

**IDENTIFICACIÓN DE HARINAS DE YUCA (*Manihot
esculenta* CRANTZ) CON ALTO CONTENIDO PROTEICO
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO
CERCANO (NIRS)**

PAOLA ANDREA JIMÉNEZ TORRES

Tesis de grado presentada como requisito
parcial para optar al título de Maestra en
Ciencias Agrarias con énfasis en Producción
Animal Tropical.

DIRECTOR

JESUS LARRAHONDO. Quim. Ph.D

Investigador CENICAÑA

CO-DIRECTOR

HERNAN CEBALLOS. Ph.D

Director del programa de Mejoramiento de Yuca del CIAT

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS

PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

SEDE PALMIRA

2007

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
1. INTRODUCCIÓN	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	3
3. HIPÓTESIS	3
3.1. Hipótesis general	3
3.2. Hipótesis específicas	3
4. OBJETIVOS	4
4.1. Objetivo General	4
4.2. Objetivos específicos	4
5. MARCO TEÓRICO	5
5.1. Características del cultivo	5
5.2. Banco de germoplasma.	7
5.3. Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)	8
5.3.1. Ley de Lambert-Beer	9
5.3.2. Bases químicas y Físicas	10
5.3.3. Características de la muestra	13
5.3.4. Transformación de espectros y cálculo de ecuaciones.	13
5.3.5. Criterio de selección de ecuaciones	15
5.3.6. Desventajas del NIRS	15
5.3.7. Recomendaciones	16
5.3.8. Aplicaciones	17
6. MATERIALES Y METODOS	18
6.1 Localización	18
6.2 Materiales	19
6.3 Equipos	19
6.4 Metodología NIRS	20
6.4.1 Preparación de muestras	20
6.4.2. Ecuación de calibración	21
6.4.3. Validación de la Ecuación	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	26
7.1 Adquisición de datos e interpretación de los espectros de harina de yuca	26
7.2 Desarrollo del modelo de calibración	28
7.3 Validación de las Ecuaciones	33
8. CONCLUSIONES	39
9. RECOMENDACIONES	40
10. BIBLIOGRAFIA	41

INDICE DE FIGURAS	Pag
Figura 1. (1) Pelado y picado de raíces, (2) secado de Muestras por liofilización, (3) Molienda, (4) Muestra presentada al NIRS.	20
Figura 2. Equipo NIRS FOSS 6500	21
Figura 3 Frecuencias de harinas de yuca	27
Figura 4. Compendio de espectros NIRS de yuca (166 muestras) de orden cero	28
Figura 5 Correlación entre los valores observados y los esperados en la validación de las dosis preparadas. (A) Ecuación 1, (B) Ecuación 5, (C) Ecuación 7, (D) Ecuación 10.	34
Figura 6. Correlación entre los valores observados y los esperados en la validación simple (A) Ecuación 1, (B) Ecuación 5, (C) Ecuación 7, (D) Ecuación 10.	36

ÍNDICE DE TABLAS	Pag
Tabla 1. Preparación de muestras para validación.	24
Tabla 2. Porcentajes de variación de la población de muestras para calibración.	26
Tabla 3. Ecuaciones probadas para contenido de proteína cruda en harinas de yuca con sus respectivos parámetros estadísticos.	30
Tabla 4. Evaluación de las ecuaciones con relación a su precisión y exactitud.	31
Tabla 5. Resultados de la predicción	32
Tabla 6. Coeficientes de Correlación de Spearman para las once ecuaciones de calibración.	35
Tabla 7. Resumen de análisis de regresión lineal.	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Clones utilizados en la calibración y validación	46
Anexo 2. Contenidos de proteína cruda obtenidos Por el método de referencia (Kjeldahl) y por las ecuaciones probadas	49
Anexo 3 Valores esperados (Kjeldahl) y predichos (NIRS) en validación utilizando la metodología de Dosificación	57
Anexo 4 Valores esperados (Kjeldahl) y predichos (NIRS) En validación simple.	58
Anexo 5 Salidas S.A.S de las validaciones para las ecuaciones seleccionadas.	59

RESUMEN

La espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) fue usada para predecir el contenido de proteína cruda en harina de raíces de clones pertenecientes al banco de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del CIAT. Se usaron 166 muestras para la calibración, las cuales fueron analizadas por el método de referencia para proteína cruda (Kjeldahl) y sus espectros fueron también colectados usando un instrumento monocromador (FOSS NIRsystem 6500) en reflectancia (400-2500 nm). Las ecuaciones de calibración fueron desarrolladas usando cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), se probaron once ecuaciones con diferentes tratamientos matemáticos y diferentes correctivos como la Variación Normal Estándar (SNV) y Detrend. Se seleccionaron cuatro ecuaciones por presentar los mejores parámetros estadísticos en calibración y validación interna (SEC, R, SEP R²). Las ecuaciones seleccionadas para la validación externa fueron: ecuación 1 (none 0,4,3,1), 5 (SNV 0,4,2,1), 7 (SNV 1,4,3,1) y 10 (Detrend 1,1,1,1). Se seleccionó la ecuación 5 por presentar en la calibración un error estándar (SEC) de 0.217, el más bajo error estándar de calibración después de validación (SECV) de 0.235, un error estándar de predicción (SEP) de 0.264 y el más alto coeficiente de determinación (R²) tanto en la validación por dosis como en la validación simple, con 0.99 % y 0.97 % respectivamente. De igual forma presentó las mejores correlaciones 0.99 % y 0.99 %

Palabras Claves: Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano, NIRS, Proteína, harinas de yuca.

1. INTRODUCCIÓN

La harina de raíces de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se ha convertido en una fuente energética alternativa para la alimentación animal en el trópico, debido a su alto contenido de carbohidratos solubles, siendo en este sentido competitiva con el maíz (Buitrago, 1990). El continuo mejoramiento genético orientado a aumentar el contenido de proteína cruda es uno de los retos de los actuales fitomejoradores.

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante y de gran precisión empleada como alternativa a los métodos químicos tradicionales, la cual se basa en la incidencia de la luz sobre una muestra, donde una parte de los fotones es transmitida a través de la misma, siendo el resto absorbido provocando vibración de los enlaces C-H, O-H y N-H que son los componentes principales de la estructura básica de las sustancias orgánicas (Givens and Deaville, 1999). La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Lambert-Beer, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de las moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Alomar y Fuchslocher, 1998, citados por Cozzolino et al, 2003).

El proyecto de mejoramiento genético de yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) tiene por objetivo el desarrollo de clones que cumplan con los requerimientos de calidad culinaria, nutricional y transformación agronómica, combinada con una productividad estable, mediante programas de selección y cruces interespecíficos. Para este propósito cuenta con un valioso Banco de

Germoplasma de yuca de más de 6000 accesiones procedentes de Asia, África y América.

La adaptación de la tecnología NIRS y el descubrimiento de variación genética para el contenido de proteína en raíces de yuca, ofrece una posibilidad única para identificar y mejorar variedades de yuca de alto contenido de proteína en sus raíces.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El hecho de que los actuales métodos cuantitativos y cualitativos de análisis de alimentos son dificultosos, demandan tiempo, mano de obra y son de un elevado costo, (Cozzolino *et al* 2000), y la necesidad del programa de mejoramiento de yuca del CIAT de obtener datos en tiempo real, justifica la necesidad de implementar la nueva tecnología NIRS, que mejore la eficiencia de sus fitomejoradores y permita obtener datos confiables, para lo cual se cuenta con un equipo NIRS el cual debe ser calibrado para los diferentes analitos, en este caso proteína cruda.

3. HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS GENERAL

Es posible identificar harinas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con alto contenido proteico, mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS).

3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- ❖ Se puede determinar la ecuación de calibración para proteína cruda (PC) en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

- ❖ Se pueden seleccionar vía NIRS clones con alto contenido de PC del banco de germoplasma del programa de mejoramiento de yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Identificar harinas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con alto contenido proteico, mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Desarrollar la ecuación de calibración para proteína cruda (PC) en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).
- ❖ Obtener las respectivas curvas y/o validaciones para las determinaciones de proteína cruda basadas en el método primario Kjeldahl.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Características del cultivo

La yuca *Manihot esculenta* Crantz es un arbusto de crecimiento perenne, crece a altitudes desde el nivel del mar hasta los 2300 m.s.n.m. Generalmente se cultiva en zonas tropicales de suelos de fertilidad deficiente. La duración de su ciclo de crecimiento depende de las condiciones ambientales, variando entre 9 y 12 meses en áreas más cálidas y hasta 2 años en regiones frías. El promedio de producción de raíces frescas en Colombia es de 10 t/ha. El principal uso de la raíces de yuca es en la alimentación humana y en la agroindustria como fuente de almidón, sin embargo, se está intensificando el uso tanto de las raíces como del follaje de yuca en la alimentación animal (Alban y Narváez, 2002 y Rosero, 2002).

La producción de materia seca y energía combustible, ubican a la yuca entre los cultivos con mayor demanda en los mercados de los países en desarrollo (Wheatley et al, 1997citado por Bolaños 2006). A escala mundial, el producto se transa, según sus usos en cuanto a mercados principales: como raíz fresca o congelada para consumo humano; como insumo en la industria alimenticia; como materia prima en la industria productora de alimentos balanceados para animales y como producto intermedio en la industria no alimenticia. (<http://www.cci.org.co>)

Aunque las raíces de yuca son deficientes en aminoácidos esenciales y en gran parte de minerales y vitaminas, su valor radica en que es un producto básico en las zonas marginales del mundo como algunas partes de África, Asia y Latinoamérica, en donde se consumen

grandes cantidades de yuca representando la principal fuente de carbohidratos y un aporte a la cantidad total de minerales, vitaminas y algo de proteína consumida por estas poblaciones (Olusola and Yemesi, 2003 citado por Bolaños, 2006).

En años recientes, el uso de materias primas alternativas en la formulación de raciones balanceadas para animales, ha tenido un gran auge. La yuca ha sido utilizada principalmente como fuente de carbohidratos, pero gracias a los avances en fitomejoramiento es posible ahora utilizarla como fuente de proteína logrando ser desde este punto de vista, competitiva con el maíz (*Zea mays*; generalmente utilizado como referencia).

La determinación de proteína cruda se hace actualmente mediante el método Kjeldahl. Este método comprende varias operaciones unitarias, que lo hacen complejo y dispendioso; está fundamentado en una digestión ácida, seguida de una destilación y por último una titulación, identificándose la presencia de varios puntos críticos.

Bromatológicamente el contenido de proteína cruda varía de acuerdo a la fracción de la planta a evaluar. En raíces, (Buitrago, 1990), reporta contenidos en base seca de hasta 2.7 %, (Gil *et al.*, 2002), reporta contenidos de proteína cruda en base seca de 3.19 %. (Frans van Poppel, 2001 reportado por Gil *et al.*, 2002), reportan contenido de proteína cruda en harinas de forraje de yuca proveniente de lámina foliar + peciolo + tallo de 20.20%.

En raíces de yuca, la variación genética en cuanto a contenido de PC es alta, considerándose valores bajos los menores a 2%, medios de 2.1 a 4% y altos por encima de 4.1% de PC (Ceballos, 2006).

5.2 Banco de germoplasma

El CIAT ha realizado investigación en mejoramiento de la yuca desde mediados de los años 70. Algunos criterios de selección empleados por los mejoradores, como el potencial de rendimiento, contenido de materia seca, y contenido de proteína cruda se aplican en los diversos ecosistemas en que se cultiva la yuca. Otros, como la resistencia a enfermedades y a plagas específicas, son propios de un ecosistema dado. La colección general de yuca, dada en fideicomiso por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) a la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT (URG), contiene más de 6000 clones. Comprenden razas nativas de América Latina y de Asia, clones elite seleccionados por el CIAT y por el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), situado en Nigeria, y varias especies silvestres de *Manihot*. El trabajo de selección que hacen los mejoradores del CIAT se centra en un subconjunto más pequeño pero representativo de esa colección, denominada ‘colección básica’. (CIAT 2007)

Una evaluación extensa de 600 genotipos de yuca respecto a su contenido de micronutrientes en las raíces y hojas arrojó información útil sobre la variación genética en las propiedades nutricionales de diferentes tejidos de la yuca. El hallazgo de varios genotipos con niveles de proteína radical por encima de 5% fue muy pertinente. Aunque estos resultados son aún preliminares, fue muy interesante observar que muchos de estos genotipos eran originarios de Meso-América, en particular de Guatemala, lo que indicaría que puede haberse presentado una introgresión de parientes silvestres de *Manihot esculenta* que crecen en esa región. En consecuencia, actualmente se está haciendo un esfuerzo por recuperar accesiones

de esta región que permitan confirmar este resultado (Ceballos, 2002; Ceballos et al, 2006)

Los científicos del CIAT identificaron que MCol 2436, una variedad mejorada de la yuca, produce raíces con niveles de proteína por encima del promedio (entre 7%-9%, en comparación con el usual 2%-3%, peso seco), combinado con niveles más altos de carotenoides provitamina A (7.2 $\mu\text{g/g}$ de raíz fresca), que casi duplica los niveles encontrados en los clones de yuca con raíces de parénquima blanco. Este clon promovió el uso de la yuca en alimentos para animales porque requiere menos aditivos proteicos que el clon de yuca estándar (Ceballos, 2006)

5.3 Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), es una metodología moderna para determinar la composición química de alimentos, suelos, forrajes, etc. Es una técnica no destructiva que no requiere de reactivos. Se basa en la absorbancia que presentan los diferentes compuestos orgánicos en ciertas regiones de longitud de onda (Adesogan 2002; Garrido, 1993, citado por Alomar, 1998).

El NIRS es único por que es no destructivo, no requiere de agentes químicos y es por tanto no contaminante, es una técnica versátil por que se maneja un gran volumen de muestras, y económica después de la inversión inicial del equipo. (Deaville and Flynn, 2000, citados por Adesogan, 2002; Undersander, 2006)

El NIRS es un método computarizado, alternativo y rápido que en vez de utilizar reagentes químicos utiliza luz infrarroja. Así una radiación

infrarroja reflejada es convertida en energía eléctrica y transferida a un computador para su interpretación (Serena *et al.*, 2004)

Cuando se utiliza la tecnología NIRS los pasos a seguir son: Selección de muestras, adquisición de datos, lectura espectral, tratamiento matemático, demostración de ecuaciones, validación y finalmente rutina analítica (Westerhaus ,1994 citado por Saliba *et al.*, 2003).

