estadísticos del presente estudio fueron mejores ( $R^2_{cal}= 0.99$  y  $EEP= 0.62$ ) para las ecuaciones de calibración y de validación:  $R^2_{val}= 0.99$  y  $EEP= 0.62$  y  $RPD= 28.24$ ); solo el error de predicción del presente fue mayor ( $EEP= 0.91$  vs  $0.99$ ), que al del estudio referido<sup>(33)</sup>. En otro estudio con 400 muestras totales<sup>(2)</sup>, desarrollaron y evaluaron ecuaciones de calibraciones, en la región de 4,000 a 25,000 ondas  $cm^{-1}$ , para determinar la composición química de un amplio grupo de ingredientes y raciones, suplementos proteicos y energético, granos y pastas proteicas; Cozzolino<sup>(2)</sup> reportó los siguientes estadísticos  $R^2$ ,  $EEVC$  y  $DE\ val /EEVC$  (0.91, 0.82 % y 2.56; 0.98, 1.3 % y 6.6; 0.93, 1.4 y 3.45; 0.80, 5.3 % y 1.81; 0.92, 1.3 % y 2.94 para el contenido de materia seca, proteína cruda, FDA, FDN y cenizas, respectivamente y concluyó que el NIRS es una técnica que puede ser utilizada para determinar adecuadamente la proteína cruda, FDA y cenizas, la calibración para materia seca podría ser útil solo para seleccionar muestras con alto o bajo contenido de materia seca y, finalmente, la tecnología no pudo estimar la FDN de las muestras. Algo similar ocurrió en el presente estudio. La ecuación de calibración para estimar la materia seca presenta un pobre poder de predicción ( $R^2_{cal}= 0.98$  y  $EEC= 0.26$ ,  $R^2_{val}= 0.79$ ,  $EEP= 0.99$  y  $RPD= 1.74$ ), por lo que, no se recomienda su utilización.

Asimismo, en otro estudio que se realizó para utilizar la tecnología de NIRS para predecir la composición de digesta ileal y de heces de cerdos<sup>(34)</sup>, la ecuación de calibración no tenía poder de predicción ( $R^2_{cal}= 0.87$ ;  $EEC= 0.83$ ,  $EEP= 1.15$  y  $RPD= 1.78$ ). Esta incapacidad de la tecnología NIRS en la estimación de la materia seca podría ser explicada porque la presencia de agua produce dos bandas amplias y dominantes de absorción en las regiones

5,180 y 6,945 ondas/cm<sup>-1</sup> en el espectro NIRS<sup>(35)</sup>, lo que explica que la capacidad de predicción para otros componentes químicos en muestras frescas disminuya<sup>(36)</sup>. Aún en los espectros de muestras secas a 55°C, las dos bandas relacionadas al agua son visibles, por lo que, no es fácil de explicar por qué el poder de predicción de la tecnología NIRS para la materia seca sea baja, siendo específicos para la humedad. Otros componentes tampoco han sido predichos con precisión. Ramírez *et al*<sup>(6)</sup> evaluaron el uso del NIRS para predecir los contenidos de materia seca, proteína cruda y fibra detergente neutro de 216 muestras de grano de sorgo colectadas durante tres años. Las ecuaciones de predicción explicaban el 96 %, 93 % y 74 % de la variación de la población estudiada y con EEP (0.372, 0.186 y 0.838) para materia seca, proteína cruda y fibra detergente neutro, respectivamente. Aunque los autores<sup>(6)</sup> concluyen que el NIRS tienen buena capacidad de predicción, el porcentaje de la variación explicada para FDN podría cuestionar su conclusión.

La energía de las dietas para aves y cerdos proviene primariamente de los granos de cereal, siendo el almidón el constituyente principal de los cereales; de aquí, la importancia de su determinación. Sin embargo, las técnicas de medición del almidón son laboriosas y costosas, por lo que, métodos analíticos produzcan predicciones confiables son de gran importancia en la formulación de raciones para monogástricos. No obstante que la población de muestras del presente tenía dos extremos con significativas diferencias en el contenido de almidón, la ecuación de calibración para almidón explica 99 % de la variación, EEC (2.31 %) y EEP (3.03 %) son bajos, la pendiente no difiere estadísticamente de 1 y el RPD (9.67) indica que tiene un fuerte poder de predicción (Cuadro 3). En un estudio con 400 muestras de cereales y subproductos (trigo, maíz, cebada, salvado de trigo, avena, centeno, germen de maíz y sorgo), Nieto-Ortega *et al*<sup>(37)</sup> desarrollaron una ecuación de calibración global para estimar el contenido de almidón total con 275 muestras y reportaron que los estadísticos para ecuación de calibración fueron R<sup>2</sup>= 0.99 y EEC= 1.53; mientras los estadísticos para la ecuación de validación (R<sup>2</sup><sub>val</sub>= 0.99, EEP= 1.70) y RPD= 9.53. Estos estadísticos reportados por estos autores<sup>(37)</sup> son mejores que los reportados en el presente estudio; sin embargo, la RPD de las ecuaciones de calibración de ambos estudios indica que pueden utilizarse para la estimación cuantitativa.

