

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“PREDICCIÓN DE LA PROTEÍNA DIETARIA CON  
ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO CERCANO  
EN HECES DE LLAMAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**JONATAN DAVID ZEVALLOS CASTAÑEDA**

**LIMA – PERÚ**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**“PREDICCIÓN DE LA PROTEÍNA DIETARIA CON  
ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO CERCANO  
EN HECES DE LLAMAS”**

Presentado por:

**JONATAN DAVID ZEVALLOS CASTAÑEDA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

Sustentada y aprobada por el siguiente Jurado:

.....  
Ph. D. Gustavo Gutiérrez Reynoso

**PRESIDENTE**

.....  
Ph. D. Víctor Guevara Carrasco

**MIEMBRO**

.....  
Ing. Jorge Gamarra Bojórquez

**MIEMBRO**

.....  
Ph. D. Javier Ñaupari Vásquez

**ASESOR**

## **DEDICATORIA**

*Con mucho cariño para mi madre Silvia y mi abuela María, quienes me guiaron desde niño y me formaron con mucho amor hasta ser la persona que soy.*

*A todos mis queridos amigos y profesores que han sido parte de este trabajo con sus aportes, apoyo y consejos.*

*A los alpaqueros de nuestra puna que con escasos recursos y mucho esfuerzo logran sacar adelante a sus familias y mantienen la tradición de la crianza de estos hermosos animales que nos han heredado nuestros ancestros.*

## AGRADECIMIENTO

- Al Ph.D Javier Arturo Ñaupari Vásquez, por confiar en mi persona para realizar este proyecto, además de sus sabios consejos y apoyo durante todo este proceso.
- Al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT) así como al Vicerrectorado de Investigación por el apoyo económico para hacer posible la investigación.
- Al Programa de Ovinos y Camélidos Americanos (POCA) de la Universidad Nacional Agraria La Molina por prestarme las instalaciones donde se realizó la primera etapa del experimento.
- A los PhD Jay Angerer y Douglas Tolleson de la Universidad de Texas A&M por el apoyo técnico para procesar los datos.
- Al Rector PhD Enrique Flores Mariazza, por brindarme las facilidades para sacar a pastorear a las llamas en el Campus durante la fase de adaptación así como sus consejos para estructurar el experimento.
- A mi amigo Bill Yalli, por transmitirme sus conocimientos en el manejo de los camélidos durante la primera fase del experimento y a Jose Antonio Haro Reyes, por su apoyo en el desarrollo temprano del experimento.
- A mi amada Gressia Champa Morales, por su incondicional apoyo y fuerzas durante todo el proceso.
- A mis amigos Marco Gutierrez Tang, Jimny Núñez Delgado y Miguel Paredes Chocce del Laboratorio de Ecología y Utilización de Pastizales (LEUP) por sus consejos y apoyo durante el periodo de redacción.
- A mi Universidad Nacional Agraria La Molina y a mi querida Zootecnia por brindarme un segundo hogar, grandes amigos y conocimiento para toda la vida.

# ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1.	Nutrición de camélidos sudamericanos .....	2
2.1.1.	Anatomía y fisiología digestiva .....	2
2.1.2.	Consumo de alimento .....	4
2.1.3.	Factores que determinan la selectividad en camélidos sudamericanos.....	5
2.1.4.	Requerimientos nutricionales.....	6
2.2.	Métodos para evaluar calidad de dieta .....	9
2.2.1.	Fistulación esofágica.....	10
2.2.2.	Simulación manual.....	10
2.2.3.	Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIRS).....	10
2.3.	Marco teórico de Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIRS) .....	11
2.3.1.	Ondas electromagnéticas.....	11
2.3.2.	Transiciones electrónicas .....	12
2.3.3.	Absorción en el infrarrojo y estructura molecular .....	13
2.3.4.	La ley de Beer: La relación entre la radiación absorbida y la concentración .....	14
2.3.5.	Reflexión y dispersión de la luz.....	14
2.3.6.	Métodos NIRS Directos e Indirectos .....	17
2.3.7.	Calibración de modelos.....	19
2.3.8.	Métodos para crear pares dieta : heces.....	20
2.3.9.	Validación .....	23
III.	METODOLOGÍA .....	24
3.1.	Lugar de estudio .....	24
3.2.	Unidades experimentales.....	24
3.3.	Manejo de animales experimentales.....	24
3.3.1.	Adaptación .....	24
3.3.2.	Entrenamiento para colección de muestras .....	25
3.4.	Dietas usadas para Calibración y Validación .....	25
3.5.	Colección de muestras.....	27
3.5.1.	Muestras de dieta y residuo de alimento .....	27