El NIRS se fundamenta en la quimiométrica, es decir, la aplicación de las matemáticas a la química analítica. Esta técnica combina la espectroscopía, la estadística y la computación y genera modelos matemáticos que relacionan la composición química (presencia de grupos químicos activos) con cambios de energía en la región correspondiente al rango infrarrojo cercano con longitudes de onda entre 800 y 2500 nm (Vásquez *et al.*, 2004).

Las ventajas de esta técnica incluyen el proveer información sobre el valor de un alimento en segundos, ser un método no destructivo, que requiere un mínimo tratamiento de la muestra, minimiza el daño ambiental y es una técnica multianalítica de alta precisión que permite predecir varios factores simultáneamente. Una vez calibrado el espectrofotómetro, el uso del NIRS redunda en bajos costos de análisis para los usuarios que los requieran, por lo cual, a nivel internacional, es una tecnología que tiene amplia acogida. (Reeves, 2000 citado por Vásquez *et al.*, 2004).

5.3.1 Ley de Lambert-Beer

La técnica NIRS obedece a la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido

por la radiación. Es imprescindible mantener un paso óptico constante, con el fin de minimizar los fenómenos de radiación difusa, la cual modifica el paso óptico efectivo (Cozzolino, 2003; Birth and Hetch, 1987).

Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea, el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano es la combinación de bandas de absorciones parciales sobrepuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro (Alomar y Fuchslocher, 1998; Deaville y Flinn, 2000 citados por Cozzolino, 2000).

5.3.2 Bases químicas y Físicas

La esencia de la tecnología NIRS involucra la luz interactuando con un material donde una radiación electromagnética ocurre en forma de ondas, el NIRS utiliza principalmente la región del espectro electromagnético comprendida entre los 700 y los 2500 nm. La longitud de onda es la distancia entre dos picos, que se mide en nanómetros. Las uniones específicas entre átomos vibran a una cierta frecuencia y cada tipo de estas uniones absorben radiación de longitud de onda específica, las otras longitudes de onda no absorbidas serán reflejadas. (Groenewald and Köster, 2006)

Los principales grupos funcionales que responden a la radiación en el infrarrojo cercano son: C-H, O-H, N-H y probablemente S-H y C=O (Shenk and Westerhaus, 1995)

Al absorber energía, los enlaces de las moléculas vibran en dos formas fundamentales: Se extienden aumentando la distancia

interatómica a lo largo del eje entre dos átomos (lo que ocurre a frecuencias más altas o menor longitud de onda) o se doblan (a frecuencias más bajas o mayor longitud de onda). (Workman, 1996 citado por Alomar *et al.*, 1998)

Las vibraciones de extensión pueden ser simétricas o asimétricas y aquéllas que producen pliegues, los pueden ocasionar dentro de un plano como movimientos de tipo “tijera” y oscilaciones; o fuera del plano, en forma de coleteos y torceduras (Sheik and Westerhaus, 1995). El NIRS utiliza para la calibración y validación basados en un método primario, los armónicos y bandas de combinación de las diferentes frecuencias y/o vibraciones correspondientes al infrarrojo mediano de las moléculas presentes en un analito.

Cuando dos átomos se aproximan la repulsión coulombica entre dos núcleos provoca un incremento en la energía potencial. Las moléculas tienen un comportamiento armónico solo cuando la energía potencial es baja, es decir en torno a la posición de equilibrio, los sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente menores. A parte de los sobretonos, en la región NIRS también aparecen las denominadas bandas de combinación, las cuales son debidas al cambio simultaneo en la energía de dos o más modos vibracionales. La intensidad de las bandas de combinación y los sobretonos dependen del grado de anarmonicidad del enlace.

La energía total reflejada por una muestra, es la suma de la reflexión especular (en forma de espejo) más la reflexión difusa, que es aquella temporalmente absorbida y luego re-emitada por la muestra. Esta reflexión difusa aporta información de la composición de la muestra. La reflexión difusa hace indispensable el uso de un computador que

por medio de algoritmos corrige dispersiones de los espectros (Murray, 1993).

Existe una mala interpretación del término reflectancia NIRS, los rayos no son simplemente reflejados de la superficie externa, sino que realmente penetran la muestra, los rayos no absorbidos son diseminados y reflejados en todas las direcciones. Estos haces dispersos pueden ser absorbidos o reflejados por otras uniones químicas, hasta que una porción de los rayos eventualmente sale de la muestra en todas direcciones. La profundidad de penetración del haz dentro de la muestra no está determinado por la posición del detector sino más bien por la potencia de la fuente de luz (Groenewald and Köster, 2006).

Una vez que se irradia la muestra, la luz difusa reflejada (R), es registrada por detectores normalmente de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada en $\log 1/R$ y comunicada a un computador. Al tiempo que el computador recibe la señal digital de luz reflejada, también recibe una que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia le corresponde una longitud de onda lo cual permite el ulterior procesamiento de los datos (Norris, 1989 citado por Alomar, 1998). El NIRS puede leer en forma de reflectancia o en forma de transmitancia, esta última es muy usada en muestras líquidas.

$$A = \log (1/R) \quad \text{o} \quad A = \log (1/T)$$

Donde:

A= absorbancia

T= Transmitancia

R= reflectancia difusa

T= I_s/I_o

I_s = Intensidad de luz que atraviesa la muestra

I_o = Intensidad original del rayo incidente (CENICAÑA, 1999)

5.3.3 Características de la muestra

Para mantener un paso óptico efectivo de la luz que sea constante, las muestras deben ser sometidas a una preparación (molienda) fina y homogénea con molinos de tipo ciclónico y tamaños de partícula pequeños de aproximadamente 1mm (Garrido *et al.*,2000).

El contenido de humedad residual de la muestra varía con el tiempo de conservación en el laboratorio, tiempo transcurrido entre análisis y la lectura NIRS, que pueden explicar los bajos coeficientes de determinación (R^2) en calibración y altos errores estándar de calibración después de validación (SECV). (Cozzolino *et al.*, 2000)

El método de secado en horno no es muy recomendable, para la construcción de ecuaciones de calibración. El secado por liofilización es mejor (Cozzolino *et al.*, 2000)

La pulverización es otra causa principal de variación en resultados analíticos. El tamaño de partícula, la distribución del tamaño de partícula y la señal difusa de reflectancia pueden ser afectado por el molino utilizado en la preparación de la muestra. (Groenewald and Köster, 2006)

5.3.4 Transformación de espectros y cálculo de ecuaciones.

Los datos de reflectancia (R), en la forma de $\log 1/R$, se puede someter a transformaciones, las cuales reducen el efecto de tamaño de partícula, destacando los rasgos del espectro y facilitando el análisis de regresión (Westerhaus, 1989 citado por Alomar, 1998).

Para predecir la composición química de una muestra, se requiere previamente hacer calibraciones, para lo cual se necesita contar con un conjunto amplio de muestras representativas, coleccionar los espectros, analizar las muestras mediante un método de referencia y validar dichas ecuaciones con otras muestras que no formen parte del conjunto de muestras para calibración (Garrido *et al.*, 1993).

La correlación de los datos espectrales y los datos de química húmeda usan múltiples regresiones, análisis de componentes principales y análisis de cuadrados mínimos parciales, siendo este último el más usado (Adesogan, 2002; Blanco, 1994 citado por Vásquez *et al.*, 2004).

Al desarrollar una calibración NIRS, se relaciona mediante un algoritmo la composición físico-química (método de referencia) con la información espectral (óptica), y se debe definir el tratamiento matemático de los datos, el segmento del espectro a incluir y el método de regresión a emplear; este último se hace a través de la aplicación de modelos estadísticos (Cozzolino *et al.*, 2002; Isi, 1992 citado por Alomar, 1998).

No existe un número mínimo definido de muestras para una calibración satisfactoria. Esto depende del analito a predecir y de la naturaleza del producto a evaluar, así para entidades químicas simples de productos homogéneos puede bastar con 30 a 40 muestras, mientras si por el contrario se pretende evaluar el contenido de proteína de productos heterogéneos se requieren un mínimo de 100 muestras (Shenky-Westerhaus, 1993 citados por Alomar, 1998).

5.3.5 Criterio de selección de ecuaciones

El método de selección de ecuaciones de calibración desarrollado en Handbook of Agricultura (Agricultural Research Service, USA, Washington, DC) para el análisis de forrajes por NIRS, establece que para cada componente, el error estándar de calibración (SEC) y el coeficiente de determinación (RSQ) de cada ecuación de calibración, representan criterios importantes para la tomar una decisión respecto de la selección de la ecuación (Vasquez *et al.*, 2004).

La forma de evaluar las ecuaciones NIRS en relación a su precisión y exactitud es a través de la relación entre el desvío estándar del análisis químico y el error estándar de la validación cruzada (SECV/SD), siendo considerada como una ecuación con alto poder de predicción si la relación es menor a 0.33 (Cozzolino *et al.*, 2003).

Se selecciona la ecuación más confiable, que tenga un elevado coeficiente de determinación (R^2) y un bajo error estándar de calibración (SEC). Se tiene en cuenta también el error estándar de predicción (SEP), que debe ser algo mayor al del SEC. Como criterio general, se puede afirmar que una ecuación es considerada como aceptable cuando la magnitud del SEP es menor a un tercio de la desviación estándar de los datos de referencia (Kennedy *et al.*, 1994, citado por Alomar, 1998) (Windhan *et al.*, 1989 citado por Saliba *et al.*, 2003).

5.3.6 Desventajas del NIRS

El alto costo del equipo ha limitado el uso de la técnica, también se ha potencializado la transferencia de errores, los cuales radican en el método de referencia al calibrar el NIR por lo que se hace necesario

estandarizar los procesos y las técnicas en los laboratorios. El uso del NIRS también es limitado por el complicado algoritmo requerido para la calibración (Adesogan, 2002).

Reeves, (2000) citado por Adesogan, 2002, denota que los estimados de calidad de forrajes por medio de NIRS son afectados por el tamaño de partícula, la temperatura, la homogenización de la muestra, la cantidad de muestra presentada al equipo. Otras variables que afectan la precisión de la calibración son la humedad residual en las muestras, escape de luz y una variación larga de la trayectoria (Adesogan, 2002).

5.3.7 Recomendaciones

Es posible la transferencia potencial de errores de las técnicas originales de química húmeda usadas para la predicción, por lo que es recomendable revisar el método primario antes de hacer cualquier tipo de calibración (Beever and Mould, 2000 citado por Adesogan, 2002)

Para la calibración NIRS es fundamental que los datos de química húmeda sean confiables, dos constantes errores en los laboratorios son: 1) Error en la toma de la muestra (la muestra debe ser representativa de la materia prima a analizar) y 2) un pobre procedimiento analítico. Se recomienda para reducir el impacto del segundo tipo de error se sigan los métodos de referencia recomendados y con bajos errores estándar (Urdensander, 2006)

En las calibraciones NIRS otro tipo de error introducido es el número reducido de muestras empleadas en la calibración.

5.3.8 Aplicaciones

Las aplicaciones de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano son numerosas, entre ellas se destacan las fracciones seguras de ciertos análisis como los contenidos de fibras en forrajes tanto frescos como procesados (Cozzolino et al, 2003, Alomar y Fuchslocher, 1998, García y Cozzolino,2006), en la composición química de granos de cereales y alimentos (Ramírez et al, 2005; Vásquez et al, 2004; Büning-Pfaue, 1998; Sabia et al, 2003; Gonzales et al,2006), en la determinación de la cinética de digestión en híbridos de maíz (Jung et al, 1998)

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Localización

Las harinas evaluadas provinieron de clones del banco de germoplasma del programa de mejoramiento de yuca del CIAT que han sido evaluados bajo las condiciones agroclimáticas del mismo centro de investigación.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se encuentra ubicado geográficamente a 3° 30'N y a 76 ° 21'O, en el municipio de Palmira, Departamento del Valle del Geográfico del Río Cauca. A 30 kilómetros al Este de Santiago de Cali. La temperatura promedio anual del CIAT es de 23,74 °C, con una precipitación pluvial promedio de 800 mm anuales, a una altura de 1050 m.s.n.m. y una humedad relativa del 74 %, sus suelos son clasificados según Howeler 1986 como vertisoles, molisoles y alfisoles (Alban y Narvaez, 2002).

Dentro del grupo de muestras utilizadas en la calibración y validación, se encuentran clones provenientes del banco de germoplasma del CIAT, los cuales han sido obtenidos por cruzamientos abiertos, cruzamientos controlados y autofecundaciones, fueron seleccionadas las raíces de plantas de 12 meses de edad, a las cuales fueron retirada la corteza, se rayaron y se les extrajo la humedad por medio de liofilización, las muestras se molieron en un equipo Torrey con criba de 1mm. En el anexo 1, se referencia el listado de los clones utilizados en la Calibración y validación.

Las determinaciones de proteína cruda (PC) se hicieron en el laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT por el método Kjeldahl. La

calibración del equipo de espectroscopía de reflectancia (NIRS), para el analito PC, se hizo en el laboratorio de Pastos y Forrajes del CIAT.

6.2 Materiales

- 166 muestras (harina de raíces de yuca) para calibración del equipo NIRS.
- Bolsas plásticas para la preparación de muestra.
- Reactivos: Ácido sulfúrico H_2SO_4 (96-98%), Hidróxido de sodio NaOH (32%), carbonato de sodio $NaCO_3$, ácido bórico H_3BO_4 (2%), azul de timol, indicador mixto: se prepara con rojo de metilo y verde de bromocresol, catalizador, ácido clorhídrico HCl o H_2SO_4 0.1 N, agua destilada.

