

Aplicación de la espectroscopía del infrarrojo cercano – NIRS – para determinar el valor nutritivo de variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L)

Application of near infrared spectroscopy – NIRS – to determine the nutritional value of varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L) and red clover (*Trifolium pratense* L)

Carlos Estupiñán M.¹, Fernando Carcelén C.¹, Víctor Hidalgo L.², David Rojas E.³, Oscar Vera C.⁴, Sofía López G.¹, Sandra Bezada Q.^{1,5}

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la aplicabilidad de la espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) para la valoración nutritiva de dos especies forrajeras de importancia en el país: alfalfa (*Medicago sativa* L) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L). Se utilizaron 75 muestras de variedades de alfalfa (SW 8210, WL 625HQ) y 75 de variedades de trébol rojo (Quiñequeli, Kendland) obtenidas de los campos de la Estación Experimental IVITA El Mantaro, región Junín, Perú. Se realizó el análisis proximal determinando el contenido de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), fibra cruda (FC), cenizas totales (CZ) y fibra detergente neutra (FDN) y se hizo la captura del espectro mediante un equipo NIRS. Se elaboraron los modelos de calibración y validación para estimar la capacidad predictiva mediante Cuadrados Mínimos Parciales (PLS), siendo los estadísticos de exactitud y precisión usados el Coeficiente de Correlación (R), Coeficiente de Determinación (R²), Raíz Cuadrada Media del Error de Calibración (RMSEC), Raíz Cuadrada Media del

¹ Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Programa de Investigación y Proyección Social en Carnes, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

³ Centro de Investigaciones IVITA sede El Mantaro, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁴ Proveduría General de Laboratorio, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Universidad Alas Peruanas, Lima, Perú

⁵ E-mail: sbezadaq@unmsm.edu.pe

Recibido: 6 de abril de 2020

Aceptado para publicación: 23 de octubre de 2020

Publicado: 23 de febrero de 2021

Error de Predicción (RMSEP), Proporción del Rango con el Error (RER) y Desviación Residual Predictiva (RPD). Los modelos matemáticos obtenidos muestran que la técnica NIRS posee una capacidad de predicción buena de los componentes nutricionales de PC, CZ y FDN (R^2 : 0.97, 0.99, 0.94; RPD: 2.00, 2.17 y 2.00, respectivamente) para variedades de alfalfa y trébol rojo.

Palabras clave: NIRS, calibración, leguminosa, análisis proximal, fibra detergente neutra

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the applicability of near infrared spectroscopy (NIRS) for the nutritional assessment of two important forage species in the country: alfalfa (*Medicago sativa* L) and red clover (*Trifolium pratense* L). For this, 75 samples of alfalfa varieties (SW 8210, WL 625HQ) and 75 of red clover varieties (Quiñequeli, Kendland) obtained from the paddocks of the IVITA El Mantaro Experimental Station, Junín region, Peru were used. Proximal analysis was performed determining the content of crude protein (CP), ether extract (EE), crude fibre (CF), total ash (TA) and neutral detergent fibre (NDF), and the spectrum was captured using NIRS equipment. The calibration and validation models were developed to estimate the predictive capacity using Partial Least Squares (PLS), and the accuracy and precision statistics used were the Correlation Coefficient (R), Determination Coefficient (R^2), Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC), Root Mean Square of Prediction Error (RMSEP), Ratio of Range to Error (RER) and Residual Predictive Deviation (RPD). The mathematical models obtained showed that the NIRS technique has a good predictive capacity for the nutritional components of CP, TA and NDF (R^2 : 0.97, 0.99, 0.94; RPD: 2.00, 2.17 and 2.00, respectively) for varieties of alfalfa and red clover.