3.5.2.	Colección de muestras de heces para análisis NIR .....	27
3.6.	Procesamiento de las muestras de heces y alimento .....	28
3.6.1.	Muestras de heces .....	28
3.7.	Cálculo del porcentaje de proteína de la dieta consumida .....	28
3.8.	Procesamiento de información espectral y calibración .....	29
3.8.1.	Obtención de espectros de absorbancia y calibración.....	29
3.8.2.	Calibración del espectrómetro .....	30
3.8.3.	Medición de espectros absorbancia de las muestras de heces .....	31
3.8.4.	Selección de los pares dieta: heces .....	31
3.8.5.	Creación del conjunto de entrenamiento.....	32
3.8.6.	Procesamiento previo de la información espectral .....	32
3.8.7.	Regresiones multivariadas usando PLS – 1 y PCR.....	33
3.8.8.	Creación del archivo de calibración.....	36
3.9.	Validación de los modelos .....	36
3.10.	Diseño Estadístico .....	36
3.10.1.	Consumo de proteína .....	37
3.10.2.	Diferencia Límite Significativa (DLS) .....	37
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1.	Consumo de proteína.....	38
4.2.	Modelo de calibración .....	39
4.2.1.	Análisis de los modelos usando PCR y PLS – 1 .....	39
4.2.2.	Análisis de las gráficas de los modelos.....	41
4.3.	Validación de los modelos .....	43
4.4.	Ventajas de la espectrometría de infrarrojo cercano .....	45
V.	CONCLUSIONES .....	47
VI.	RECOMENDACIONES .....	48
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	49
VIII.	ANEXOS.....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de la tasa de pasaje de partículas en el C – 1 y rumen de llamas y ovinos .....	3
Tabla 2: Volumen del C – 1 y rumen y tasa de pasaje de líquidos estimada en llamas y ovinos.....	4
Tabla 3: Consumo diario comparativo de alpaca, llama y ovino en estabulación y pastoreo en pastos cultivados y praderas naturales .....	4
Tabla 4: Requerimientos de Proteína para llamas .....	7
Tabla 5: Modelos de Requerimientos de Energía.....	8
Tabla 6: Requerimientos de Minerales para Camélidos estimados a partir de vacunos de engorde, ovinos y caprinos .....	9
Tabla 7: Resultados de modelos de calibración usando NIRS realizados en otras especies herbívoras .....	22
Tabla 8: Dietas para el ensayo de Calibración .....	26
Tabla 9: Consumo de proteína (g/PV <sup>0.75</sup> ) de llamas con diferentes niveles de proteína.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Movimiento ondulatorio de la radiación electromagnética.....	11
Figura 2: El espectro electromagnético. ....	12
Figura 3: Interacción de la radiación NIR con partículas sólidas en una muestra.....	16
Figura 4: Curvas espectrales que representan el Log (1/R) y segunda derivada de Log (1/R). R es la reflectancia, con respecto a la longitud de onda del espectro de heno de Pasto Guinea ( <i>Panicum maximum</i> ), residuo y heces de vacuno que las consumió, antes y después del pre procesamiento usando derivación. ....	18
Figura 5: Esquema del método indirecto NIRS para estimar calidad de dieta. ....	19
Figura 6: Diferencias en los espectros de grano de maíz, antes y después del secado...	20
Figura 7: Llama con arnés de colección de heces y bolsa de colección en el momento del muestreo.....	27
Figura 8: Espectrómetro de infrarrojo cercano NIRquest 512. ....	30
Figura 9: Diagrama de bloques de un espectrómetro .....	30
Figura 10: Medición de absorbancia de muestra de heces con equipo NIRS usando el programa Spectrasuite. ....	31
Figura 11: Ecuación de calibración usando regresión PLS – 1. ( $R^2= 0.6084918$ ). ....	42
Figura 12: Ecuación de calibración usando regresión PCR ( $R^2= 0.5877677$ ).....	43
Figura 13: Análisis de regresión de mínimos cuadrados para la validación del modelo PLS – 1 ( $R^2= 0.46459414$ ). ....	45
Figura 14: Análisis de regresión de mínimos cuadrados para la validación del modelo PCR ( $R^2= 0.4541577$ ).....	45



## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Glosario de terminología usada en el trabajo de investigación .....	56
ANEXO 2 : Base de datos de Porcentaje de proteína consumido, Peso vivo de las llamas (Kg), Peso metabólico (PV) <sup>0.75</sup> , Consumo de alimento (g), Consumo de proteína (g) y Consumo de Proteína (g MS/Kg PV <sup>0.75</sup> ).....	57
ANEXO 3: Análisis de Varianza, gráficas y prueba t de Diferencia Límite Significativa (DLS) para Consumo de proteína vs. Dietas.....	63
ANEXO 4: Gráficas y prueba t de Diferencia Límite Significativa (DLS) para variable Consumo de proteína vs. Llamas.....	66
ANEXO 5: Porcentaje de Proteína consumida promedio de las dietas.....	67
ANEXO 6: Porcentaje de proteína y FDN en los ingredientes utilizados en las dietas de calibración .....	68
ANEXO 7: Indicadores de los modelos desarrollados por el programa GRAMS para la regresión PLS – 1.....	69
ANEXO 8: Indicadores de los modelos desarrollados usando el programa GRAMS para la regresión PCR.....	70
ANEXO 9: Gráficas de PRESS y SECV de los modelos PLS – 1 y PCR .....	71
ANEXO 10: Resultados de Validación usando el modelo PLS – 1 .....	73
ANEXO 11: Resultados de Validación usando el modelo PCR .....	74
ANEXO 12: Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados parciales para un solo factor para la validación del modelo de calibración PLS – 1 .....	75
ANEXO 13: Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados parciales para un solo factor para la validación del modelo PCR .....	76