6.3 Equipos

- Molino tipo Torrey con mallas de 1 mm,
- Liofilizador
- Equipo monocromador (Equipo NIRS 6500, FOSS- NIRS Systems) en el rango de longitudes de onda de 400 a 2500 nanómetros, en reflectancia.
- Capsulas de cuarzo con diámetro interno de 3.5 cm.
- Material de laboratorio
- Balanza electrónica
- Destilador
- Digestor Buchi y tubos Buchi.
- Titulador automático (Mettler)

6.4 Metodología NIRS

6.4.1 Preparación de muestras

Una vez cosechadas las raíces de las plantas de yuca, se procedió a retirar la corteza y rayar el parénquima, el cual fue congelado para someterlo después a secado por el método de liofilización, el cual conjuga presión y bajas temperaturas. Posteriormente las muestras fueron molidas para garantizar un tamaño de partícula de 1 micra. Figura 1.

Las muestras para la calibración del equipo fueron seleccionadas con bajo, medio y alto contenido de PC (metodología Kjeldhal), con el fin de garantizar una buena variabilidad.



(1)



(2)



(3)



(4)

Figura 1. (1) Pelado y picado de raíces, (2) secado de muestras por liofilización, (3) Molienda, (4) Muestra presentada al NIRS

6.4.2 Ecuación de calibración

Una vez seleccionadas y preparadas las muestras, fueron “escaneadas” en modo de reflectancia utilizando cápsulas en cuarzo, para muestra seca. Las cuales se presentaron a un instrumento monocromador NIRS 6500 FOOS-NIRSystems el cual posee un software de “escaneo” ISIScan versión 1.6, para el manejo de la base de datos de los espectros, se utilizó un software llamado WinISI. Los datos de reflectancia se guardaron como el logaritmo (1/R) (donde R= reflectancia) a 2 nm de intervalo (1.050 datos por muestra). La luz difusa reflejada (R) por la muestra fue registrada en detectores de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada y enviada a una computadora para su almacenamiento y procesamiento (Alomar y Fuchslocher, 1998)

En forma paralela a la señal digital de luz reflejada, la computadora recibió una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia almacenada, le corresponde una longitud de onda. Figura 2



Figura 2. Equipo NIRS FOSS 6500.

El desarrollo de una ecuación NIRS se hace mediante un algoritmo que relaciona la información espectral (óptica) con la información de la composición química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos como son la regresión múltiple, el análisis por componentes principales y los cuadrados mínimos parciales. Posteriormente, se valida la ecuación, lo que se hace con muestras diferentes a las del set de calibración.

Los espectros NIRS obtenidos con este equipo de barrido continuo, pueden ser normalizados o corregidos con el modelo matemático asignado, el cual incluye SNV(Standard Normal Variate) con el cual se corrige los problemas ópticos, DETREND, con el cual se corrige la tendencia de los datos, MSC (Multiplicative Signal Corrected) el cual corrige la dispersión múltiple y que se recomienda cuando se identifican varios grupos de muestras. Con el uso de derivadas se corrige el “off-set” debido a diferencias en el tamaño de partícula, así: la derivada 1, muestra máximos y mínimos de una función y la segunda derivada determina los cambios de concavidad y es la que me genera más picos en el espectro. El “Gap”, determina cada cuántos nanómetros se hacen las derivadas. “Smoot” (Suavizador de puntos), coloca puntos al lado de los puntos principales con el fin de suavizar la curva. Para mejorar el coeficiente de correlación se eliminan los puntos alejados de la línea de calibración.

La reproducibilidad y exactitud del análisis NIRS, depende del tipo de instrumento, de la manera de operarlo, de las características espectrales de la muestra y de las técnicas analíticas de referencia.

El conjunto de valores de diferentes longitudes de onda para una muestra constituye su espectro que representa la “huella dactilar” o “espectro” típico o representativo de la muestra. En este estudio se

desarrollaron las ecuaciones de calibración y predicción usando el método estadístico de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1993). Las ecuaciones de regresión se detallan a continuación:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$$

donde Y representa el parámetro químico o característica (PC, MS.etc); b_0 es el intercepto, b_1 a b_n los coeficientes de la regresión, x_1 a x_n absorbancias a diferentes longitudes de onda.

Las ecuaciones de calibración fueron seleccionadas sobre la base de minimizar el error estándar de la validación cruzada (SECV) y/o el error estándar de la calibración (SEC). El programa utilizado fue WinISI 1.60 de FOSS. El error estándar de la calibración y el de la validación fueron calculados por el programa mediante la fórmula:

$$SEC/V : [(Quim - NIRS)^2 / (n - t - 1)]^{1/2}$$

Donde Quim es el 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 (Shenk y Westerhaus, 1993). Se utilizó la eliminación de datos atípicos que incorpora el programa WinISI 1.60. Muestras con un NH(Distancia de vecindad) > 2,5 y un GH (GH: distancia de Mahalanobis) >3 fueron consideradas atípicas.

6.4.3. Validación de la Ecuación

Después de establecer una ecuación de calibración, es necesario validarla. Esto se hace con un set de muestras diferentes a las utilizadas en la calibración. De estas muestras se debe conocer los datos de química húmeda.

La ecuación seleccionada debe ser capaz de predecir contenidos de proteína cruda altos, medios y bajo, para lo cual se validó las ecuaciones por dos métodos; uno mediante la implementación de la siguiente metodología de dosificación: Se seleccionaron dos clones, uno con alto contenido de proteína cruda y otro con bajo contenido del mismo analito, haciéndose la siguiente combinación, donde la base fueron tres gramos que es la capacidad de la celda de cuarzo del equipo NIRS (Tabla 1).

Tabla 1. Preparación de muestras para validación

<i>Clon bajo en PC</i>		<i>Clon alto en PC</i>		<i>Total</i>
<i>%</i>	<i>gr</i>	<i>%</i>	<i>gr</i>	<i>gr</i>
100	3	0	0	3
75	2.25	25	0.75	3
50	1.5	50	1.5	3
25	0.75	75	2.25	3
0	0	100	3	3

Se hizo también una validación simple, donde se tomó un grupo de 32 muestras que presentaban contenidos bajos, medios y altos de proteína cruda, la cual fue calculada a partir de la determinación del contenido de nitrógeno (Kjeldahl) y multiplicado por la constante de 6.25. Presentando posteriormente las ecuaciones seleccionadas para ver la capacidad de predicción de cada una.

Se seleccionaron las ecuaciones que presentaron los más bajos SEP, tomando como base que una ecuación es considerada como aceptable cuando la magnitud del SEP es menor a un tercio de la desviación estándar de los datos de referencia (Kennedy et al, 1996)

$$SEP = \sqrt{\sum(y-x)^2/n_v-1}$$

Donde:

Y = valor de referencia (laboratorio).

x = Valor predicho por NIRS.

n_v = Número de muestras en el set de validación.

El SEP es un indicador confiable de la calidad de la ecuación desarrollada, ya que a diferencia del SEC, que mejora (disminuye) a medida que se agregan nuevos términos a la ecuación, el SEP mejora sólo hasta que comienza a producirse un sobreajuste de la ecuación, aumentando (empeorando) con cada nuevo término (Westerhaus, 1989 citado por Alomar y Fuchslocher, 1998)

Otro parámetro que se tuvo en cuenta para la selección de la ecuación fue la confiabilidad, mediante un elevado coeficiente de determinación (R^2) y un bajo error estándar de calibración (SEC) (Alomar y Fuchslocher, 1998)

Esta validación puede ser realizada mediante una de las herramientas del programa WinISI "Monitor de resultados" en donde la predicción del contenido de proteína cruda se hace aplicando las ecuaciones seleccionadas a los espectros generados.

En el programa estadísticos S.A.S, se hizo el análisis de regresión lineal para cada ecuación seleccionada y los datos obtenidos en Kjeldahl.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Adquisición de datos e interpretación de los espectros de harina de yuca

El grupo de muestras utilizadas para la calibración de la ecuación para proteína cruda presentan las siguientes parámetros estadísticos respecto a el contenido de esta variable: Promedio de 3.506 %, Un rango de valores entre 0.850 y 11.915, una desviación estándar de 1.5137 y un coeficiente de variación de 0.4317. Tabla 2.

Tabla 2. Porcentajes de variación de la población de muestras para calibración.

Componente	% PC
Rango	0.850-11.915
Promedio	3.506
SD	1.5137
CV	0.4317

En la figura 3 se observa las frecuencias de las 166 muestras de harina de raíces de yuca utilizadas en la calibración del equipo NIRS para el analito proteína cruda, dentro del “Set” de calibración se encuentra una muestra que registró un valor de laboratorio de contenido de proteína cruda de 11.92, resultando sospechoso; sin embargo este valor tan elevado se puede explicar por el bajo contenido de materia seca que presentaba las raíces de donde provino la muestra.

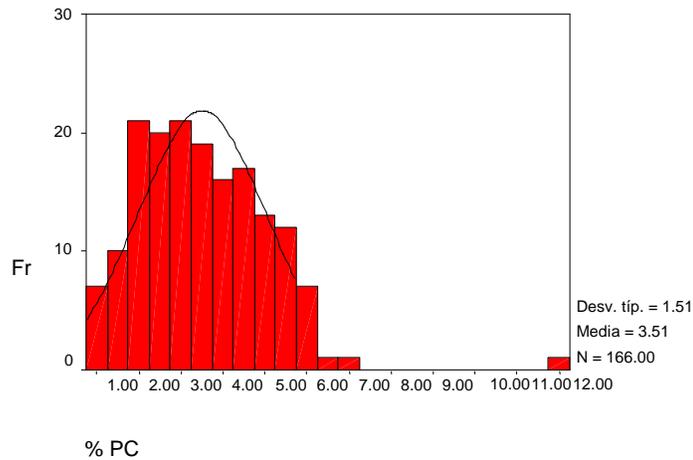


Figura 3 Frecuencias de harinas de yuca

Los espectros infrarrojos son la representación gráfica de la energía absorbida en función de la longitud de onda. Las muestras de harina de yuca fueron colectadas en un rango de 400 a 2500 nm arrojando como resultado las absorciones de cada uno de los constituyentes que conforman la muestra.

En la figura 4 se visualiza los compendios de los espectros logrados colectivamente a partir de las 166 muestras de harina de yuca, orden cero, previa a la corrección por el modelo matemático. En la cual se aprecia las absorciones correspondientes a los sobretonos (700-1800) y a las combinaciones o bandas fundamentales (1890nm a 2500 nm)

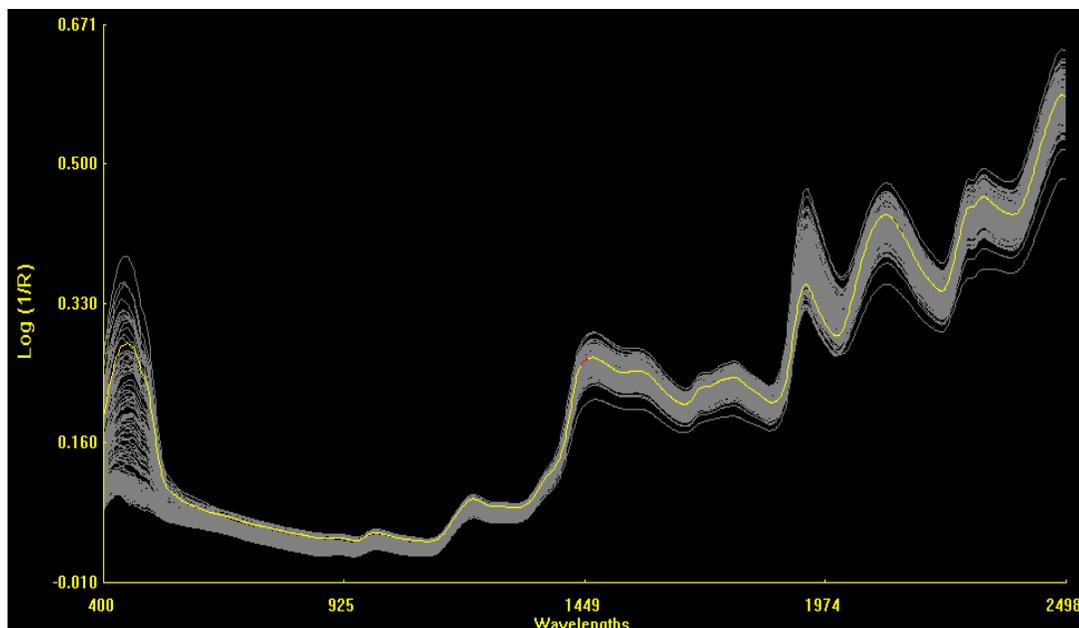


Figura 4. Compendio de espectros NIRS de yuca (166 muestras) de orden cero.

El espectro presentó solapamiento de bandas entre los constituyentes; se seleccionó toda la banda de absorción correspondiente al infrarrojo cercano (1108-2492,8 nm) debido a que el principio del método primario (Kjeldahl) es cuantificar nitrógeno sin diferenciar entre nitrógeno proteico y no proteico.

7.2 Desarrollo del modelo de calibración

Se probaron once ecuaciones de calibración, entre los tratamientos matemáticos aplicados se incluyeron: correcciones de los espectros por problemas ópticos sin modificar la frecuencia, correcciones por tamaño de partícula y correcciones de la tendencia de los datos. El primer número en el modelo matemático indica, el orden de la derivación o substracción (uno es la primera derivada del logaritmo $1/R$), el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer, el tercero son puntos suavizadores en cada

segmento y el cuarto número son los segundos puntos suavizadores. En la tabla 3 se consignan las ecuaciones creadas a partir de diferentes modelos matemáticos probados, con sus respectivos estadísticos. En ella se observa que el promedio de proteína cruda de las 166 muestras de harina de yuca en las ecuaciones probadas tuvo un rango entre 3.39 y 3.48 %. La menor desviación estándar (SD) la presenta la ecuación 1 con 1.330, el menor error estándar de calibración (SEC) o varianza de la ecuación, lo presenta la ecuación 7 con un valor de 0.178, seguida por la ecuación 10 con 0.195. El coeficiente de determinación de las ecuaciones (RSQ) tuvo un rango entre 0.951 y 0.980, mostrando buenos ajustes de los modelos, sin embargo la ecuación 10 fue la que arrojó el mayor valor para esta variable, de igual forma la ecuación 10 arrojó el mayor coeficiente de correlación (R). La menor varianza de los puntos redundantes (SECV) la presenta la ecuación 5 con un valor de 0.235. La varianza residual debe tender a 1, y es la ecuación 5 la que estuvo más cerca de la unidad con un valor de 0.97. En general las ecuaciones propuestas son apropiadas, no solo por arrojar un error estándar de calibración bajo, sino también por el alto valor del coeficiente de determinación (Norris, 1976 citado por Vásquez et al, 2004). En el anexo 2 se consigna los valores observados y esperados de las calibraciones

Tabla 3. Ecuaciones probadas para contenido de proteína cruda en harinas de yuca con sus respectivos parámetros estadísticos.