Key words: NIRS, calibration, legume, proximal analysis, neutral detergent fibre

INTRODUCCIÓN

La eficiencia de los sistemas de explotación pecuaria al pastoreo debe basarse en el monitoreo de la calidad nutricional y el estado fenológico de los pisos forrajeros (Houston y Pinchak, 1991). De manera convencional, los ingredientes, insumos y pisos forrajeros, tanto en fresco como los henificados y ensilados son caracterizados nutricionalmente con base al análisis químico. Entre estos, el análisis proximal determina la materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), cenizas totales (CZ) y

fibra cruda (FC), siguiendo los protocolos de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990). El análisis proximal y la determinación de fibra detergente neutra (FDN) por el método Van Soest, se utilizan comúnmente para caracterizar el valor nutricional con razonable precisión; sin embargo, son demandantes de tiempo, de alto costo y los desechos generados son contaminantes del medioambiente.

De este modo, la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, NIRS) mide directamente la composición química de

Cuadro 1. Distribución de variedades de *Medicago sativa* (AL) y *Trifolium pratense* (TR) por semana de corte utilizadas para calibración y validación del NIRS

Set	Especie	Variedad	Semana de corte (muestras)					Total (n)
			3	6	9	12	15	
Calibración	ALF	SW 8210	8	7	4	3	5	50
		WL 625HQ	5	4	5	5	4	
	TR	Quiñequeli	6	6	5	6	5	50
		Kendland	6	4	4	4	4	
Total							100	
Validación	ALF	SW 8210	2	3	2	5	2	25
		WL 625HQ	2	2	2	3	2	
	TR	Quiñequeli	2	2	3	2	3	25
		Kendland	1	3	4	3	2	
Total							50	

los alimentos entre el rango de los 700-2500 nm mediante el método de reflectancia. Actualmente es la técnica de elección a los métodos convencionales con un amplio potencial para obtener valores nutricionales con base a composiciones químicas confiables y rápidas de diversos pisos forrajeros y estados fenológicos sin producir desecho alguno en su utilización (Givens *et al.*, 1997; Bezada *et al.*, 2017).

El potencial del procedimiento NIRS está respaldado por una sistemática valoración convencional de muestras y su respectivo contraste con los espectros de absorción obtenidos, desarrollados, calibrados y validados, los cuales son generados experimentalmente por muestreo para forrajes e insumos de diferentes especies, variedades, tipos, ecotipos, procedencias y estados fenológicos (Marten *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2007; Andueza *et al.*, 2011), por lo que el NIRS puede aplicarse en reemplazo de los métodos tradicionales y convencionales (Liu *et al.*, 2011; Godin *et al.*, 2015).

Las asociaciones de variedades de alfalfa (*Medicago sativa*) y de trébol rojo (*Trifolium pratense*), cultivo forrajero perenne, son especies que por su rendimiento, adaptabilidad, calidad nutricional y alta palatabilidad se constituyen como los recursos forrajeros más importantes en la alimentación de animales al pastoreo en ciertas regiones ganaderas (Albán, 1992; Basigalup y Rossanigo, 2006; Valenciaga y Saliba, 2006; Bojórquez *et al.*, 2015). Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue evaluar la aplicabilidad del NIRS para la valoración nutritiva de variedades de alfalfa [ALF] y de trébol rojo [TR].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron las evaluaciones químicas y espectrales de 75 muestras representativas de ALF y 75 muestras de TR de diferentes semanas de corte y de cuatro variedades originarias de Norteamérica y cultivadas en la Estación Experimental del Instituto Veteri-

nario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), ubicado en El Mantaro, departamento de Junín, Perú (Cuadro 1). Los análisis químicos proximales y espectrales se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal (LBNAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en Lima. Las muestras se colectaron de los campos de cultivo del IVITA en temporada de lluvia (de noviembre a marzo), se desecaron en estufa a 55 °C hasta obtener peso constante y se transportaron hasta el LBNAA para su análisis.

En el LBNAA, las muestras fueron pasadas por molino Thomas Wiley en malla de 1 mm. Se realizó el análisis de Weende, según el protocolo de la AOAC (AOAC, 1990) para determinación de proteína cruda (PC, 988.05), extracto etéreo (EE, 920.39), cenizas totales (CZ, 942.05), fibra cruda (FC, 962.09) y el protocolo de Van Soest (Van Soest *et al.*, 1991) para determinación de fibra detergente neutro (FDN). Para la obtención de los espectros se utilizó un espectrómetro Antaris-FT NIR Analyzer (ThermoFischer), que transforma el resultado de las longitudes de onda de la muestra en un espectro infrarrojo típico; es decir, la radiación no es dispersada.