## RESUMEN

Se desarrollaron dos modelos de predicción para proteína cruda (PC) de la dieta de llamas (*Lama glama*) usando muestras de heces mediante análisis de espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS). Se realizó un ensayo de alimentación en 6 llamas raza Q'ara y 12 dietas con un porcentaje de PC entre 4.81 y 17.08 % MS utilizando panca molida de maíz (*Zea mays*), heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto Camerún (*Pennisetum purpureum*). El experimento se realizó en las instalaciones del Programa de Ovinos y Camélidos Americanos (POCA) de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Cada dieta se suministró a las llamas por 7 días. Se tomaron muestras individuales de dieta y residuo de alimento 12 horas antes y 12 horas después de coleccionar las muestras de heces los días 6 y 7. El porcentaje de PC de la dieta consumida por las llamas se determinó usando el método Kjeldahl. Las muestras de heces permanecieron en congelación hasta su procesamiento en estufa a 60°C por 24 h y luego en desecador por 1 h para eliminar la humedad de la muestra; luego las muestras fueron analizadas con el NIRQuest 512 (900 – 1700 nm) obteniendo los espectros de absorbancia. Se construyeron pares dietas – heces a partir de los espectros de cada muestra de dieta consumida por las llamas, y luego fueron ingresados al programa Grams para el procesamiento matemático pertinente. Posteriormente se realizó una regresión lineal usando mínimos cuadrados parciales para un factor (PLS – 1) y regresión de componentes principales (PCR) utilizando el algoritmo denominado Validación Cruzada para evaluar el modelo. Las ecuaciones de calibración obtenidas tienen un R<sup>2</sup> de 0.61 y 0.58 y error estándar de validación cruzada (SECV) de 2.507 y 2.545. En la validación con muestras diferentes el R<sup>2</sup> fue 0.46 y 0.45 y la distancia de Mahalanobis  $0.7 \pm 0.25$  y  $0.8 \pm 0.2$  para PLS – 1 y PCR, respectivamente. Por tanto, la espectrometría de infrarrojo cercano mostró una baja habilidad predictiva para estimar el contenido proteico de la dieta de llamas en confinamiento, por lo que se requieren de mayores estudios para explorar su verdadero potencial.

**Palabras clave:** Proteína, pares heces – dietas, NIRS; *Lama glama*; calibración; validación cruzada; PLS – 1.

## ABSTRACT

Two models were developed to estimate crude protein (CP) in llamas (*Lama glama*) diet, using fecal samples through the Near Infrared Spectrometry (NIRS). The assay consisted on feeding 6 Q'ara breed llamas and 12 diets with CP between 4.81% and 17.08% of DM, using minced corn leaves (*Zea mays*), alfalfa hay (*Medicago sativa*), and Camerun Grass (*Pennisetum purpureum*). The trial was done at the Ovine and American Camelids Program (POCA) facility, inside of Universidad Nacional Agraria La Molina. Each diet was given to the llamas for 7 days. Single samples were taken of the diet and feed wastes were taken 12 hours before and 12 hours after the collection of feces samples on days 6th and 7th. The percentage of CP in the diet consumed by the llamas was defined by using the Kjeldahl method. The feces samples were kept frozen until they had to be taken to the stove treatment at 60 degrees Celsius for one day, then kept one hour in the desiccant, to remove moisture from them; after that, the samples were analyzed using NIRSQuest 512 (900 - 1700 nm) and absorbance spectrum was obtained from them. Diet - feces pair data, were set up from the spectrum of each feed sample consumed by the llamas and then introduced into Grams software so the data could be processed properly. Next lineal regression was done using Partial Least Squares for one factor (PLS – 1) and Principal Component Regression (PCR) using the algorithm named Cross Validation to test the modelling. The obtained calibration equation had R<sup>2</sup> of 0.61 and 0.58, and a Standard Error of Cross Validation (SECV) of 2.507 and 2.545, respectively. Validation with different samples had a R<sup>2</sup> of 0.46 and 0.45, and Mahalanobis distance of  $0.7 \pm 0.25$  and  $0.8 \pm 0.2$  for the PLS – 1 and PCR, respectively. Therefore, the Near Infrared Spectrometry showed a low predictive ability to estimate the protein content of the diet of confined llamas; hence, further studies are required to explore its real potential.

Key words: Protein; feces – diet pair; NIRS, *Lama glama*; calibration; cross validation; PLS-1.

## I. INTRODUCCIÓN

La determinación de la calidad nutricional de la dieta de camélidos sudamericanos al pastoreo presenta desafíos, ya que debido a su selectividad estos no consumen uniformemente la vegetación dentro del pastizal ni dentro de cada planta. Por lo tanto conocer qué está comiendo con exactitud y si cubre sus requerimientos nutricionales resulta complejo. Uno de los métodos más usuales para determinar la calidad nutricional de la dieta es el uso de fístulas esofágicas, siendo una técnica invasiva, costosa y que requiere de cuidados particulares de los animales (Álvarez, 2003). La simulación manual de la dieta es otro método que no resulta tan preciso pues depende del entrenamiento y observación de quien toma la muestra (Austin *et al.*, 1983).

La Espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica rápida y no destructiva que permite construir modelos para estimar proteína cruda y digestibilidad en dietas de animales al pastoreo, la cual ya ha sido probada en vacunos (Boval *et al.*, 2004; Coates, 1998), ovinos (Awuma, 2003; Li *et al.*, 2007), caprinos (Landau *et al.*, 2004; Leite y Stuth, 1995), alce (Keating, 2005) y venado de cola blanca (Jean, 2014). No obstante, su utilidad para estimar la calidad de dieta en camélidos sudamericanos al pastoreo aún no ha sido explorada.

Construir un modelo usando el NIRS para determinar la calidad de la dieta en camélidos al pastoreo permitirá brindar servicios a productores, empresas ganaderas, ONGs e investigadores quienes encontrarán una alternativa más económica, menos invasiva, más limpia y más rápida frente a las evaluaciones químicas tradicionales de forrajes.

El objetivo del siguiente estudio fue calibrar y validar un modelo para estimar el nivel de proteína en la dieta de llamas usando la espectrometría de infrarrojo cercano a partir de muestras de heces así como determinar el consumo de proteína en las dietas suministradas y el probable efecto de las dietas en esta variable.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Nutrición de camélidos sudamericanos

#### 2.1.1. Anatomía y fisiología digestiva

- **Cavidad bucal**

Los labios de SAC son delgados y poseen labio leporino en el labio inferior. Son móviles permitiendo una capacidad selectiva mejorada (San Martín y Bryant, 1989). Las fórmulas dentales son diversas y están relacionadas con la alimentación y la defensa (San Martín y Bryant, 1989). (Fernández, 1962; citado por Gutiérrez, 1993) encontró como fórmula dental a  $I \frac{1}{3} C \frac{1}{1} o \frac{0}{1} PM \frac{2}{1} M \frac{3}{3}$  de los cuales los caninos están más desarrollados en individuos machos adultos. Los premolares y molares tienen un papel importante en el procesamiento del alimento siendo más eficientes que los ovinos en la reducción del tamaño de partícula (San Martín, 1987). Los dientes incisivos, de la misma manera que en ganado ovino y bovino, se ubican en el frente de la mandíbula inferior y tienen superficies de corte en forma de cuña que permiten el recorte de las plantas contra la almohadilla de goma opuesta de la mandíbula superior (San Martín y Bryant, 1989). Durante la masticación, el movimiento vertical y horizontal de la mandíbula permite un uso eficiente de los premolares y molares en el corte y trituración de los alimentos fibrosos (San Martín y Bryant, 1989).

- **Compartimentos digestivos del estómago**

Los camélidos a diferencia de los rumiantes poseen su estómago dividido en sólo 3 compartimentos (C – 1, C – 2 y C – 3). En C – 1 y C – 2 se realiza la fermentación microbiana mientras que en C – 3 solo hay fermentación microbiana en la porción proximal, mientras que en la porción distal se secretan enzimas proteolíticas y ácido clorhídrico (Van Saun, 2009). Los compartimentos C – 1 y C – 2 presentan sáculos, a los cuales se atribuye posibles funciones secretoras y de rápida absorción de nutrientes (San Martín y Van Saun, 2014). La población de bacterias acetogénicas en los dos primeros compartimentos C – 1 y C – 2 es mayor que en rumiantes, sin embargo no existen

diferencias entre los ácidos grasos volátiles producidos entre camélidos y rumiantes pero si en su tasa de absorción; siendo mayor en los primeros, manteniendo niveles constantes de pH que favorecen la fermentación microbiana constante (San Martín y Van Saun, 2014).

Los camélidos pueden subsistir consumiendo plantas de reducido nivel de proteína debido a que poseen una alta eficiencia en el reciclaje de nitrógeno, manteniendo elevadas concentraciones de amonio en los dos primeros compartimentos digestivos, el cual es un sustrato requerido por las bacterias celulolíticas para la síntesis de proteína microbiana (San Martín y Van Saun, 2014).

- **Retención de alimento en compartimentos digestivos**

Estudios comparativos de tiempo de retención del alimento entre llamas y otros mamíferos herbívoros demostraron que las llamas poseen un tiempo de retención mayor de partículas largas, lo que le permite degradar y utilizar todos los componentes celulares (San Martín y Van Saun, 2014). El transporte selectivo de líquidos y sólidos es asumido por la motilidad del C – 2 y el canal existente entre C – 2 y C – 3 (San Martín y Van Saun, 2014). Además la tasa de pasaje de líquidos en camélidos es superior a otros rumiantes debido a la mayor producción de saliva y la relación de volúmenes y mayor motilidad en C – 1 y C – 2 (ver Tabla 1 y 2).