Modelo y Rango	Tratamiento matemático	Media	SD	SEC	RSQ	R	SECV	1-VR
Ecuación 1 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Sin correctivo Derivada: 0 Gap: 4nm, Smoot: 3 Smoot 1: 1	3.399	1.330	0.237	0.968	0.984	0.285	0.968
Ecuación 2 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Sin correctivo Derivada: 1 Gap: 2nm, Smoot: 1 Smoot 1:1	3.416	1.356	0.198	0.979	0.989	0.318	0.945
Ecuación 3 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Sin correctivo Derivada: 1 Gap: 4nm, Smoot: 2 Smoot 1: 1	3.408	1.348	0.208	0.976	0.988	0.268	0.961
Ecuación 4 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 0 Gap: 1nm, Smoot: 1 Smoot 1:1	3.408	1.346	0.223	0.973	0.986	0.241	0.968
Ecuación 5 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 0 Gap: 4nm, Smoot: 2 Smoot 1: 1	3.400	1.372	0.217	0.974	0.987	0.235	0.970
Ecuación 6 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 1 Gap: 1nm, Smoot: 1 Smoot 1: 1	3.429	1.356	0.232	0.971	0.985	0.303	0.950
Ecuación 7 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 1 Gap: 4nm, Smoot: 3 Smoot 1: 1	3.425	1.358	0.187	0.951	0.975	0.245	0.953
Ecuación 8 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: Detrend Derivada: 0 Gap: 1nm, Smoot: 1 Smoot 1: 1	3.409	1.346	0.219	0.974	0.987	0.241	0.968
Ecuación 9 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: Detrend Derivada: 0 Gap: 4nm, Smoot: 3 Smoot 1: 1	3.409	1.346	0.219	0.974	0.987	0.240	0.968
Ecuación 10 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: Detrend Derivada: 1 Gap: 1nm, Smoot: 1 Smoot 1: 1	3.483	1.368	0.195	0.980	0.990	0.288	0.956
Ecuación 11 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: Detrend Derivada: 1 Gap: 4nm, Smoot: 3 Smoot 1: 1	3.421	1.354	0.206	0.977	0.988	0.249	0.966

Una forma de evaluar las ecuaciones NIRS con relación a su precisión y exactitud es a través de la relación entre la desviación estándar del análisis químico y el error estándar de la validación cruzada (SD/SECV). Si esta relación es menor a 3 las ecuaciones resultan en un bajo poder de predicción (Murray,1993). Al hacer la relación entre la SD del análisis Kjeldhal y SECV de las ecuaciones, se encontró que todas presentan un alto poder de predicción por ser muy superiores a 3. Tabla 4.

Tabla 4. Evaluación de las ecuaciones con relación a su precisión y exactitud

Ecuaciones	SECV	SD/SECV
1	0.285	5.311
2	0.318	4.760
3	0.268	5.648
4	0.241	6.281
5	0.235	6.441
6	0.303	4.995
7	0.245	6.178
8	0.241	6.281
9	0.24	6.307
10	0.288	5.256
11	0.249	6.079

Donde SD = 1.514

En la tabla 5, se consignan los resultados de la predicción, en la cual se confronta el valor de referencia (archivo.cal) y las ecuaciones generadas. La ecuación 10 presentó la menor SD con 1.391 y la ecuación 7 la mayor con 1.482. La ecuación 7 presentó el SEP, el error sistemático o determinado (BIAS), la pendiente, el RSQ y el R más bajos entre las ecuaciones evaluadas, siendo sus valores 0.224, -0.004, 1.01, 0.978 y 0.9889 respectivamente.

Tabla 5. Resultados de la predicción.

Modelo y Rango	Tratamiento matemático	Media	SD	SEP	BIAS	Slope	RSQ	R
Ecuación 1 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Sin correctivo Derivada: 0 Gap: 4nm,Smoot:3 Smoot 1: 1	3,469	1,427	0,357	0,037	1,063	0,948	0,973
Ecuación 2 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Sin correctivo Derivada: 1 Gap: 2nm,Smoot:1 Smoot 1:1	3,487	1,415	0,307	0,02	1,049	0,963	0,981
Ecuación 3 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Sin correctivo Derivada: 1 Gap: 4nm,Smoot:2 Smoot 1: 1	3,485	1,422	0,298	0,021	1,045	0,97	0,984
Ecuación 4 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 0 Gap: 1nm,Smoot:1 Smoot 1:1	3,492	1,465	0,265	0,014	1,018	0,97	0,984
Ecuación 5 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 0 Gap: 4nm,Smoot:2 Smoot 1: 1	3,497	1,474	0,264	0,009	1,011	0,97	0,984
Ecuación 6 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 1 Gap: 1nm,Smoot:1 Smoot 1: 1	3,508	1,444	0,32	-0,001	1,025	0,956	0,977
Ecuación 7 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo: SNV Derivada: 1 Gap: 4nm,Smoot:3 Smoot 1: 1	3,51	1,482	0,224	-0,004	1,01	0,978	0,988
Ecuación 8 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo:Detrend Derivada: 0 Gap: 1nm,Smoot:1 Smoot 1: 1	3,492	1,434	0,28	0,014	1,038	0,967	0,983
Ecuación 9 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo:Detrend Derivada: 0 Gap: 4nm,Smoot:3 Smoot 1: 1	3,492	1,435	0,28	0,014	1,038	0,967	0,983
Ecuación 10 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo:Detrend Derivada: 1 Gap: 1nm,Smoot:1 Smoot 1: 1	3,514	1,391	0,359	0,008	1,059	0,946	0,972
Ecuación 11 MPLS, Rango: 1108-2492,8 nm	Correctivo:Detrend Derivada: 1 Gap: 4nm,Smoot:3 Smoot 1: 1	3,485	1,427	0,283	0,021	1,043	0,967	0,983

Al realizar la correlación de Spearman entre los datos de laboratorio obtenidos para proteína cruda (Kjeldhal) y los datos predichos al aplicar las ecuaciones a los espectros generados. Se obtuvo la mejor correlación con la ecuación 7 con 0.9885 (Tabla 6)

En el presente trabajo, la SD de los datos de referencia fue de 1.514, según Kennedy et al 1996, el SEP debe ser menor a un tercio de la SD de los datos de referencia, cumpliéndose la premisa para todas las ecuaciones evaluadas.

7.3 Validación de las Ecuaciones

De las ecuaciones iniciales se seleccionaron las ecuaciones 1, 5, 7 y 10 por ser las que presentaron los mejores parámetros estadísticos tales como: R^2 , SEC, R, y SEP. A estas ecuaciones se les aplicó la validación.

En la validación utilizando la metodología de dosificación, se emplearon las variedades CG 5-79 y MCOL 2459 cuyos contenidos de proteína cruda mediante Kjeldhal fueron de 1.20 y 7.40. El contenido de proteína de las mezclas se hizo por ponderación (Anexo 3). En la figura 5, se observa la correlación entre los datos obtenidos por cada ecuación y los datos esperados de química húmeda en las dosis preparadas, los coeficientes de correlación de las cuatro ecuaciones estuvieron por encima del 99%, la ecuación 5 presentó el valor de pendiente más cercano a la unidad (0.983) y la constante más cercana a cero (0.181) dentro de la ecuación lineal

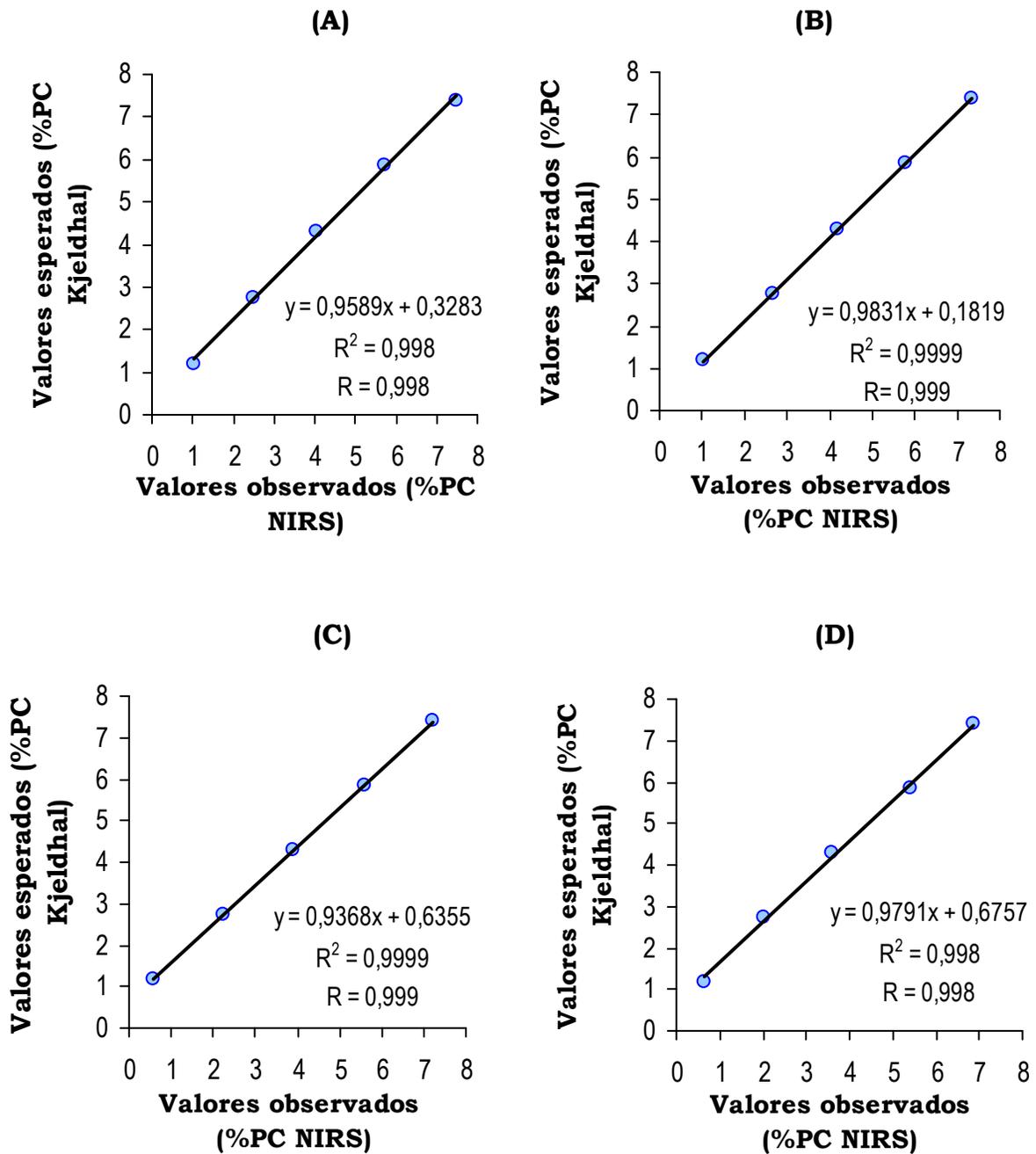


Figura 5 Correlación entre los valores observados y los esperados en la validación de las dosis preparadas. (A) Ecuación 1, (B) Ecuación 5, (C) Ecuación 7, (D) Ecuación 10.

Tabla 6. Coeficientes de Correlación de Spearman para las once ecuaciones de calibración.

Spearman Correlation Coefficients, N = 166											
Prob > r under H0: Rho=0											
Ecuaciones											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Kjeldhal	0,979 <.0001	0,986 <.0001	0,986 <.0001	0,984 <.0001	0,984 <.0001	0,978 <.0001	0,988 <.0001	0,985 <.0001	0,985 <.0001	0,978 <.0001	0,986 <.0001

Las treinta y dos muestras seleccionadas para la validación tuvieron un rango entre 7.40 y 1.04, estando dentro del rango de variación correspondiente del conjunto de muestras de calibración.

En la figura 6 se observa que los coeficientes de determinación de las validaciones fueron de 0.96, 0.97, 0.92 y 0.87 para las ecuaciones 1, 5, 7 y 10 respectivamente. Los coeficientes de correlación fueron 0.98, 0.99, 0.96 y 0.93 para las ecuaciones 1, 5, 7 y 10 respectivamente. La ecuación que presenta el valor de pendiente más cercano a la unidad (0.999) fue la ecuación 1 y quien presentó la constante más cercana a cero (0.117) dentro de la ecuación lineal fue la ecuación 5. En el anexo 4 se consignan los valores observados y esperados de la validación de las ecuaciones. En el anexo 5 se consignan las salidas del programa S.A.S. para la validación de las ecuaciones.