Los espectros fueron trabajados con el software TQ AnalysTM para la generación de las ecuaciones de calibración y validación, mediante Cuadrados Mínimos Parciales (PLS), entre datos espectrales y resultados del análisis convencional, utilizando rangos entre 1100 y 2400 nm para los constituyentes nutricionales de las especies forrajeras y variedades evaluadas. Para la calibración se seleccionaron 50 espectros de ALF y 50 de TR mediante muestreo aleatorio uniforme. Se utilizaron los siguientes parámetros de exactitud para evaluar la calibración y estimar la capacidad predictiva real (Cozzolino, 2002; Magwaza *et al.*, 2016):

$$(1) R^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{cal} - Y_{mean})^2}{\sum (Y_{cal} - Y_{cc})^2}$$

$$(2) RMSEC = \sqrt{\sum (Y_{cal} - Y_{cc})^2 / n}$$

$$(3) RMSEP = \sqrt{\sum (Y_{pred} - Y_{cc})^2 / n}$$

$$(5) RER = \text{rango} / RMSEP$$

donde: n = número espectros, Y_{act} = valor actual, Y_{mean} = valor promedio, Y_{cal} = valor calculado, Y_{pred} = valor de predicción del atributo, SD = desviación estándar de los valores referenciales, RMSEP = error estándar de la predicción. Las ecuaciones de calibración fueron seleccionadas sobre la base de minimizar el error estándar de la calibración (SEC). El error estándar de la calibración fue calculado por el programa mediante la fórmula: $SEC/V: [(Quim - NIRS)^2 / (n-t-1)]^{1/2}$, donde Quim = valor del método de referencia, NIRS = valor de predicción NIRS, n = número de muestras en la calibración, t = número de términos del modelo de calibración (Conzen, 2014).

Para la validación se usaron los restantes 25 espectros por forraje seleccionado y se realizaron las validaciones de las calibraciones. Se obtuvieron los estándares estadísticos de ajuste para la validación según Westerhaus (1989), tomándose los valores de error estándar de calibración (SEC), coeficiente de determinación (R^2) y error estándar de predicción (SEP). Según Vymazal (2008) y Conzen (2014), para que la validación (predicción) sea considerada buena el mode-

Cuadro 2. Valor mínimo y máximo, rango, promedio, desviación estándar, varianza y coeficiente de variación del set de calibración de *Medicago sativa* (AL) y *Trifolium pratense* (TR) (n=100 muestras) y del set de validación (n = 50 muestras), en base seca

Componente	Calibración									
	PC ¹	PC ²	EE ¹	EE ²	CZ ¹	CZ ²	FC ¹	FC ²	FDN ¹	FDN ²
Mínimo	15.28	15.45	1.50	1.52	7.75	7.68	11.74	11.26	26.80	26.74
Máximo	28.90	28.90	2.78	2.74	12.30	12.48	21.20	20.58	39.37	39.80
Rango	13.62	13.45	1.28	1.22	4.55	4.80	9.46	9.32	12.57	13.33
Promedio	22.20	22.20	2.19	2.19	9.58	9.58	13.79	13.79	33.52	33.52
DE	4.08	4.03	0.25	0.25	1.30	1.30	2.06	1.98	3.84	3.72
Varianza	16.65	16.22	0.06	0.06	1.70	1.68	4.26	3.93	14.73	13.87
CV	0.18	0.18	0.11	0.11	0.14	0.14	0.15	0.14	0.11	0.11
Validación										
Mínimo	15.32	15.01	1.90	1.80	7.80	7.67	11.08	10.46	27.10	26.68
Máximo	29.80	28.26	2.58	2.58	12.28	12.68	20.52	18.21	39.00	40.11
Rango	14.48	13.25	0.68	0.78	4.48	5.01	9.44	7.75	11.90	13.43
Promedio	21.99	22.36	2.18	2.21	9.37	9.53	13.82	13.86	34.04	33.70
DE	3.45	3.18	0.17	0.16	1.28	1.25	2.10	1.78	3.32	3.18
Varianza	11.93	10.13	0.03	0.03	1.64	1.56	4.43	3.16	11.02	10.09
CV	0.16	0.14	0.08	0.07	0.14	0.13	0.15	0.13	0.10	0.09