**Tabla 1: Comparación de la tasa de pasaje de partículas en el C – 1 y rumen de llamas y ovinos**

Parámetro	Llama	Ovino
Rumen (C – 1) – Retículo (%/hora)	3.5	4.6
Ciego – Cólón (%/hora)	9.3	17.3
Tiempo de tránsito (horas)	18.9	12.0
Tiempo de retención total promedio (horas)	62.3	40.9

FUENTE: San Martín y Van Saun (2014)

**Tabla 2: Volumen del C – 1 y rumen y tasa de pasaje de líquidos estimada en llamas y ovinos**

Parámetro	Llama	Ovino
Tasa de dilución (%/hora)	10.4	7.7
Volumen del Rumen (VR) (L)	7.1	7.2
VR/Kg W <sup>0.75</sup>	0.17	0.29
Tiempo de recambio total (horas)	10.4	13.6
Tasa de pasaje de líquido (L/hora)	0.72	0.54

FUENTE: San Martín y Van Saun (2014).

### 2.1.2. Consumo de alimento

El consumo de alimento en materia seca con respecto a su peso vivo en condiciones de estabulación en alpacas es 1.8% mientras que en llamas 2.0%, respectivamente (San Martín y Van Saun, 2014). Turin *et al.* (2001), reportó que el consumo de alimento en alpacas entre 6 y 18 meses era de 2.19 a 2.32 Kg MS/100Kg PV, respectivamente. En general, los estudios muestran que los camélidos tienen un consumo de alimento menor en comparación a especies rumiantes sea en condiciones de estabulación, pastoreo en pasturas o praderas nativas, gracias al mayor tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo que estos presentan (San Martín y Van Saun, 2014).

En los pastizales alto-andinos no existen diferencias en el consumo entre la estación lluviosa y la estación seca para los camélidos a pesar de la notable disminución en el nivel nutricional del pasto disponible en la estación seca, causando un incremento de la capacidad gástrica (San Martín y Van Saun, 2014).

**Tabla 3: Consumo diario comparativo de alpaca, llama y ovino en estabulación y pastoreo en pastos cultivados y praderas naturales**

Consumo diario	Alpaca	Llama	Ovino
Estabulación (Materia Seca, %Peso Vivo)	1.83	2.0	3.3
Pastoreo, pasto cultivado (Materia orgánica, g/Kg PV <sup>0.75</sup> ); (Kg MS/100 Kg PV) <sup>a</sup>	2.26 <sup>a</sup>	52.8	83.2
Pastoreo, pradera nativa (Materia Seca, g/Kg PV <sup>0.75</sup> )	50.0	46.8	68.1

FUENTE: Adaptado de San Martín y Van Saun (2014) y Turin *et al.* (1999).

### **2.1.3. Factores que determinan la selectividad en camélidos sudamericanos**

- **Tamaño de partícula**

En llamas y alpacas la eficacia de la reducción del tamaño de partícula se incrementa con la longitud del forraje, efecto contrario a lo observado en ovinos (Gutiérrez, 1993). Las llamas y alpacas pasan mayor parte del tiempo masticando y menos tiempo rumiando que los ovinos, pero pasan gran parte del tiempo pastoreando; no obstante su menor requerimiento de consumo de alimento, lo que sugiere que son más eficientes masticadores que los ovinos (San Martín, 1987).

- **Palatabilidad**

Se define palatabilidad como la respuesta hedónica o el grado de aceptación que un animal muestra frente a un alimento dependiendo de su sabor y textura (Provenza y Launchbaugh, 1999). En el caso de especies herbívoras la palatabilidad varía en función a atributos de la planta que alteran su aceptabilidad, dentro de los cuales se encuentran su composición química, etapa de crecimiento de la planta y plantas asociadas (Provenza y Launchbaugh, 1999).

La palatabilidad de un alimento está interrelacionada con las características organolépticas (olor, sabor y textura) y el efecto post-ingestión de nutrientes y toxinas del mismo, ambos influenciados por las características químicas de la planta, el estado nutricional del animal y las experiencias pasadas con el mismo alimento (Provenza, 1995).

La retroalimentación post-ingestión calibra los sentidos, dependiendo del grado de aceptación de la planta. Las preferencias de los animales herbívoros son también el resultado de la interacción entre la oportunidad que tienen para seleccionar las plantas (su distribución en el tiempo y espacio y la facilidad de prehensión) y las que son determinadas por sus características anatómicas (San Martín, 1987).

La selección de la dieta en herbívoros está altamente influenciada por la presencia de compuestos anti-herbívoros en la planta (Provenza y Burrit, 1991). Los camélidos tienen preferencia por los alimentos con mayor contenido de fibra debido a su habilidad



masticatoria en comparación a los ovinos (Gutiérrez, 1993).

- **Deseabilidad de especies de pastizal**

Las especies de pastizal por su deseabilidad en un campo se pueden clasificar en Deseables, Poco deseables e Indeseables. La deseabilidad de una especie de pastizal es función del animal que lo consume, por lo que, una especie puede ser deseable para ovinos pero no para vacunos. Sin embargo, la deseabilidad puede variar para una misma especie dependiendo del tipo de pastizal en que se encuentre pastoreando así como de la estación del año (Oscanoa y Flores, 1992).