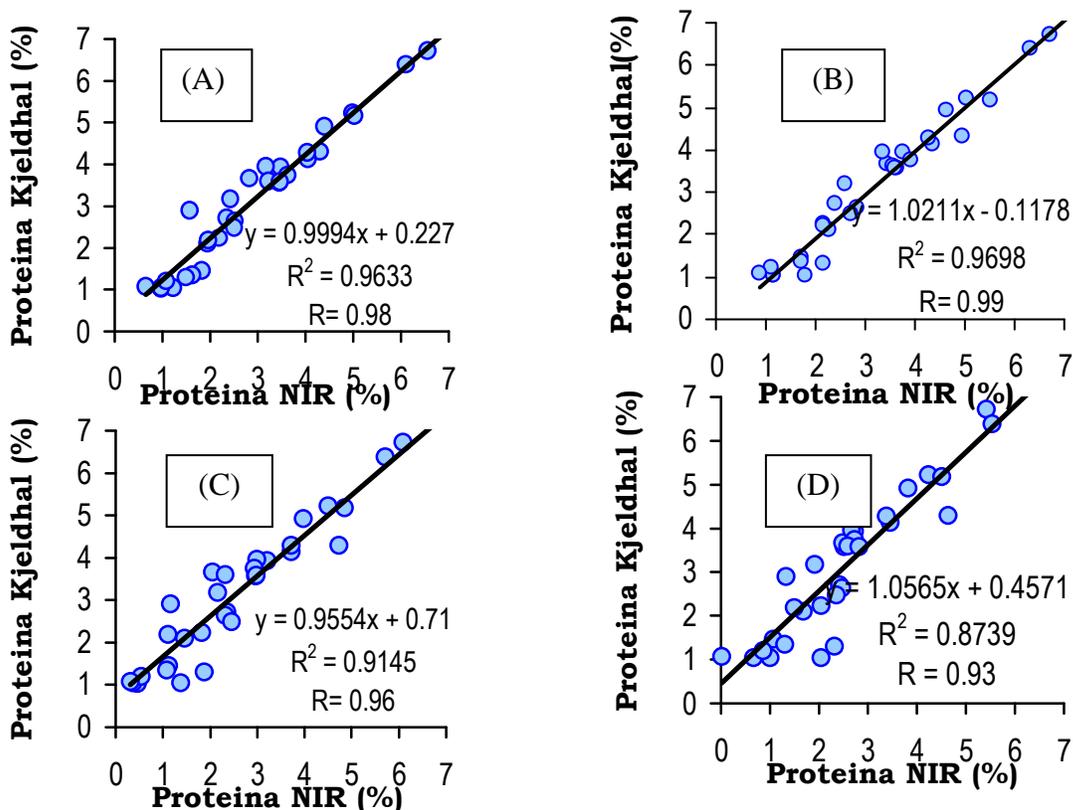


Figura 6. Correlación entre los valores observados y los esperados en la validación simple (A) Ecuación 1, (B) Ecuación 5, (C) Ecuación 7, (D) Ecuación 10.

En la tabla 7 se muestra un resumen de los análisis de regresión lineal para los dos tipos de validación

Tabla 7. Resumen de análisis de regresión lineal.

Tipo de Validación	Ecuación	N° de Muestras	Intercepto a^{1/}	Pendiente b^{1/}	Coefficiente de determinación R²
Por dosis	1	5	0.958 *	0.328 **	0.9987
	5	5	0.983 *	0.181 **	0.9999
	7	5	0.936 **	0.635 **	0.9999
	10	5	0.979 **	0.675 **	0.9980
Simple	1	32	0.999 ns	0.277 **	0.9633
	5	32	1.021 ns	0.117 **	0.9698
	7	32	0.955 *	0.710**	0.9145
	10	32	1.056 ns	0.457 **	0.8739

ns: No significativamente diferente de cero

*: Significativamente diferente de cero al 95% de confianza

**: Significativamente diferente de cero al 99% de confianza

Con los resultados de las validaciones, se llegó a la conclusión que la ecuación 5, la cual contempla el uso del correctivo para problemas ópticos SNV, sin aplicación de derivadas, con un Gap de 4 nm, dos puntos suavizadores y un smott 1, permitió obtener los mejores resultados en comparación con los otros tratamientos matemáticos evaluados, con coeficientes de determinación del 99 y del 97 % para las dos pruebas de validación hechas y una correlación del 99 y 98 %.

Vásquez et al, 2004, determinaron la ecuación de calibración para proteína cruda en Pasto Guinea, cuyo tratamiento matemático fue 2, 1, 1, 1 y la longitud de onda correspondió de 408-1092,8 y de 1108-2492,8, con R² de 0.98% y un SEC de 0.2638, de igual forma determinaron la ecuación de

calibración para PC en grano de maíz, donde el tratamiento matemático fue 3, 1, 4, 1 y la longitud de onda correspondió al infrarrojo (1108-2492.8) con un R^2 de 0.93 % y un SEC de 0.31. Cozzolino et al, 2003, hizo la calibración para proteína cruda en ensilajes de maíz arrojando un SEC de 0.4 y un R^2 de 0.94%, Jurado et al en el 2007, determinaron la calidad del curado de salchichas de cerdo mediante espectroscopia, para PC, el tratamiento matemático utilizado fue SNV 1, 10, 5. Con un SEC de 0.72, un R^2 de 0.97. Pujol et al, 2007. predijeron el contenido de proteína ileal digestible en grano de cebada mediante NIRS, la ecuación encontrada presentó un SEC de 0.247, un R^2 de 0.985, un SEP de 0.181 y un R de 0.993.

Este estudio demuestra, por lo tanto, que es posible usar la tecnología NIRS para la selección de clones con altos contenidos de proteína cruda en sus raíces.

8. CONCLUSIONES

- Este trabajo demuestra que la fácil colección de espectros a través del NIRS permite una rápida determinación del contenido de proteína cruda en harinas de raíces de yuca y un aumento de la velocidad en la realización del análisis de rutina en los laboratorios.
- Es posible obtener una buena predicción del contenido de proteína cruda de harinas de raíces de yuca en la longitud de onda entre 1108-2492,8 nm en NIRS.
- Las ecuaciones evaluadas en calibración presentaron coeficientes de determinación superiores al 95%, y correlaciones por encima del 97%, alto poder de predicción ya que la relación entre la desviación estándar del análisis químico y el error estándar de la validación cruzada (SD/SECV) fue en todos los casos superior a 3.
- Los valores de SEP fueron en todas las ecuaciones menores a un tercio de la SD de los datos de referencia.
- El uso del correctivo para problemas ópticos SNV, sin aplicación de derivadas, un Gap de 4 nm, dos puntos suavizadores y un smott 1, permitieron obtener los mejores resultados en validación en comparación con los otros tratamientos matemáticos evaluados, con coeficientes de determinación del 99 y del 97 % para las dos pruebas de validación hechas y una correlación del 99 y 99 % respectivamente.

9. RECOMENDACIONES

- Los resultados demostraron el potencial del NIRS para predecir el contenido de Proteína cruda de harinas de raíces de yuca; sin embargo, se sugiere que la técnica podría ser usada como procedimiento de rutina en programas de de mejoramiento sólo, si se realizan calibraciones para cada tipo de muestra (harinas, yuca fresca), y para cada componente de interés.
- Las ecuaciones de calibración están protegidas en el sistema NIRS, de modo que solo pueden ser usadas en un instrumento. Las ecuaciones que se desarrollaron y probaron hacen parte de un nuevo producto del programa de Mejoramiento de Yuca CIAT.
- El programa de mejoramiento de yuca del CIAT debe concentrar sus esfuerzos al aumento de proteína verdadera en las raíces de la planta así como en la disminución del contenido de glucósidos cianogénicos, para lo cual la tecnología NIRS resulta de gran ayuda permitiendo obtener datos reales en tiempo real, agilizando la toma de decisiones tanto para el investigador como para el productor.
- En la medida en que el programa de mejoramiento de yuca del CIAT, desarrolle nuevos clones con contenidos de proteína cruda en raíces por encima del 7%, deberá alimentar la ecuación seleccionada con los mismos.
- Se sugiere que al realizar nuevas determinaciones para proteína cruda en NIRS, se tenga un set de muestras estándar, con valores conocidos que me den un indicativo del correcto funcionamiento del equipo NIRS.

- El NIRS es una herramienta útil para el mejorador, debido a que por medio de el, se puede hacer selección de materiales, eliminando los que presentan características indeseables y seleccionando los de interes. Los cuales para una mayor seguridad se analizan por química humedad.

10. BIBLIOGRAFIA

Adesogan, A.T. What are feeds worth?: A Critical Evaluation Of Selected Nutritive Values Methods Proceedings. *13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium* , 2002, pp 33-47. En:

<http://www.animal.ufl.edu/dairy/2002ruminantconference/adesogan.htm>
Enero 26/2006 2:30 pm

Alban, A.A., Narváez, C. Efecto de fuentes órgano-minerales y minerales en la producción sostenible de yuca, *Manihot esculenta Crantz*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 2002.

Alomar, D., Fuschlocher, R. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. En: *Agrosur*, Vol 26, N°1, Valdivia , Chile. 1998.

Bakrie, B. Improvement of nutritive quality of crop by products using bioprocess technique and their uses for animals. Indonesia. 2000.
www.ias.unu.edu/proceedings/icibs/ibs/info/indonesia/bakrie1

Birth, G.S. and Hetch, H.G. Near Infrared Technology in the agricultural and Food Industries. Amer. Assoc. Cereal. Chem. 1987

Bolaños, E.A. Análisis de la interacción genotipo por ambiente en la concentración de carotenos, Hierro y Zinc en clones de yuca y análisis de estabilidad de carotenos en yuca secada al horno en diferentes periodos de almacenamiento. Tesis, Maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 2006.

Buitrago, J. La yuca en la alimentación animal. Centro internacional de Agricultura tropical (CIAT), Colombia. 1990.

Büning-Pfaue, H., Hartmann, R., Harder, J., Kehraus, S. y Urban, C. NIR-spectrometric analysis of food. Methodical development and achievable performance values. *Fresenius J Anal Chem* (1998), p. 832–835

Ceballos, H. Identificación de Fuentes con Niveles Altos de Proteína en las Raíces en: Aspectos notables de la investigación en yuca, 2002

<http://www.ciat.cgiar.org/yuca/resultados.htm>

Ceballos, H. Un Nuevo Clon de Yuca que Ofrece más Nutrientos

<http://www.ciat.cgiar.org/yuca/noticias.htm> CIAT -2006.

Ceballos, H., Sanchez, T., Chavez, A., Iglesias, C., Debouck, A y Tohme, J. Variation in crude protein content in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006. No 19. pp 589-593

CENICAÑA. 1999. Espectroscopia de infrarrojo cercano NIRS.

CIAT, Yuca, 2007 en: http://www.ciat.cgiar.org/pgr/pgr_es/yuca.htm

Cozzolino, D., Fassio, A. and Jiménez, A. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plant. *J.Sci.Food Agric*. Vol. 81. 2000.

<http://fagro2.fagro.edu.uy/agrociencia/vol6/2/p25-35.pdf>

Enero 26/2006 4:45 pm

Cozzolino, D. Uso de la espectroscopia de reflectancia en Infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia* Vol. 6, no. 2, pp. 25-32. 2000.

Cozzolino, D., Fassio, A. y Fernández, E. Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para el análisis de calidad de ensilaje de Maíz. *Agricultura Técnica*, Vol. 63, No. 4, 2003. pp. 387-393.

García, J. y Cozzolino, D. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) para predecir la composición química de forrajes en modelos de calibración amplia. En: *Agricultura Técnica*, Vol. 66 No. 1, Chile, 2006.

Garrido, V.A, Pérez, M.D, Guerrero, J.E y Gómez, C.A. Avances en la utilización de la tecnología NIRS, aplicaciones en producción animal. Universidad Politécnica de Córdoba, España. 2000.

Gil, J.L., Buitrago, J. La yuca en la alimentación animal, La yuca en el tercer Milenio, CIAT. 2002

Givens, D.I., and Deaville, E.R. The current and future role of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in animal nutrition. Review. *Aust. J. Agric. Res.* Vol 50, 1999, pp 1131-1145.

Gonzales, M., Alvarez, N. y Hernandez, J. Instantaneous determination of crude proteins, fat and fibre in animal feeds using near infrared reflectance spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe, *Animal Feed Science and Technology*, Vol, 128, 2006, pp.165 a 171

Groenewald,T. and Köster,H. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) la técnica de análisis rápidos del futuro. 2006. En: http://www.engormix.com/espectroscopia_infrarrojo_cercano_nir_s_articulos_577_BAL.htm sep 7 de 2006 7:40 pm

Jung, H., Mertens, D., Buxton D.R. Forage quality variaci3n among Maize Inbreds: In vitro Fiber digesti3n kinetics and predicci3n with NIRS. Crop Science, No. 38, 1998, pp. 205-210.

Jurado, A.J., Ortiz, V, Espa1a, F, P3rez, J and De Pedro, E.J. Quantitative analysis of pork dry-cured sausages to quality control by NIR spectroscopy, Cordoba, Espa1a, Meat Science, 2007

Kennedy, C.A, Shelford, J.A y Williams, P.C. Near infrared spectroscopy an3lisis of intact grass silage and fresh grass for dry matter, crude proetin and acid detergent fiber. In AMC Davies y P. Wilhams , Near infrared spectroscopy: The future Waves. Proceeding of the 7th International conference on Near infrared spectroscopy, Montreal, Canada, Agosto 1996. Nir Publication, Chichester, Uk. Pp 524-530

Leterme, P. y Estrada, F. An3lisis de los alimentos y forrajes destinados a los animales. Notas de laboratorio. Laboratorio de Nutrici3n Animal, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 2006.

Monta1o, L.C. Econom3a de la yuca en Colombia, un proceso en desarrollo, Ministerio de agricultura y desarrollo, Bogot3, Colombia. 1996

Murray, I.. Forage analysis by near infra-red reflectance spectroscopy in: Sward Measurement Handbook. Second edition, British Grassland Soc, UK, 1993, pp 285-312.

Pujol, S, P3rez, A.M and Torrallardona, D. Evaluation of prediction of barley digestible nutrient content with near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS), en Livestock Science Vol. 109, mayo 2007, pp. 189-192.

Ramírez, E., Anaya, A.M. y Mariscal, G. Predicción de la composición química del grano de sorgo mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS), *Técnica Pecuaria de México*, Vol. 43, No. 1. 2005. P 1-11

Rosero, D. Evaluación y calidad del forraje de yuca *Manihot esculenta* Crantz con corte periódico manual. Tesis Universidad Nacional de Colombia, CLAYUCA y CIAT. 2002.

Saliba, E.O, Montijo, M.M, Rodríguez, N.M, Miranda, L.F, Obeid, J.A, Teixeira, G.L, Oliveira, M.A. Predicção da Composição química do sorgo pela técnica de espectroscopia de reflectancia no infravermelho proximo. en: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, Vol55, Nº 3. 2003.
<file:///A:\Arquivo%20Brasileiro%20de%20Medicina%20Veterinária%20e%20Zootecnia%.html> Agosto 16 /2006 6:25 pm

Serena, F.R, Scheffer-Basso, S.M, Dürr, J.W, Appelt, J.V, Bortolini, F, Aubert, F.A. Predicção da Composição química de Bermudas (*Cynodon* spp) pela espectroscopia de reflectancia no infravermelho proximal. en : *Revista Brasileira de Zootecnia*, Vol 33, Nº 4, 2004. pp 838-842.