PC: proteína cruda, EE: extracto etéreo, CZ: cenizas totales, FC: fibra cruda, FDN: fibra detergente neutra, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

¹Valor calculado de la referencia (LBNAA)

²Valor calculado de la predicción (NIRS)

lo debe tener alto R y R², bajo RMSEC y RMSEP, RER superior a 10 y RPD \geq 2.0.

RESULTADOS

Los resultados de las composiciones químicas de las dos especies forrajeras con sus estadísticos descriptivos para la calibración y validación externa se presentan en el Cuadro 2. Se observa un amplio rango de variabilidad en los resultados obtenidos de PC,

EE, CZ, FC y FDN debido al estado fenológico de las especies evaluadas en cada componente de la población empleada para la calibración (n = 100 muestras) y por la variación de cada componente de la población para la validación (n = 50 muestras) en base seca para las edades evaluadas. Los valores mínimos reportados corresponden a las edades del forraje comprendidas entre las semanas 12 y 15 y los valores máximos corresponden a las edades comprendidas entre las semanas 6 y 9.

Cuadro 3. Estadísticos descriptivos de calibración y validación de ecuaciones obtenidas para la determinación del análisis químico proximal y fibra detergente neutra de *Medicago sativa* L (ALF) y de *Trifolium pratense* L (TR)

	Calibración				Validación			
	N ₁	R ₁	R ²	RMSEC	N ₂	R ₂	R ² ₂	RMSEP
Proteína cruda	100	0.99	0.97	0.66	50	0.86	0.73	1.82
Extracto etéreo	100	0.99	0.98	0.04	50	0.49	0.24	0.17
Cenizas totales	100	0.99	0.99	0.13	50	0.90	0.80	0.59
Fibra cruda	100	0.96	0.92	0.57	50	0.82	0.67	1.19
Fibra detergente neutra	100	0.97	0.94	0.92	50	0.85	0.73	1.79

N₁: número de muestras calibradas, N₂: número de muestras validadas, R₁: Coeficiente de correlación para calibración, R₂: coeficiente de correlación para validación, R²₁: Coeficiente de determinación para calibración, R²₂: Coeficiente de determinación para validación, RMSEC: raíz cuadrada media del error de calibración, RMSEP: Raíz cuadrada media del error de predicción

En el Cuadro 3 se muestran los estadísticos determinados para las mejores ecuaciones de calibración y validación externa de las muestras de ALF (*Medicago sativa* L) y TR (*Trifolium pratense* L) para los componentes PC, EE, CZ, FC y FDN y los estadísticos R, R², RMSEC y RMSEP.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la desviación residual predictiva (RPD) ≥ 2.0 de ALF (*Medicago sativa*) y de trébol rojo (*Trifolium pratense*), en los constituyentes PC (2.00), CZ (2.17) y FDN (2.00). Las ecuaciones fueron trabajadas en la primera derivada y un Gap (distancia entre puntos de longitudes de onda) y Smooth (eliminación de ruido) no mayor de 5.