#### **2.1.4. Requerimientos nutricionales**

Los Modelos desarrollados para calcular requerimientos son principalmente extrapolaciones a partir de especies rumiantes debido a la escasa información disponible.

- **Proteína**

En camélidos, la población bacteriana presente en C – 1 utiliza fuentes de nitrógeno proteico y no proteico para producir proteína microbiana de alto valor biológico, semejante a especies rumiantes (San Martín y Van Saun, 2014).

Considerando las características mencionadas anteriormente (Ver punto 2.1.1. Anatomía y fisiología digestiva) que permiten un mayor crecimiento microbiano en C – 1, los camélidos tienen disponible un mayor contenido de proteína microbiana de alta calidad que las especies rumiantes al consumir especies de poco contenido proteico. No obstante el requerimiento de proteína está fuertemente relacionado con el de energía y según los modelos en camélidos se requiere de 47 g de proteína de mantenimiento por cada Megacaloría de Energía Digestible. Esta proporción se debería a un mayor metabolismo de proteínas y alto nivel de proteína microbiana disponible (San Martín y Van Saun, 2014).

Según NRC (2007), los requerimientos de proteína de mantenimiento para llamas y alpacas son 9% de materia seca; sin embargo investigaciones en Sudamérica recomiendan niveles entre 6.5 y 8.8% de materia seca (Van Saun, 2009). Con respecto al requerimiento de proteína para ganancia de peso, usando información de caprinos se considera 0.284 g de

proteína por gramo de ganancia (NRC, 2007). La información mencionada se resume en la Tabla 4.

**Tabla 4: Requerimientos de Proteína para llamas**

Estado Fisiológico	Requerimiento	Autor
Mantenimiento	47 g Proteína/ Mcal ED	San Martín y Van Saun, 2014
Mantenimiento	9%	NRC, 2007
Mantenimiento	6.5 – 8.8 %	San Martín y Van Saun, 2014
Ganancia de Peso (Extrapolación a partir de caprinos)	0.284 g / 1g de ganancia de peso	NRC, 2007

FUENTE: Adaptado de NRC (2007) y San Martín y Van Saun (2014)

- **Energía**

En estudios realizados se calculó la Energía Metabolizable (EM) de mantenimiento para llamas siendo 61.2 y 84.5 Kcal EM/Kg  $W^{0.75}$ , (Schneider *et al.*, 1974; Carmean *et al.*, 1992), observándose diferencias en las estimaciones debido a las metodologías usadas en cada una, además que se considera que los requerimientos son más altos para los camélidos en Norte América en comparación a los de Sudamérica.

Sin embargo, dichos requerimientos deben ser ajustados dependiendo del nivel de actividad que los animales realizan para alimentarse, de la calidad nutricional, la disponibilidad del forraje además de la topografía de la zona. La cantidad de EM requerida para el crecimiento depende de la tasa de ganancia de peso y de su composición de grasa y proteína. La tasa de ganancia de peso varía de 80 a 400 g y 30 a 180 g/día en llamas y alpacas, respectivamente (Van Saun, 2006).

Usando la información disponible de las tasas de crecimiento, la composición en los cambios realizados usando el modelo de caprinos se estimó su requerimiento en 7.25 Kcal EM/g de peso ganado (NRC, 1981), el cual puede variar en función a la edad del animal, ya que esto influye en su tasa de crecimiento. El requerimiento de EM para la preñez se

estimó en 72.26 Kcal EM/Kg  $W^{0.75}$  (Fowler, 1998). Resultados de otros estudios se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5: Modelos de Requerimientos de Energía**

Estado Fisiológico	Modelo de Predicción
Mantenimiento	EM (Kcal/día)= 72.85 Kcal/Kg. $W^{0.75}$
Actividad/ Nivel de Trabajo	Factor de Ajuste
Bajo	1.25 x Mantenimiento
Moderado	1.50 x Mantenimiento
Alto	1.75 x Mantenimiento
Extremo	2.25 x Mantenimiento
Crecimiento	EM (Kcal/día)= 3.2 Kcal/g incremento EM (Kcal/día)= 5.52 Kcal/g incremento EM (Kcal/día)= 6.81 Kcal/g incremento
Preñez	EM (Kcal/día)= 66.0 Kcal/ $W^{0.75}$ (Para últimos 3 meses de preñez)
Producción de Fibra	EM (Kcal/día)= 30 Kcal/Kg fibra/365

FUENTE: Adaptado de Van Saun (2009).

- **Agua**

En el caso de los camélidos y en particular las llamas el requerimiento de agua es menor que en otras especies debido al desarrollo de mecanismos de adaptación como por ejemplo la concentración de la orina, menor cantidad de agua en heces y el incremento en la producción de agua oxidativa (San Martín y Van Saun, 2014). El requerimiento total de agua, se determina dependiendo del peso corporal, estado fisiológico, nivel de actividad, nivel de producción, composición de la dieta y condiciones ambientales. Fowler (1998) determinó un nivel de requerimiento con respecto al peso metabólico ( $W^{0.75}$ ) de 122 ml/Kg.  $W^{0.75}$ , dos o tres veces la ingesta de materia seca o 3 a 8% del peso corporal para mantenimiento en adultos y crecimiento y lactancia, respectivamente.