Con la excepción de la materia seca, se concluye que la espectroscopia NIRS FTIR predice con precisión y confianza el contenido de materia orgánica, proteína cruda, extracto etéreo, energía bruta y las fracciones de fibra detergente neutro y ácido de los principales ingredientes energético y proteínico que se utilizan en las granjas porcícolas.

El NIRS es una herramienta que se puede utilizar rutinariamente para realizar estimaciones precisas de la composición química, a un bajo costo y en corto tiempo. La información liberada puede utilizarse para formular raciones precisas, lo que beneficia a consultores, productores porcícolas y, posiblemente, a unidades de producción de otras especies monogástricas.

### Fuente de financiamiento

Los resultados aquí presentados son parte del proyecto (SIGI: 13202534765) “Mitigación del impacto climático de la producción porcina a través de estrategias alimenticias y de manejo” que cuenta con recursos fiscales del INIFAP.

### Literatura citada:

1. Paternostre L, Millet S, De Boever J. Comparison of feed tables, empirical models and near-infrared spectroscopy to predict chemical composition and net energy of pelleted pig feeds. *Anim Feed Sci Technol* 2023;297:115578. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115578>.
2. Cozzolino D. Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia* 2002;6(2):25-32.
3. Takahash M, Hajika M, Igita K, Sato T. Rapid estimation of protein, oil and moisture contents in whole-grain soybean seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. In (eds Davies AMC, Williams PC) *Near-infrared Spectroscopy: Future Waves*. 7th Proc Int Conf Near-infrared Spectrosc 1996:494–497.
4. Ejaz I, He S, Li W, Hu N, Tang C, Li S, Li M, Diallo B, Xie G, Yu K. Sorghum grains grading for food, feed, and fuel using NIR spectroscopy. *Front Plant Sci* 2021;12:720022. doi:10.3389/fpls.2021.720022.
5. Peiris KHS, Wu X, Bean SR, Perez-Fajardo M, Hayes C, Yerka MK, Jagadish SVK, Ostmeier T, Aramouni FM, Tesso T, *et al.* Near infrared spectroscopic evaluation of starch properties of diverse sorghum populations. *Processes* 2021;9:1942. <https://doi.org/10.3390/pr9111942>.
6. Ramírez RE, Anaya EAM, Mariscal LG. Predicción de la composición química del grano de sorgo mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). *Téc Pecu Méx* 2005;43(1):1-11.
7. Noel SJ, Jørgensen HJH, Knudsen KEB. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) to determine the energy value of individual feedstuffs and mixed diets for pigs. *Anim Feed Sci Technol* 2022;283:115156. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115156>.
8. Thermo Fischer Scientific. TQ Analyst. User’s Guide. 2000-2007. Thermo Fischer Scientific Inc. Madison, WI, USA.
9. Williams P. *Near Infrared Technology: Getting The best out of Light*. SUN PRESS. 2019.