Los espectros NIRS en Log1/R de ALF (*Medicago sativa* L) y TR (*Trifolium pratense* L), al evaluar datos espectrales en

Cuadro 4. Estadísticos estimadores de calidad de calibración para análisis químico proximal de ALF (*Medicago sativa* L) y de TR (*Trifolium pratense* L)

	Estadístico		
	TM (a,b,c,)	RER	RPD
PC	1,5,5	7.95	2.00
EE	1,5,5	4.00	1.00
CZ	1,5,5	7.59	2.17
FC	1,5,5	7.93	1.76
FDN	1,5,5	6.65	2.00

TM: Tratamiento matemático; a: Derivada; b: Gap; c: Smooth Savitzky Golay; RER: Proporción de rango de datos con el error; RPD: desviación residual predictiva

PC: proteína cruda, EE: extracto etéreo, CZ: cenizas totales, FC: fibra cruda, FDN: fibra detergente neutra

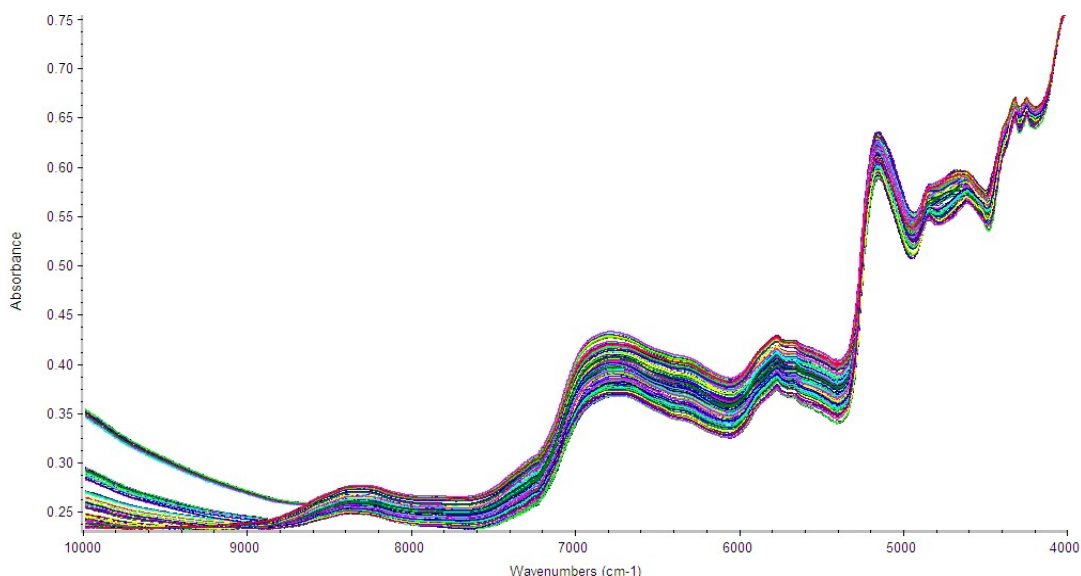


Figura 1. Espectros NIRS en Log1/R y número de ondas de ALF (*Medicago sativa* L) (n=75 muestras) y TR (*Trifolium pratense* L) (n=75 muestras), obtenidas mediante el programa TQ Analyst™

simultáneo, demuestran una gran similitud, dada por la pertenencia a leguminosas de ambas especies forrajeras (Figura 1).

DISCUSIÓN

En los resultados y valores obtenidos para los componentes de PC, EE, CZ, FC y FDN para ALF y TR en evaluación simultánea, se observan rangos de variabilidad muy amplios, tanto en valores actuales (LBNAA) como en los valores calculados (NIRS). Estos datos reflejan la variación propia en el contenido de nutrientes según el estado fenológico y edad de corte de las dos especies forrajeras del presente estudio, lo cual favoreció el desarrollo de las ecuaciones para la calibración NIRS.