- **Minerales**

Los modelos desarrollados para calcular los requerimientos de minerales en camélidos son básicamente a partir de estimaciones de especies rumiantes tales como vacunos de carne, ovinos y caprinos debido a la poca información disponible. La información es resumida en la Tabla 6.

**Tabla 6: Requerimientos de Minerales para Camélidos estimados a partir de vacunos de engorde, ovinos y caprinos**

Mineral	%Dieta en Materia Seca	Categoría
Calcio	0.20 - 0.40	Mantenimiento
	0.53 - 0.73	Crecimiento (1 – 12 meses)
	0.30 - 0.48	Crecimiento (12 – 36 meses)
	0.45 - 0.56	Preñez
	0.45 - 0.62	Lactación
Fósforo	0.17 - 0.21	Mantenimiento
	0.27 - 0.38	Crecimiento (1 – 12 meses)
	0.21 - 0.28	Crecimiento (12 – 36 meses)
	0.28 - 0.33	Preñez
	0.32 - 0.45	Lactación
Magnesio	0.13 - 0.16	Mantenimiento y Crecimiento
	0.18 - 0.22	Preñez y Lactación
Potasio	0.60 - 0.70	Mantenimiento, Crecimiento y Preñez
	0.80 - 0.96	Lactación
Sodio	0.07 - 0.08	Mantenimiento, Crecimiento y Preñez
	0.12 - 0.14	Lactación
Azufre	0.19 - 0.23	Mantenimiento, Crecimiento, Preñez y Lactación

FUENTE: NRC (1996), NRC (1985) y NRC (1981); citado por San Martín y Van Saun (2014).

## 2.2. Métodos para evaluar calidad de dieta

La calidad nutricional de la dieta depende de su composición, es decir de las proporciones de los nutrientes dentro de la misma y de su potencial para ser aprovechados por el animal, lo cual puede determinarse mediante un conjunto de análisis químicos de laboratorio (Mc. Donald *et al.*, 1999). Estos análisis suelen requerir muestras representativas de la dieta.

La nutrición de animales al pastoreo resulta compleja debido a que la composición nutricional de un pastizal varía de acuerdo a la diversidad de especies presentes, cambios en la topografía, las estaciones así como las variaciones anuales de disponibilidad de forraje (Wofford *et al.*, 1985). Además los camélidos no consumen uniformemente las plantas sino que seleccionan ciertas especies y partes (San Martín y Van Saun, 2014).

### **2.2.1. Fistulación esofágica**

Es un método quirúrgico invasivo que consiste en realizar una incisión en la faringe donde se coloca una cánula, mediante la cual se puede acceder y almacenar en bolsas el alimento ingerido y masticado por los animales (extrusa), el cual se pueden utilizar para estimar la calidad nutricional de la dieta consumida. Se recomienda mantener en ayuno a los animales antes de que ingieran alimento (Langlands, 1975; citado por Álvarez, 1993).

La precisión de esta técnica para obtener estimaciones de calidad y digestibilidad del forraje seleccionado puede variar y depende de la posibilidad de obtener muestras de extrusa significativas (Hodgson, 1969; citado por Álvarez, 1993), ya que no existe forma de verificar directamente si existen diferencias entre la dieta seleccionada por animales fistulados y no fistulados (Arnold *et al.*, 1964; citado por Álvarez, 1993).

Además, esta metodología cuenta con problemas como la lenta recuperación, el bienestar de los individuos fistulados que requieren de cuidados especiales, el alto costo que genera el procedimiento así como el mantenimiento de dichos animales.

### **2.2.2. Simulación manual**

Es un método de colección de muestras de la dieta que consumen los animales al pastoreo. Consiste en observación del pastoreo individual de los animales por 2 a 3 horas, cerca del área de pastoreo para luego tomar muestras manuales representativas del forraje consumido por el animal (Austin *et al.*, 1983, citado por Ñaupari, 2000). Presenta limitaciones debido principalmente al entrenamiento previo que requiere la persona que lo realice.

### **2.2.3. Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIRS)**

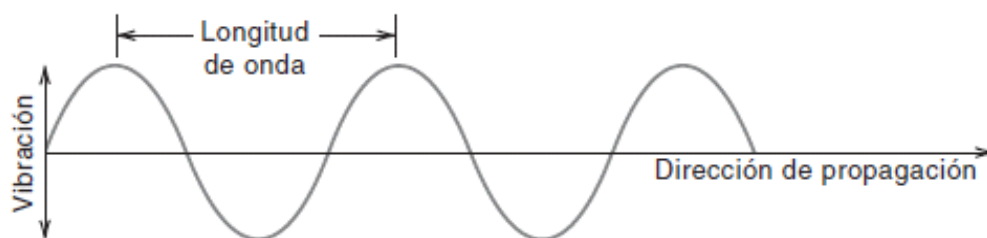
Es una metodología que estima la calidad y composición de dieta de animales al pastoreo a partir de muestras de heces asumiendo la premisa de que estas aportan suficiente información (Dixon y Coates, 2009). Para construir el modelo se deben desarrollar dos etapas como son la Calibración y Validación, gracias a complejos procesos matemáticos y estadísticos usados en su análisis (Leite y Stuth, 1995).