Shenk, J. and Westerhaus, M. The application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to forage analysis, 1995.

Urdensander, D. Uses and abuses of NIRS for feed analysis. In: Florida Ruminant Nutrition Symposium. 2006.

Vásquez, D.R, Abadia, B, Arreaza, L.C. Aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano del maíz. *Revista CORPOICA*, Vol. 5, Nº 1, 2004.

ANEXOS

Anexo 1. Clones utilizados en la calibración.

	Variedad	P.C. (%)		Variedad	P.C. (%)
1	MBRA 253	1.95	43	MCR 87	2.90
2	MBRA 466	3.69	44	MPER 297	2.99
3	MBRA 490	2.18	45	CM 2157- 1	2.94
4	MBRA 1308	2.54	46	MBRA 866	3.31
5	MCOL 1425	5.50	47	MCOL 2279	3.95
6	MCOL 1824	1.96	48	MCOL 2315	4.53
7	MCOL 2384	3.09	49	MCOL 2356	5.15
8	MCOL 2439	3.10	50	CM 3236- 3	3.40
9	MPER 366	2.64	51	MBRA 101	3.81
10	MBRA 2	2.22	52	MPER 496	1.06
11	MMAL 60	5.09	53	MCOL 2401	4.73
12	CG 996- 6	2.67	54	MCOL 2436	2.55
13	MPER 199	2.09	55	MCOL 2489	6.07
14	MPER 427	3.37	56	CM 4365- 3	1.57
15	SM 673- 1	2.08	57	CM 6754- 8	1.98
16	SM 734- 5	3.02	58	SGB 765- 2	1.60
17	MCOL 219	3.54	59	SGB 765- 4	1.40
18	MCOL 678	2.35	60	SM 1427- 1	1.25
19	MCOL 2459	5.21	61	SM 1565- 17	2.28
20	MCOL 2694	4.52	62	SM 2619- 4	1.02
21	MCR 136	4.42	63	MTAI 16	3.94
22	MGUA 76	3.16	64	MVEN 25	2.05
23	MTAI 8	1.51	65	CM 523- 7	1.73
24	AM 320- 52	3.79	66	CM 2177- 2	1.49
25	AM 320- 80	1.21	67	MCOL 638	3.47
26	AM 320- 120	1.55	68	MCOL 2737	2.22
27	AM 320- 145	1.31	69	CG 489- 31	1.24
28	AM 262- 12	2.31	70	CM 7514- 7	2.03
29	CM 2772- 3	1.64	71	MCOL 231	1.89
30	CM 4919- 1	4.31	72	MCOL 1049	3.27
31	CM 6119- 5	3.69	73	MCOL 1733	5.55
32	SM 1859- 26	2.74	74	MCOL 1735	2.14
33	MBRA 337	4.44	75	MPAR 33	2.53
34	MBRA 463	2.20	76	MBRA 343	4.15
35	MBRA 502	4.46	77		3.04
36	MBRA 1107	3.65	78		6.18
37	MBRA 1251	3.10	79		2.51
38	MBRA 1400	5.37	80		4.27
39	MCOL 2141	5.40	81	CM 3199- 1	3.06
40	MCOL 2199	3.64	82	MBRA 426	2.82
41	MCOL 2279	3.94	83	MCOL 1531	4.38
42	MCOL 2318	3.66	84	SM 1411- 5	2.43

85	CM 3306- 4	2.22	132	CM 5620- 3	5.58
86	MBRA 383	2.29	133	CM 5620- 3	5.58
87	MCOL 1468	2.40	134	CM 5620- 3	4.90
88	MCOL 1684	1.97	135	CM 5620- 3	4.37
89	MNGA 11	3.02	136	CM 5620- 3	3.88
90	MNGA 19	2.33	137	CM 5620- 3	5.33
91	MTAI 1	3.67	138	CM 5620- 3	3.86
92	SM 1219- 9	2.13	140	SM 629- 6	4.00
93	CM 4365- 3	1.09	141	SM 629- 6	2.06
94	SM 815- 15	0.85	142	SM 629- 6	3.21
95	CM 4574- 7	1.29	143	SM 629- 6	3.84
96	HMC 1	4.06	144	SM 629- 6	4.04
97	MCOL 1505	2.71	145	SM 629- 6	2.11
98	CM 7514- 8	2.49	146	SM 629- 6	3.50
99	CM 6754- 8	3.05	147	SM 629- 6	3.16
100	MPPER 183	1.84	148	SM 629- 6	2.41
101		2.39	149	SM 629- 6	2.99
102		5.28	150	SM 629- 6	2.94
103	CM 3199- 1	6.66	151	SM 1406- 1	1.90
104	CM 3199- 1	5.92	152	SM 1406- 1	2.07
105	CM 3199- 1	4.64	153	SM 1406- 1	3.43
106	CM 3199- 1	4.90	154	SM 1406- 1	3.76
107	CM 3199- 1	6.85	155	SM 1406- 1	3.27
108	CM 3199- 1	5.15	156	SM 1406- 1	4.09
109	CM 3199- 1	4.77	157	SM 1406- 1	3.64
110	CM 3199- 1	4.82	158	SM 1406- 1	2.98
111	CM 3199- 1	3.55	159	SM 1406- 1	5.46
112	CM 3199- 1	4.46	160	SM 1406- 1	3.36
113	CM 3199- 1	4.54	161	SM 1406- 1	2.36
114	CM 3199- 1	4.95	162	SM 1406- 1	4.31
115	CM 3236- 3	11.91	163	MBRA 26	2.37
116	CM 3236- 3	5.82	164	MBRA 26	5.81
117	CM 3236- 3	5.31	165	MBRA 26	6.21
118	CM 3236- 3	5.17	166	MBRA 26	5.40
119	CM 3236- 3	5.34			
120	CM 3236- 3	4.61			
121	CM 3236- 3	4.99			
122	CM 3236- 3	4.03			
123	CM 3236- 3	3.08			
124	CM 3236- 3	3.68			
125	CM 3236- 3	4.28			
126	CM 3236- 3	3.23			
127	CM 5620- 3	4.42			
128	CM 5620- 3	4.77			
129	CM 5620- 3	4.94			
130	CM 5620- 3	3.13			
131	CM 5620- 3	5.79			

Clones validación

# de muestra	Ensayo	Valores esperados
1	MCOL 2694	6,73
2	MCOL 1563	1,04
3	MGUA 86	3,94
4	MGUA 33	4,30
5	MBRA 300	4,14
6	MPTR 49	1,46
7	MCOL 2199	3,58
8	MBRA 900	2,72
9	MCR 61	3,67
10	MBRA 356	2,11
11	MCOL 1132	1,05
12	MGUA 78	2,65
13	MCOL 1754	3,18
14	MBRA 162	2,49
15	CM 7310-1	2,24
16	MBRA 26	3,96
17	MCOL 219	3,75
18	MBRA 158	2,19
19	MCOL 1458	1,05
20	CM 5620-3	4,92
21	CG 5-79	1,20
22	MBRA 435	3,60
23	MCOL 1734	1,08
24	MCOL 1185	1,35
25	CM 3236-3	5,23
26	SM 1406-1	3,59
27	MCOL 1240	1,30
28	MCR 142	4,29
29	MGUA 91	5,18
30	MBRA 792	2,91
31	MCOL 2459	7,40
32	MGUA 79	6,39

Anexo 2. Contenidos de proteína cruda obtenidos por el método de referencia (Kjeldahl) y por las ecuaciones probadas

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
1	1.946	2.073	1.892	1.839	2.135	2.143	2.046	1.825	2.122	2.125	1.859	1.809
2	3.695	3.624	3.722	3.874	3.776	3.78	3.622	3.895	3.647	3.645	3.517	3.774
3	2.184	2.053	2.33	2.166	2.316	2.296	2.167	2.175	2.208	2.207	2.184	2.175
4	2.541	2.404	2.398	2.431	2.579	2.57	2.528	2.34	2.555	2.552	2.361	2.522
5	5.503	5.495	5.661	5.649	5.647	5.662	5.794	5.593	5.52	5.516	5.693	5.67
6	1.958	1.765	2.021	1.921	1.826	1.843	1.806	1.928	2.038	2.032	1.858	1.896
7	3.091	3.499	3.125	3.266	3.463	3.502	3.452	3.235	3.366	3.368	3.136	3.322
8	3.096	3.019	2.82	3.184	3.198	3.212	3.237	3.089	3.17	3.168	3.007	3.152
9	2.635	2.876	2.929	2.781	2.816	2.835	2.743	2.798	2.835	2.83	2.698	2.804
10	2.216	2.283	1.976	1.966	2.317	2.324	2.346	2.128	2.113	2.114	1.945	2.03
11	5.092	4.938	4.755	4.883	5.068	5.095	4.933	4.927	4.942	4.943	4.772	4.925
12	2.666	2.625	2.492	2.607	2.677	2.701	2.462	2.616	2.69	2.704	2.503	2.687
13	2.095	2.135	2.029	1.867	2.039	2.056	1.993	1.907	2.034	2.034	2.137	1.899
14	3.372	3.342	3.231	3.264	3.219	3.236	3.193	3.155	3.274	3.273	3.24	3.269
15	2.082	2.359	1.988	2.088	2.384	2.376	2.35	2.187	2.279	2.28	2.165	2.153
16	3.022	2.722	2.645	2.67	2.803	2.79	2.693	2.776	2.693	2.697	2.693	2.707
17	3.541	3.255	3.475	3.2	3.266	3.267	3.313	3.319	3.348	3.355	3.42	3.294
18	2.353	2.098	2.162	2.273	2.318	2.327	1.935	2.42	2.391	2.399	2.132	2.385
19	5.206	4.807	5.218	5.301	4.975	4.993	5.162	5.092	5.222	5.222	5.221	5.308
20	4.520	4.527	4.763	4.695	4.73	4.743	4.722	4.649	4.442	4.446	4.577	4.749
21	4.423	4.142	4.191	4.306	4.384	4.408	3.91	4.363	4.302	4.314	4.071	4.413

Continuación.....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
22	3.161	2.972	3.103	3.108	3.04	3.047	3.114	3.107	3.071	3.059	3.179	3.104
23	1.505	1.606	1.612	1.59	1.543	1.558	1.54	1.598	1.71	1.709	1.538	1.657
24	3.785	3.867	3.786	3.885	3.937	3.965	3.583	3.857	3.852	3.854	3.693	3.878
25	1.207	1.428	1.292	1.224	1.36	1.356	1.338	1.258	1.345	1.35	1.253	1.241
26	1.551	1.682	1.609	1.514	1.471	1.474	1.517	1.531	1.537	1.541	1.569	1.525
27	1.313	1.204	1.043	1.155	1.046	1.046	0.907	1.25	1.207	1.196	1.032	1.149
28	2.308	2.241	2.269	2.177	2.317	2.333	2.106	2.422	2.332	2.335	2.202	2.158
29	1.636	1.715	1.431	1.528	1.88	1.85	1.682	1.821	1.611	1.613	1.459	1.545
30	4.309	4.109	4.082	4.151	3.893	3.906	3.846	4.069	3.909	3.916	4.224	4.036
31	3.691	3.54	3.589	3.545	3.574	3.569	3.664	3.552	3.486	3.485	3.752	3.559
32	2.742	3.086	2.83	2.99	2.835	2.837	2.863	2.864	2.838	2.839	2.963	3.021
33	4.436	4.984	4.568	5.076	5.019	5.051	5.64	5.087	5.005	4.998	4.644	5.091
34	2.197	2.481	2.383	2.486	2.554	2.538	3.076	2.23	2.583	2.587	3.517	2.401
35	4.456	4.472	4.38	4.442	4.251	4.219	4.414	4.441	4.273	4.258	4.489	4.485
36	3.651	3.557	3.774	3.741	3.538	3.561	3.911	3.596	3.683	3.682	3.674	3.748
37	3.104	3.295	3.008	3.34	3.264	3.273	3.517	3.137	3.235	3.234	3.316	3.3
38	5.369	5.596	5.185	5.21	5.336	5.358	5.439	5.433	5.534	5.521	5.215	5.295
39	5.402	5.45	5.497	5.361	5.356	5.348	5.412	5.341	5.248	5.266	5.491	5.463
40	3.642	3.397	4.119	4.039	3.504	3.52	3.937	3.912	3.535	3.543	4.056	4.012
41	3.941	3.765	4.847	4.038	4.033	4.044	3.932	4.349	4.059	4.063	4.369	4.01
42	3.664	3.96	3.992	3.956	3.92	3.908	3.541	4.008	3.788	3.774	3.884	3.873
43	2.901	2.651	2.988	2.677	2.68	2.674	2.681	2.789	2.683	2.676	2.831	2.707