En los resultados obtenidos para el componente de PC se observaron valores mínimos de 15.28 y 15.32% en el grupo de calibración y validación, respectivamente, y máximos de 28.90 y 29.80% en el grupo de cali-

bración y validación, respectivamente (Cuadro 2), siendo valores superiores a los reportados por Fernández (2002) y FEDNA (2014); resultados que estarían influenciados por factores como la altitud, época de sembrío, variedades de las especies utilizadas y condiciones del suelo. Bojórquez *et al.* (2015) reportaron valores de 22.70% de PC en alfalfa sembrada en el Valle del Mantaro, pero no especifican la edad de corte de la muestra evaluada. Por otro lado, Pires y Prates (1998) obtuvieron valores de PC entre 19.44 y 28.48% para alfalfa de la variedad americana WL520 sembrada en Rio Grande do Sul (Brasil) cuya altitud media es 120 msnm y de clima subtropical húmedo, en contraste con las características geográficas de la Estación IVITA El Mantaro que se ubica a 3300 msnm y de clima seco. Por su parte, Colombini *et al.* (2005) reportaron valores de PC entre 15.30 y 30.50% en alfalfa cosechada en temporada de lluvia en el norte de Italia, con altitud media de 240 msnm; cuyos valores fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo.

En relación con la FDN, Bojórquez *et al.* (2015) reportaron valores promedio de 40.41% en muestras de alfalfa del Valle del Mantaro, posiblemente en cortes entre la semana 9 y 12, por tratarse de la misma zona altoandina; Pires y Prates (1998) obtuvieron resultados similares en Brasil en el rango de 36.90 y 57.10%, en tanto que Colombini *et al.* (2005) reportaron promedios de 42.50%, sin indicar la variedad empleada. Estos reportes indican que, si bien se trata de estudios en regiones de características climáticas y altitudes diferentes, en el caso de Perú y Brasil se observa buen contenido de PC y FDN, lo que indica la buena adaptabilidad y producción de las variedades de alfalfa norteamericana en suelos de América del sur.

Para los estadísticos de validación y calibración para alfalfa y trébol rojo se tuvo en cuenta lo propuesto por Andrés *et al.* (2005), quienes señalan que para valores comprendidos en el rango 0.95 a más en R y 0.90 en R² la calibración es buena o eficaz; entre 0.84 y 0.94 para R y 0.70 y 0.89 para R² es regular, y menores a 0.83 para R, y entre 0.50 y 0.69 para R² es ineficaz. Con base a esto, el resultado de calibración para la evaluación simultánea de alfalfa y trébol rojo mostró resultados para R y R² eficaces o buenos para todos los constituyentes (Cuadro 3). Asimismo, en los colectivos para validación de la evaluación en simultáneo de alfalfa y trébol rojo se muestran para R y R² valores regulares para PC, CZ y FDN e ineficaces para EE y FC. En este sentido, Cozzolino (2002), estudiando muestras de insumos pecuarios y su uso en el diseño de raciones alimenticias para animales, aplicando la técnica NIRS, obtuvo resultados para la calibración de R² de 0.98 para PC, de 0.93 para FC y de 0.92 para CZ, valores buenos aunque ligeramente por debajo de los hallados en la presente investigación; mientras Keim *et al.* (2015) obtuvieron resultados para R² en PC de 0.99 y en FDN de 0.95 al evaluar pasturas incubadas en rumen. De otra parte, los resultados del estudio fueron similares a los reportados por Pires y Prates (1998) y Colombini *et al.* (2005).

Respecto a los estudios de la aplicación de la técnica NIRS en la valoración nutricional de TR, Nordheim *et al.* (2007) reportaron valores para PC: 15.30%, EE: 3.0%, CZ: 8.0% y FDN *in situ* (incubación ruminal): 45.0% en una mezcla de cultivos perennes en campos de Noruega donde se incluía al TR y especies de *Dactylis*, *Festuca* y *Bromus*, los cuales son similares a los rangos mínimos reportados en el presente trabajo, y R² de 0.51 y RPD de 1.7 para el componente FDN *in situ*. A su vez, Dunea y Motca (2007) obtuvieron valores promedio de PC: 14.90%, EE: 2.90%, y CZ: 7.90% para TR en Rumanía que concuerdan igualmente con los valores del presente estudio (Cuadro 2). Sin embargo, Vargas *et al.* (2018), aplicando NIRS para valoración nutricional de variedades TR asociado a variedades de trébol blanco (*Trifolium repens* L) en cultivos de Colombia obtuvo valores altos de PC: 27.88%, por encima de los reportados en esta investigación, probablemente por el tiempo de corte y la proporción utilizada en la asociación con trébol blanco.