10. Padhi SR, John R, Bartwal A, Tripathi K, Gupta K, Wankhede DP, Mishra GP, Kumar S, Rana JC, Riar A, Bhardwaj R. Development and optimization of NIRS prediction models for simultaneous multi-trait assessment in diverse cowpea germplasm. *Front Nutr* 2022;9:1001551. doi:10.3389/fnut.2022.1001551.
11. Tahmasbian I, Morgan NK, Hosseini BS, Dunlop MW, Moss AF. Comparison of hyperspectral imaging and near-infrared spectroscopy to determine nitrogen and carbon concentrations in wheat. *Remote Sens* 2021;13:1128. <https://doi.org/10.3390/rs13061128>.
12. Forina M, Lanteri S, Casale M. Multivariate calibration. *J Chromat A* 2007;1158(1–2): 61-93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.082>.
13. Stone M. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *J Royal Stat Soc: Series B (Methodological)*. 1974;36(2):111-133. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1974.tb00994.x>.
14. Zeaiter M, Rutledge D. Preprocessing methods. In: Brown SD, Tauler, Walczak B, editors. *Comprehensive chemometrics*. Elsevier. 2009;3.04:121-231. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00074-0>.
15. Nie Z, Tremblay GF, Bélanger G, Berthiaume R, Castonguay Y, Bertrand A, *et al*. Near-infrared reflectance spectroscopy prediction of neutral detergent-soluble carbohydrates in timothy and alfalfa. *J Dairy Sci* 2009;92(4):1702-11. doi:10.3168/jds.2008-1599. PMID:19307652.
16. Andueza D, Muñoz F, Murray I. The prediction of chemical composition and *in vitro* digestibility of samples of *Atriplex halimus* by NIR spectroscopy. In: Ben SH, *et al* editors. *Nutrition and feeding strategies of sheep and goats under harsh climates*. Zaragoza: CIHEAM, 2004:165-168 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 59).
17. Manley, M. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chem Soc Rev* 2014;43(24):8200-8214. doi =10.1039/C4CS00062E.
18. SAS Institute. 2002-2010. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.4 TS Level 1M7 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
19. AOAC. Official methods of analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. 2000.
20. AOAC. Official methods of analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA. 2005.

21. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;74(10):3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
22. National animal nutrition program. Nat Res Supp Project (NRSP-9), USDA <https://animalnutrition.org>.
23. National Research Council. United States-Canadian tables of feed composition: Nutritional data for United States and Canadian feeds. Third Rev. Washington, DC: The National Academic Press. 1982. <https://doi.org/10.17226/1713>.
24. Tejada HI. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. México, DF: Editorial Sistema de Educación Continua en Producción Animal; 1992.
25. Feedipedia. Animal feed resources information system. <https://feedipedia.org>.
26. Belanche A, Weisbjerg MR, Allison GG, Newbold CJ, Moorby JM. Measurement of rumen dry matter and neutral detergent fiber degradability of feeds by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Dairy Sci* 2014;97(4):2361-75. doi:10.3168/jds.2013-7491. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24508438.
27. Parrini S, Acciaioli A, Crovetto A, Bozzi R. Use of FT-NIRS for determination of chemical components and nutritional value of natural pasture. *Italian J Anim Sci* 2018; 17(1):87-91, doi:10.1080/1828051X.2017.1345659.
28. Díaz-Cruz JM, Esteban ME, Ariño C. Exploratory data analysis. In: Chemometrics in electroanalysis. Monographs in electrochemistry. Springer, Cham: 33-67. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21384-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21384-8_3).
29. Givens D, De Boever J, Deaville E. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutr Res Review* 1997;10(1):83-114. <https://doi:10.1079/NRR19970006>.
30. John R, Bhardwaj R, Jeyaseelan C, Bollinedi H, Singh N, Harish GD, *et al.* Germplasm variability-assisted near infrared reflectance spectroscopy chemometrics to develop multi-trait robust prediction models in rice. *Front Nutr* 2022:946255.doi: 10.3389/fnut.2022.946255.
31. Abrams SM, Shenk JS, Westerhaus MO, Barton FE. Determination of forage quality by near infrared reflectance spectroscopy: Efficacy of broad-based calibration equations. *J Dairy Sci* 1987;70:806-813.

32. Deaville ER, Flinn PC. Near-infrared (NIR) Spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. Givens DI, Owen E *et al*, editors. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI, Pub, New York. 2000:301-320.
33. Chadalavada K, Anbazhagan K, Ndour A, Choudhary S, Palmer W, Flynn JR, *et al*. NIR instruments and prediction methods for rapid access to grain protein content in multiple cereals. *Sensors* 2022;22:3710. <https://doi.org/10.3390/s22103710>.
34. Ramos CR, Basurto GR, Ramírez RE, Reis de Souza TC, Mariscal LG. Predicción de la composición química de las heces y digesta ileal de cerdos mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). *Rev Mex Cienc Pecu* 2023;14(3):488-503. doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i3.6175>.
35. Büning-Pfaue H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 2003;82(1):107-115. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00583-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00583-6).
36. Parrini S, Acciaioli A, Franci O, Pugliese C, Bozzi R. Near infrared spectroscopy technology for prediction of chemical composition of natural fresh pastures, *J Appl Anim Res* 2019;47(1):514-520. doi:10.1080/09712119.2019.1675669.
37. Nieto-Ortega B, Arroyo JJ, Walk C, Castañares N, Canet E, Smith A. Near infrared reflectance spectroscopy as a tool to predict non-starch polysaccharide composition and starch digestibility profiles in common monogastric cereal feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol* 2022;285:115214. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115214>.