Continuación.....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
44	2.985	2.416	2.901	2.68	2.45	2.46	2.619	2.804	2.586	2.593	2.998	2.743
45	2.942	2.685	2.95	2.692	2.636	2.63	2.576	2.813	2.642	2.641	2.945	2.776
46	3.308	2.895	3.15	3.274	3.046	3.061	3.282	3.114	3.135	3.136	3.183	3.238
47	3.946	4.072	4.1	4.003	4.102	4.102	3.847	4.059	4.072	4.069	3.943	3.937
48	4.535	4.32	4.256	4.317	4.361	4.39	4.506	4.235	4.25	4.251	4.492	4.294
49	5.152	4.707	4.988	4.987	4.926	4.935	5.446	4.897	4.981	4.963	5.391	5.08
50	3.403	3.168	3.287	3.224	2.963	2.988	3.424	3.24	3.085	3.097	3.202	3.25
51	3.808	3.781	3.962	3.733	3.589	3.587	3.943	3.601	3.668	3.676	3.82	3.692
52	1.055	1.281	1.373	1.345	1.288	1.283	1.321	1.223	1.354	1.362	1.279	1.388
53	4.726	4.587	4.36	4.66	4.621	4.637	4.959	4.607	4.694	4.697	4.621	4.766
54	2.552	2.231	2.361	2.748	2.406	2.426	2.428	2.657	2.393	2.394	2.285	2.676
55	6.075	5.034	6.013	5.674	5.281	5.309	5.891	5.86	5.306	5.302	5.912	5.68
56	1.572	1.858	1.493	1.707	1.822	1.797	1.474	1.766	1.75	1.749	1.34	1.682
57	1.981	2.261	2.236	2.313	2.263	2.247	1.766	2.289	2.35	2.333	2.041	2.255
58	1.597	1.68	1.539	1.761	1.602	1.599	1.437	1.842	1.596	1.601	1.31	1.722
59	1.403	1.622	1.564	1.689	1.661	1.651	1.7	1.719	1.647	1.642	1.475	1.62
60	1.247	1.349	1.388	1.338	1.294	1.308	1.406	1.512	1.289	1.298	1.353	1.397
61	2.281	1.97	2.129	2.06	1.871	1.856	2.383	2.109	1.923	1.929	2.37	2.016
62	1.023	1.224	1.273	1.289	1.209	1.222	1.268	1.354	1.237	1.238	0.962	1.276
63	3.936	3.979	4.105	4.07	3.884	3.874	4.082	4.083	3.816	3.819	4.126	4.056
64	2.047	2.055	1.828	1.969	2.083	2.055	2.15	2.007	2.069	2.066	1.965	2.006
65	1.728	1.704	1.686	1.69	1.763	1.749	2.029	1.732	1.581	1.577	1.84	1.788

Continuación....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
66	1.485	1.352	1.299	1.174	1.261	1.249	1.431	1.282	1.233	1.237	1.361	1.165
67	3.471	3.488	3.553	3.38	3.168	3.164	3.678	3.522	3.305	3.311	3.605	3.435
68	2.220	2.803	2.463	2.47	2.636	2.63	3.317	2.916	2.574	2.561	2.467	2.594
69	1.244	1.405	1.114	1.169	1.231	1.234	0.978	1.291	1.221	1.229	1.07	1.193
70	2.032	2.22	2.04	1.997	2.146	2.154	2.266	1.94	2.152	2.156	2.24	2.037
71	1.889	2.698	2.072	2.037	2.277	2.253	2.151	1.905	2.327	2.332	2.869	2.137
72	3.268	2.802	3.115	2.947	2.971	2.969	2.927	2.992	2.965	2.956	3.116	3.086
73	5.550	5.489	5.652	5.835	5.598	5.618	5.29	5.789	5.856	5.846	5.8	5.707
74	2.139	2.254	2.299	2.211	2.326	2.318	2.502	2.281	2.313	2.31	3.017	2.249
75	2.532	2.776	2.56	2.615	2.759	2.772	2.52	2.57	2.778	2.786	2.592	2.604
76	4.146	4.149	4.114	4.079	4.175	4.193	4.279	4.01	3.999	3.995	4.351	4.042
77	3.043	2.384	2.633	2.634	2.415	2.421	2.527	2.573	2.605	2.601	2.725	2.514
78	6.182	4.617	5.86	4.752	4.747	4.738	4.724	5.006	5.08	5.081	6.093	4.847
79	2.507	2.499	2.616	2.308	2.426	2.422	2.342	2.432	2.526	2.536	2.882	2.323
80	4.266	4.013	4.334	4.284	4.17	4.167	3.889	4.288	4.168	4.155	4.174	4.254
81	3.063	3.017	3.213	3.192	3.125	3.153	3.087	3.098	3.279	3.278	3.367	3.189
82	2.823	3.237	2.905	3.028	3.195	3.169	2.983	3.268	3.139	3.128	2.825	3.018
83	4.376	4.498	4.509	4.53	4.467	4.492	4.168	4.791	4.53	4.526	4.314	4.484
84	2.431	2.863	2.747	2.838	2.661	2.671	3.003	2.651	2.882	2.886	3.309	2.834
85	2.222	2.479	2.522	2.453	2.43	2.414	2.386	2.381	2.484	2.488	2.325	2.434
86	2.295	2.238	2.024	2.071	2.119	2.124	2.168	2.185	2.094	2.094	2.272	1.993
87	2.402	2.155	2.23	2.229	2.131	2.127	2.077	2.308	2.069	2.07	2.09	2.185

Continuación....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
88	1.969	1.733	1.741	1.68	1.489	1.463	1.737	1.71	1.426	1.43	1.705	1.659
89	3.022	3.091	3.258	3.122	3.007	3.009	3.21	3.348	3.009	3.008	3.182	3.184
90	2.334	2.188	2.283	2.298	2.189	2.186	2.194	2.175	2.175	2.175	2.275	2.226
91	3.671	3.543	3.569	3.588	3.526	3.528	3.469	3.624	3.447	3.452	3.567	3.525
92	2.131	2.186	2.381	2.434	2.247	2.267	2.462	2.298	2.301	2.299	2.422	2.345
93	1.088	1.121	1.174	1.162	1.112	1.119	1.191	0.98	1.117	1.113	1.173	1.108
94	0.850	1.009	1.022	1.046	1.126	1.121	1.217	1.123	0.935	0.926	1.133	1.065
95	1.289	1.558	1.4	1.38	1.578	1.567	1.501	1.309	1.556	1.554	1.649	1.428
96	4.056	4.068	4.149	4.141	4.046	4.046	4.113	4.142	4.088	4.085	4.354	4.204
97	2.708	2.533	2.439	2.516	2.605	2.586	2.61	2.471	2.732	2.726	2.728	2.531
98	2.489	2.579	2.337	2.494	2.641	2.643	2.426	2.501	2.679	2.674	2.504	2.579
99	3.055	2.917	3.068	3.085	2.937	2.953	3.043	2.887	3.071	3.07	3.086	3.108
100	1.842	1.709	1.762	1.835	1.791	1.795	1.749	1.756	1.925	1.925	1.847	1.802
101	2.393	2.383	2.192	2.098	2.413	2.416	2.121	2.17	2.32	2.319	2.343	2.177
102	5.284	5.477	5.414	5.611	5.404	5.404	5.677	5.901	5.457	5.471	5.562	5.536
103	6.663	6.505	6.584	6.469	6.546	6.565	6.333	6.654	6.762	6.77	6.473	6.577
104	5.917	5.905	5.993	5.942	5.961	5.978	6.016	5.902	6.074	6.063	5.777	5.894
105	4.637	4.852	4.911	4.921	4.871	4.855	4.814	4.895	4.789	4.79	4.831	4.905
106	4.899	4.929	5.064	5.099	4.985	5.01	5.177	5.088	5.052	5.047	5.095	4.976
107	6.855	6.872	6.712	6.724	6.837	6.861	6.496	6.669	7.048	7.042	6.701	6.803
108	5.146	5.423	5.239	5.3	5.284	5.283	5.086	5.28	5.37	5.371	5.084	5.222
109	4.771	4.597	4.448	4.47	4.537	4.539	4.265	4.44	4.494	4.495	4.402	4.396

Continuación....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
110	4.816	5.134	5.129	4.834	4.991	4.977	4.915	4.94	4.898	4.904	4.894	4.862
111	3.549	3.863	3.566	3.64	3.869	3.878	3.872	3.89	3.85	3.845	3.737	3.71
112	4.464	4.394	4.423	4.302	4.269	4.292	4.558	4.292	4.322	4.322	4.455	4.203
113	4.545	4.426	4.645	4.626	4.575	4.581	4.714	4.585	4.58	4.571	4.863	4.647
114	4.949	5.087	4.99	4.956	4.958	4.981	4.921	4.954	4.983	4.974	4.866	4.889
115	11.915	9.416	9.261	9.637	11.174	11.276	10.599	11.368	10.139	10.149	8.828	9.911
116	5.821	5.571	5.554	5.646	5.693	5.714	5.356	5.742	5.655	5.67	5.507	5.619
117	5.313	4.498	4.522	4.562	4.768	4.798	4.34	5.05	4.839	4.834	4.339	4.507
118	5.166	5.406	5.434	5.35	5.731	5.752	5.658	5.351	5.604	5.613	5.494	5.422
119	5.336	5.146	5.077	5.126	5.472	5.489	5.066	5.203	5.273	5.277	5.131	5.111
120	4.610	4.984	4.972	4.787	5.234	5.309	5.402	4.831	5.314	5.322	4.843	4.777
121	4.993	4.599	4.722	4.588	4.865	4.891	4.871	4.951	4.808	4.815	4.814	4.588
122	4.027	4.327	4.465	4.542	4.315	4.306	4.231	4.442	4.331	4.332	4.393	4.514
123	3.079	3.296	3.115	3.297	3.323	3.309	3.167	3.269	3.227	3.242	3.207	3.291
124	3.680	3.795	3.724	4.04	3.883	3.872	3.596	3.944	3.808	3.817	3.811	4.002
125	4.283	4.426	4.572	4.661	4.408	4.4	4.639	4.448	4.365	4.363	4.481	4.589
126	3.232	3.552	3.639	3.682	3.559	3.556	3.616	3.475	3.572	3.576	3.71	3.64
127	4.418	4.238	4.365	4.304	4.249	4.266	4.367	4.359	4.296	4.29	4.474	4.17
128	4.773	5.155	4.978	4.992	5.049	5.05	4.83	4.88	5.047	5.055	4.884	5.096
129	4.940	5.261	4.815	4.878	5.058	5.044	4.719	4.952	5.069	5.068	4.759	4.974
130	3.132	3.636	3.48	3.633	3.713	3.742	3.542	3.674	3.701	3.7	3.354	3.679
131	5.792	5.96	5.643	5.729	5.848	5.845	5.644	5.699	5.769	5.769	5.56	5.672

Continuación....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
132	5.580	5.986	5.759	5.729	5.868	5.871	5.831	5.712	5.86	5.869	5.733	5.808
133	5.581	5.612	5.674	5.628	5.458	5.465	5.474	5.477	5.533	5.531	5.336	5.599
134	4.903	5.057	5.079	4.972	5.053	5.059	4.823	4.954	5.047	5.05	4.909	4.881
135	4.369	4.213	4.077	4.135	4.237	4.245	4.318	4.15	4.212	4.214	4.347	4.183
136	3.885	3.986	3.843	3.957	4.063	4.069	4.028	3.937	4.044	4.035	3.772	3.906
137	5.329	5.118	5.289	5.105	5.292	5.318	5.305	5.282	5.244	5.246	5.216	5.118
138	3.860	4.174	3.972	3.989	4.225	4.239	3.983	3.953	4.166	4.163	4.039	3.994
139	3.820	3.899	3.874	3.902	3.904	3.922	3.834	3.926	3.934	3.931	3.921	3.863
140	3.999	3.732	3.61	3.741	3.782	3.785	3.686	3.711	3.786	3.782	3.753	3.72
141	2.063	1.99	2.225	2.075	1.985	1.988	2.178	1.869	2.121	2.124	2.284	2.035
142	3.209	3.026	2.99	2.919	2.971	2.96	3.115	2.961	3.045	3.042	2.977	2.93
143	3.838	3.645	3.709	3.682	3.784	3.774	3.768	3.835	3.76	3.763	3.587	3.721
144	4.040	3.756	3.867	3.915	3.703	3.725	4.294	3.909	3.76	3.763	4.059	3.856
145	2.112	2.134	2.291	2.057	2.063	2.047	2.357	2.082	2.108	2.113	2.405	2.117
146	3.497	3.664	3.336	3.568	3.608	3.611	3.743	3.568	3.641	3.636	3.558	3.483
147	3.156	2.985	2.811	2.96	3.015	3.026	3.11	2.98	3.041	3.047	2.949	2.909
148	2.415	2.681	2.63	2.501	2.403	2.391	2.395	2.412	2.544	2.549	2.603	2.536
149	2.995	2.64	2.801	2.767	2.632	2.631	3.055	2.77	2.824	2.816	2.825	2.726
150	2.943	2.865	3.126	2.931	2.773	2.76	2.949	2.944	2.887	2.886	3.004	2.989
151	1.904	2.133	2.186	2.097	1.942	1.958	2.195	1.941	2.095	2.097	2.81	2.092
152	2.069	2.351	2.432	2.346	2.164	2.158	2.308	2.224	2.298	2.294	2.497	2.268
153	3.433	3.494	3.456	3.352	3.395	3.383	3.299	3.316	3.364	3.355	3.342	3.282

Continuación....

N	Kjeldahl	equa1p1	equa2p1	equa3p1	equa4p1	equa5p1	equa6p1	equa7p1	equa8p1	equa9p1	equa10p1	equa11p1
154	3.763	3.67	3.76	3.754	3.653	3.64	3.542	3.753	3.595	3.587	3.697	3.709
155	3.271	3.341	3.117	3.223	3.279	3.261	3.394	3.199	3.187	3.18	3.293	3.208
156	4.088	4.311	4.152	4.308	4.261	4.264	4.243	4.264	4.254	4.268	4.325	4.294
157	3.642	3.796	3.566	3.77	3.694	3.706	3.647	3.686	3.576	3.573	3.536	3.658
158	2.983	2.877	3.063	3.163	2.984	2.993	2.992	3.074	2.9	2.898	3.06	3.046
159	5.456	5.089	5.214	5.219	5.423	5.477	5.353	5.267	5.16	5.162	5.111	5.181
160	3.362	3.048	3.427	3.432	3.136	3.147	3.213	3.269	3.094	3.083	3.153	3.334
161	2.362	1.926	2.257	1.975	2.004	1.987	1.995	1.948	1.922	1.916	2.16	1.93
162	4.305	3.927	4.235	4.087	4.165	4.167	4.106	4.19	4.101	4.096	4.205	4.044
163	2.372	2.246	2.605	2.328	2.346	2.34	2.537	2.289	2.217	2.225	2.535	2.338
164	5.814	5.426	5.615	5.7	5.542	5.534	5.541	5.68	5.49	5.49	5.582	5.68
165	6.209	5.237	5.145	5.895	5.79	5.829	6.221	6.188	5.827	5.827	5.916	5.941
166	5.401	5.03	5.336	5.158	5.09	5.085	5.186	5.259	5.015	5.021	5.3	5.168

Anexo 3 Valores esperados (Kjeldahl) y predichos (NIRS) en validación utilizando la metodología de dosificación

CG 5-79(% de muestra)	MCOL 2459 (% de muestra)	Valores Observados				
		Valores esperados	Ecua 1	Ecua 5	Ecua 7	Ecua 10
100	0	1,2	1,011	1,009	0,599	0,646
25	25	2,75	2,483	2,653	2,252	2,016
50	50	4,3	4,042	4,171	3,91	3,591
75	75	5,85	5,699	5,787	5,6	5,404
0	100	7,4	7,474	7,324	7,197	6,852

Anexo 4 Valores esperados (Kjeldahl) y predichos (NIRS) en validación simple.