Los valores de RMSEC y RMSEP para todos los componentes de la evaluación de alfalfa y trébol rojo fueron bajos, siendo los mejores valores para los componentes de PC y FDN. Asekova *et al.* (2016) reportaron valores de 0.61 y 0.39 de RMSEC para PC y EE, respectivamente, aplicando la técnica NIRS en evaluación de granos de soya. Magwaza *et al.* (2016) reportaron valores de 0.26 (R²= 0.98) para 104 variedades de camote, en tanto que Vásquez *et al.* (2004) reportaron valores de 0.26 (R²=0.99) en PC, 0.09 (R²= 0.93) para EE, 0.21 (R²= 0.99) para CZ y 0.69 (R²= 95) para FDN en muestras de 18 variedades de pasto guinea en Colombia. En el colectivo evaluado de alfalfa y trébol rojo para los estadísticos estimadores de calidad RER (proporción del rango con el error), los mejores valores correspondieron a PC (2.00), CZ (2.17) y FDN (2.00) (Cuadro 4).

CONCLUSIÓN

Las ecuaciones de calibración y validación NIRS permiten establecer buenas predicciones cuantitativas de los componentes nutricionales de proteína cruda, cenizas y fibra detergente neutra para variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L).

LITERATURA CITADA

1. **Albán R. 1992.** Evaluación de quince variedades de alfalfa en dos localidades de la Sierra Ecuatoriana. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Quito, Ecuador: Univ. Central del Ecuador. 116 p.
2. **Andueza D, Picard F, Jestin M, Andrieu J, Baumont R. 2011.** NIRS Prediction of the feed value of temperate forages: efficacy of four calibration strategies. *Animal* 5: 1002-1013. doi: 10.1017/S1751731110002697.
3. **Andrés L, Murray I, Calleja A, Giráldez F. 2005.** Review: nutritive evaluation of forages by near infrared reflectance spectroscopy. *J Near Infrared Spec* 13: 301-311. doi: 10.1255/jnirs.561
4. **[AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1990.** Official methods of analysis. 15th ed. Vol 1. Arlington, USA: AOAC. 746 p.
5. **Asekova S, Shin D, Lee J, Park S, Han S, Choi H, Kwon C, Shannon J. 2016.** Determination of quality by NIRS in soybean forage. *Turk J Agric For* 40: 45-52. doi: 10.3906/tar-1407-33
6. **Basigalup D, Rossanigo R. 2006.** Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En: Basigalup DH (ed). El cultivo de alfalfa en la Argentina. Argentina: INTA. p 15-25.
7. **Bezada S, Arbaiza T, Carcelén F, San Martín F, López C, Rojas J, Rivadeneira V, et al. 2017.** Predicción de la composición química y fibra detergente neutro de rye grass italiano (*Lolium multiflorum* Lam) mediante espectroscopia de reflectancia en infrarrojo cercano (NIRS). *Rev Inv Vet Perú* 28: 538-548. doi: 10.15381/rivep.v28i3.-13357
8. **Bojórquez C, Rojas J, Ordóñez J. 2015.** Pastos cultivados en el valle del Mantaro. Lima, Perú: Fondo Editorial UNMSM. 147 p.
9. **Chen D, Cai W, Shao X. 2007.** An adaptive strategy for selecting representative calibration samples in the continuous wavelet domain for NIRS analysis. *Anal Bioanal Chem* 387: 1041-1048. doi: 10.1007/s00216-006-0967-3
10. **Colombini S, Confalonieri M, Borreani G, Tabacco E, Peiretti PG, Odoardi M. 2005.** Prediction of the chemical composition and nutritive value of lucerne (*Medicago sativa* L) by Near Infrared Spectroscopy. *Ital J Anim Sci* 4(Suppl 2): 141-143. doi: 10.4081/ijas.2005.2s.141
11. **Conzen JP. 2014.** Multivariate calibration. A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry. *Bruker* 7: 127.
12. **Cozzolino D. 2002.** Uso de NIRS para análisis de alimentos animales. *Agrociencia* 6: 25-32.
13. **Chen D, Cai W, Shao X. 2007.** An adaptive strategy for selecting representative calibration samples in the continuous wavelet domain for NIRS analysis. *Anal Bioanal Chem* 387: 1041-1048. doi: 10.1007/s00216-006-0967-3
14. **Dunea D, Motca GH. 2007.** Forage quality assessments of red clover (*Trifolium pratense* L) through near infrared spectroscopy. *Lucrări stiințifice Zootehnie și Biotehnologii* 40: 274-283.
15. **[FEDNA] Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 2014.** Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Congreso FEDNA 2014.

16. **Fernández H. 2002.** Composición de alimentos para rumiantes. Argentina: EEA INTA Balcarce. 300 p.
17. **Givens D, De Boever J, Deavie ER. 1997.** Principles, practices and future applications of NIRS for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutr Res Rev* 10: 83-114. doi: 10.1079/NRR19970006
18. **Godin B, Agneessens R, Delcarte J, Dardenn P. 2015.** Prediction of chemical characteristics of fibrous plant biomasses from their near infrared spectrum: comparing local versus partial least square models and cross-validation versus independent validations. *J Near Infrared Spec* 23: 1-14. doi: 10.1255/jnirs.1138
19. **Houston J, Pinchak W. 1991.** Range animal nutrition. In: *Grazing management: an ecological perspective*. Timber Press. p 20-53.
20. **Keim JP, Alomar D, Charles H. 2015.** Prediction of crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) in residues of in-situ ruminal degradation of pasture by NIRS. *Anim Prod Sci* 56: 1504-1511. doi: 10.1071/AN14822
21. **Liu X, Han L, Young Z. 2011.** Transfer of near infrared spectrometric models for silage crude protein detector between different instruments. *J Dairy Sci* 94: 5599-5610. doi: 10.3168/jds.2011-4375
22. **Magwaza L, Shimelis H, Messo S, Laurie S, Laing M. 2016.** Development of near infrared reflectance spectroscopy, models for rapid quantification of protein content in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). *Food Sci Technol* 72: 63-70. doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.032
23. **Marten G, Shenk J, Barton F. 1999.** NIRS and analysis of forage quality. *Agriculture Handbook* 643. USA: USDA. 110 p.
24. **Nordheim H, Volden H, Fystro G, Lunnan T. 2007.** Prediction of *in situ* degradation characteristics of neutral detergent fibre (aNDF) in temperate grasses and red clover using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Anim Feed Sci Tech* 139: 92-108. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.11.024
25. **Pires FF, Prates ER. 1998.** Uso de la técnica NIRS para la predicción de la composición química de alfalfa (*Medicago sativa* L). *Rev Bras Zootecn* 27: 1076.
26. **Valenciaga D, Saliba EOS. 2006.** NIRS y potencialidades en la evaluación de forrajes. *Rev Cubana Cienc Agr* 40: 259-267.
27. **Van Soest P, Roberts J, Lewis B. 1991.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583-3597. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
28. **Vargas J, Sierra A, Benavides J, Avellaneda Y, Mayorga O, Ariza C. 2018.** Establecimiento y producción de raigrás y tréboles en dos regiones del trópico alto colombiano. *Agron Mesoam* 29:177-191. doi: 10.15517/ma.v29i1.-28077
29. **Vásquez D, Abadia B, Arreaza L. 2004.** Aplicación de NIRS para la caracterización nutricional de pasto guinea y maíz grano. *Rev Corpoica* 5: 49-55. doi: 10.1016/j.anifeed.2007.09.020.
30. **Vymazal J. 2008.** Waste water treatment, plant dynamics, management in constructed and natural wet lands. Czech Republic: Springer. 348 p.
31. **Westerhaus M. 1989.** Validation. In: *NIRS: analysis of forage quality*. *Agriculture Handbook* 643. USA: USDA. p 40-41.