# de muestra	Valores esperados	Valores observados			
		ecua 1	ecua 5	ecua 7	ecua 10
1	6,73	6,56	6,70	6,08	5,42
2	1,04	0,97	1,16	0,46	0,66
3	3,94	3,48	3,75	3,21	2,73
4	4,30	4,31	4,97	4,73	4,64
5	4,14	4,06	4,35	3,71	3,45
6	1,46	1,82	1,73	1,12	1,07
7	3,58	3,45	3,65	2,96	2,50
8	2,72	2,34	2,41	2,36	2,41
9	3,67	2,83	3,42	2,05	2,48
10	2,11	1,94	2,27	1,45	1,67
11	1,05	1,22	1,79	1,37	2,04
12	2,65	2,52	2,84	2,31	2,47
13	3,18	2,43	2,61	2,15	1,91
14	2,49	2,50	2,72	2,45	2,35
15	2,24	2,19	2,15	1,82	2,04
16	3,96	3,17	3,37	2,99	2,66
17	3,75	3,62	3,91	2,94	2,73
18	2,19	1,96	2,17	1,10	1,49
19	1,05	0,97	1,15	0,37	1,00
20	4,92	4,40	4,62	3,97	3,82
21	1,20	1,08	1,12	0,54	0,86
22	3,60	3,23	3,54	2,31	2,59
23	1,08	0,65	0,86	0,31	0,01
24	1,35	1,63	1,73	1,08	1,30
25	5,23	4,98	5,06	4,49	4,24
26	3,59	3,47	3,60	2,97	2,82
27	1,30	1,49	2,16	1,87	2,31
28	4,29	4,04	4,29	3,71	3,38
29	5,18	5,03	5,51	4,85	4,50
30	2,91	1,57	1,67	1,16	1,32
31	7,40	7,47	7,32	7,20	6,85
32	6,39	6,10	6,32	5,71	5,53

Anexo 5 Salidas S.A.S de las validaciones para las ecuaciones seleccionadas.

VALIDACION DE MUESTRAS PARA ESTIMACION DE PROTEINA POR NIR CON 30 MUESTRAS (PJVALN30.SAS)

ANALISIS DE CORRELACION LINEAL

The CORR Procedure

5 Variables: Kjeldhal NIREq1 NIREq5 NIREq7 NIREq10

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
Kjeldhal	32	3.03000	1.49363	90.90000	1.04000	6.73000
NIREq1	32	2.79700	1.42423	83.91000	0.65000	7.47000
NIREq5	32	3.04267	1.45725	91.28000	0.86000	7.32000
NIREq7	32	2.42967	1.46515	72.89000	0.31000	7.20000
NIREq10	32	2.42900	1.25388	72.87000	0.01000	6.80000

Pearson Correlation Coefficients, N = 30
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Kjeldhal	NIREq1	NIREq5	NIREq7	NIREq10
Kjeldhal	1.00000	0.98 <.0001	0.99 <.0001	0.96 <.0001	0.93 <.0001
NIREq1	0.98 <.0001	1.00000	0.99168 <.0001	0.97597 <.0001	0.94981 <.0001
NIREq5	0.99 <.0001	0.99168 <.0001	1.00000	0.98157 <.0001	0.96826 <.0001
NIREq7	0.96 <.0001	0.97597 <.0001	0.98157 <.0001	1.00000	0.98023 <.0001
NIREq10	0.93 <.0001	0.94981 <.0001	0.96826 <.0001	0.98023 <.0001	1.00000

VALIDACION DE MUESTRAS PARA ESTIMACION DE PROTEINA POR NIR CON 32 MUESTRAS
ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA LA ECUACION 1

Number of Observations Read 32
Number of Observations Used 32

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	61.07958	61.07958	472.80	<.0001
Error	28	3.61722	0.12919		
Corrected Total	29	64.69680			

Root MSE 0.35943 R-Square 0.9633
Dependent Mean 3.03000 Adj R-Sq 0.9421
Coeff Var 11.86222

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.17989	0.14658	1.23	0.2300
NIREql	1	1.01899	0.04686	21.74	<.0001

Obs	NIREql	Dependent Variable	Predicted Value	Residual
1	6.56	6.7300	6.8645	-0.1345
2	0.97	1.0400	1.1683	-0.1283
3	3.48	3.9400	3.7260	0.2140
4	4.31	4.3000	4.5717	-0.2717
5	4.06	4.1400	4.3170	-0.1770
6	1.82	1.4600	2.0344	-0.5744
7	3.45	3.5800	3.6954	-0.1154
8	2.34	2.7200	2.5643	0.1557
9	2.83	3.6700	3.0636	0.6064
10	1.94	2.1100	2.1567	-0.0467
11	1.22	1.0500	1.4231	-0.3731
12	2.52	2.6500	2.7477	-0.0977
13	2.43	3.1800	2.6560	0.5240
14	2.5	2.4900	2.7274	-0.2374
15	2.19	2.2400	2.4115	-0.1715
16	3.17	3.9600	3.4101	0.5499
17	3.62	3.7500	3.8686	-0.1186
18	1.96	2.1900	2.1771	0.0129
19	0.97	1.0500	1.1683	-0.1183
20	4.4	4.9200	4.6634	0.2566
21	1.08	1.2000	1.2804	-0.0804
22	3.23	3.6000	3.4712	0.1288
23	0.65	1.0800	0.8422	0.2378
24	1.63	1.3500	1.8408	-0.4908
25	4.98	5.2300	5.2545	-0.0245
26	3.47	3.5900	3.7158	-0.1258
27	1.49	1.3000	1.6982	-0.3982
28	4.04	4.2900	4.2966	-0.006602
29	5.03	5.1800	5.3054	-0.1254
30	1.57	2.9100	1.7797	1.1303
31	7.47	7.4000		
32	6.10	6.3900		
Sum of Residuals				0
Sum of Squared Residuals				3.61722
Predicted Residual SS (PRESS)				4.05175

Test 1 Results for Dependent Variable Kjeldhal

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Numerator	1	0.02121	0.16	0.6884
Denominator	28	0.12919		

VALIDACION DE MUESTRAS PARA ESTIMACION DE PROTEINA POR NIR CON 32 MUESTRAS
ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA LA ECUACION 5

Number of Observations Read 32
Number of Observations Used 32

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	59.84605	59.84605	345.45	<.0001
Error	28	4.85075	0.17324		
Corrected Total	29	64.69680			

Root MSE 0.41622 R-Square 0.9698
Dependent Mean 3.03000 Adj R-Sq 0.9623
Coeff Var 13.73671

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.03057	0.17838	0.17	0.8651
NIREq5	1	0.98579	0.05304	18.59	<.0001

Obs	NIREq5	Dependent Variable	Predicted Value	Residual
1	6.7	6.7300	6.6354	0.0946
2	1.16	1.0400	1.1741	-0.1341
3	3.75	3.9400	3.7273	0.2127
4	4.97	4.3000	4.9299	-0.6299
5	4.35	4.1400	4.3188	-0.1788
6	1.73	1.4600	1.7360	-0.2760
7	3.65	3.5800	3.6287	-0.0487
8	2.41	2.7200	2.4063	0.3137
9	3.42	3.6700	3.4020	0.2680
10	2.27	2.1100	2.2683	-0.1583
11	1.79	1.0500	1.7951	-0.7451
12	2.84	2.6500	2.8302	-0.1802
13	2.61	3.1800	2.6035	0.5765
14	2.72	2.4900	2.7119	-0.2219
15	2.15	2.2400	2.1500	0.0900
16	3.37	3.9600	3.3527	0.6073
17	3.91	3.7500	3.8850	-0.1350
18	2.17	2.1900	2.1697	0.0203
19	1.15	1.0500	1.1642	-0.1142
20	4.62	4.9200	4.5849	0.3351
21	1.12	1.2000	1.1347	0.0653
22	3.54	3.6000	3.5203	0.0797
23	0.86	1.0800	0.8784	0.2016
24	1.73	1.3500	1.7360	-0.3860
25	5.06	5.2300	5.0187	0.2113
26	3.6	3.5900	3.5794	0.0106
27	2.16	1.3000	2.1599	-0.8599
28	4.29	4.2900	4.2596	0.0304
29	5.51	5.1800	5.4623	-0.2823
30	1.67	2.9100	1.6768	1.2332
31	7.32	7.4000		
32	6.32	6.3900		
Sum of Residuals				0
Sum of Squared Residuals				4.85075
Predicted Residual SS (PRESS)				5.49367

Test 1 Results for Dependent Variable Kjeldhal

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Numerator	1	0.01244	0.07	0.7907
Denominator	28	0.17324		

VALIDACION DE MUESTRAS PARA ESTIMACION DE PROTEINA POR NIR CON 32 MUESTRAS
ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA LA ECUACION 7

Number of Observations Read 32
Number of Observations Used 32

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	57.13047	57.13047	211.42	<.0001
Error	28	7.56633	0.27023		
Corrected Total	29	64.69680			

Root MSE 0.51983 R-Square 0.8830
Dependent Mean 3.03000 Adj R-Sq 0.8789
Coeff Var 17.15619

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.70245	0.18610	3.77	0.0008
NIREq7	1	0.95797	0.06588	14.54	<.0001

Obs	NIREq7	Dependent Variable	Predicted Value	Residual
1	6.08	6.7300	6.5269	0.2031
2	0.46	1.0400	1.1431	-0.1031
3	3.21	3.9400	3.7775	0.1625
4	4.73	4.3000	5.2337	-0.9337
5	3.71	4.1400	4.2565	-0.1165
6	1.12	1.4600	1.7754	-0.3154
7	2.96	3.5800	3.5380	0.0420
8	2.36	2.7200	2.9633	-0.2433
9	2.05	3.6700	2.6663	1.0037
10	1.45	2.1100	2.0915	0.0185
11	1.37	1.0500	2.0149	-0.9649
12	2.31	2.6500	2.9154	-0.2654
13	2.15	3.1800	2.7621	0.4179
14	2.45	2.4900	3.0495	-0.5595
15	1.82	2.2400	2.4460	-0.2060
16	2.99	3.9600	3.5668	0.3932
17	2.94	3.7500	3.5189	0.2311
18	1.1	2.1900	1.7562	0.4338
19	0.37	1.0500	1.0569	-0.006901
20	3.97	4.9200	4.5056	0.4144
21	0.54	1.2000	1.2198	-0.0198
22	2.31	3.6000	2.9154	0.6846
23	0.31	1.0800	0.9994	0.0806
24	1.08	1.3500	1.7371	-0.3871
25	4.49	5.2300	5.0037	0.2263
26	2.97	3.5900	3.5476	0.0424
27	1.87	1.3000	2.4939	-1.1939
28	3.71	4.2900	4.2565	0.0335
29	4.85	5.1800	5.3486	-0.1686
30	1.16	2.9100	1.8137	1.0963
31	7.2	7.4000		
32	5.71	6.3900		

Sum of Residuals 0
Sum of Squared Residuals 7.56633
Predicted Residual SS (PRESS) 8.51334

Test 1 Results for Dependent Variable Kjeldhal

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Numerator	1	0.10997	0.41	0.5287
Denominator	28	0.27023		

VALIDACION DE MUESTRAS PARA ESTIMACION DE PROTEINA POR NIR CON 32 MUESTRAS
ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA LA ECUACION 10

Number of Observations Read 32
Number of Observations Used 32

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	53.06260	53.06260	127.71	<.0001
Error	28	11.63420	0.41551		
Corrected Total	29	64.69680			

Root MSE 0.64460 R-Square 0.8202
Dependent Mean 3.03000 Adj R-Sq 0.8138
Coeff Var 21.27388

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.40961	0.26003	1.58	0.1264
NIREq10	1	1.07879	0.09546	11.30	<.0001

Obs	NIREq10	Dependent Variable	Predicted Value	Residual
1	5.42	6.7300	6.2567	0.4733
2	0.66	1.0400	1.1216	-0.0816
3	2.73	3.9400	3.3547	0.5853
4	4.64	4.3000	5.4152	-1.1152
5	3.45	4.1400	4.1314	0.008552
6	1.07	1.4600	1.5639	-0.1039
7	2.5	3.5800	3.1066	0.4734
8	2.41	2.7200	3.0095	-0.2895
9	2.48	3.6700	3.0850	0.5850
10	1.67	2.1100	2.2112	-0.1012
11	2.04	1.0500	2.6103	-1.5603
12	2.47	2.6500	3.0742	-0.4242
13	1.91	3.1800	2.4701	0.7099
14	2.35	2.4900	2.9448	-0.4548
15	2.04	2.2400	2.6103	-0.3703
16	2.66	3.9600	3.2792	0.6808
17	2.73	3.7500	3.3547	0.3953
18	1.49	2.1900	2.0170	0.1730
19	1	1.0500	1.4884	-0.4384
20	3.82	4.9200	4.5306	0.3894
21	0.86	1.2000	1.3374	-0.1374
22	2.59	3.6000	3.2037	0.3963
23	0.01	1.0800	0.4204	0.6596
24	1.3	1.3500	1.8120	-0.4620
25	4.24	5.2300	4.9837	0.2463
26	2.82	3.5900	3.4518	0.1382
27	2.31	1.3000	2.9016	-1.6016
28	3.38	4.2900	4.0559	0.2341
29	4.5	5.1800	5.2642	-0.0842
30	1.32	2.9100	1.8336	1.0764
31	6.85	7.4000		
32	5.53	6.3900		

Sum of Residuals 0
Sum of Squared Residuals 11.63420
Predicted Residual SS (PRESS) 13.26869

Test 1 Results for Dependent Variable Kjeldhal

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Numerator	1	0.28307	0.68	0.4161
Denominator	28	0.41551		