La base fisiológica para utilizar muestras de heces en la estimación de proteína de la dieta es que estas contienen fracciones no digeridas junto con excreciones metabólicas (Van Soest, 1994). Las heces son básicamente materia microbiana y una fracción de secreciones endógenas de las células digestivas del tracto y secreciones digestivas (Van Soest, 1994). Van Soest (1994), también indica que más del 80% del nitrógeno fecal proviene de la dieta consumida.

### 2.3. Marco teórico de Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIRS)

#### 2.3.1. Ondas electromagnéticas

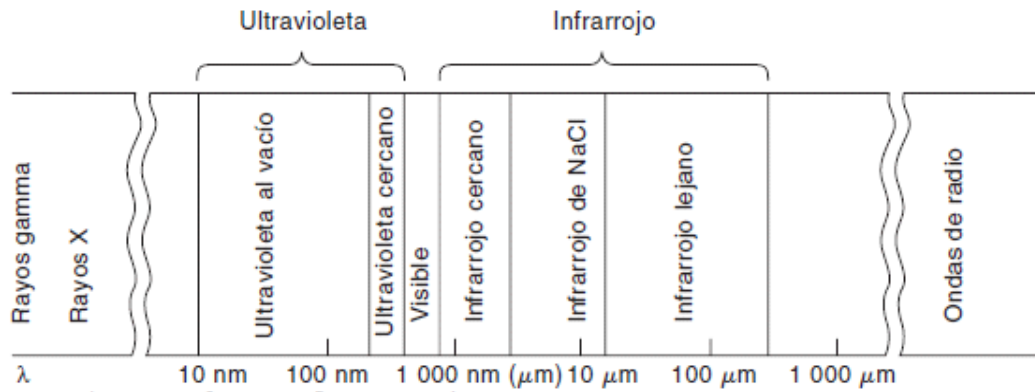
La radiación electromagnética es una forma de energía radiante que se propaga en forma de ondas transversales (Christian, 2009). Su vibración es perpendicular a la dirección de su propagación, lo cual le confiere un movimiento ondulatorio como se puede apreciar en la Figura 1 (Christian, 2009). A diferencia de las ondas mecánicas, las ondas electromagnéticas no necesitan de un medio de propagación (Ohanian y Markert, 2009). La velocidad de propagación de las ondas electromagnéticas es  $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$  (Ohanian y Markert, 2009).



**Figura 1: Movimiento ondulatorio de la radiación electromagnética**

FUENTE: Adaptado de Christian (2009)

La onda es descrita con respecto a su longitud de onda ( $\lambda$ ), la cual comprende la distancia de un ciclo completo o por su frecuencia que es la cantidad de ciclos que pasan por un punto fijo por unidad de tiempo (Christian, 2009). El espectro electromagnético por convención se divide con respecto a su longitud de onda en regiones que van desde los rayos gamma hasta las ondas de radio, dentro de las cuales se encuentra el ultravioleta (UV), la luz visible y el infrarrojo cercano, medio y lejano (ver Figura 2).



**Figura 2: El espectro electromagnético.**

FUENTE: Adaptado de Christian (2009).

### 2.3.2. Transiciones electrónicas

Cuando un determinado espectro de radiación electromagnética incide sobre un cuerpo, este absorberá ciertas longitudes de onda mientras que reflejará otras y transmitirá las restantes, en el caso del espectro visible las longitudes de onda que se reflejan se perciben como el color del objeto (Christian, 2009). Si la muestra no absorbe nada de la energía incidente, se produce una reflexión total (Burns y Ciurczak, 2008).

Existen tres procesos por medio de los cuales una molécula puede absorber radiación e implican elevar la energía interna de la molécula a un valor mayor, siendo el aumento del valor de energía equivalente a la energía de la radiación absorbida (Christian, 2009; Burns y Ciurczak, 2008). En el primero de ellos la molécula gira en torno a varios ejes, absorbiendo radiación y ascendiendo a un mayor nivel de energía de rotación por lo cual se denomina transición rotacional. En el segundo tipo de transición los átomos de la molécula vibran entre sí, por lo cual la molécula puede absorber radiación y ascender a un nivel mayor de energía de vibración en una transición vibracional (Sandorfy *et al.*, 2006). En el tercer caso los electrones de una molécula incrementan su energía, lo cual se denomina transición electrónica (Christian, 2009).

Los tres tipos de energía interna están cuantizados, es decir se encuentran en niveles discretos y ocurren a longitudes de onda específicas (Christian, 2009). La información de la absorción se puede describir usando 3 parámetros específicos, en primer lugar la ubicación que se expresa en la longitud de onda ( $\eta\text{m}$ ), en segundo lugar la amplitud del

pico o intensidad de la absorción en comparación al 100% de la luz emitida en la muestra y en tercer lugar el ancho del pico que describe su intensidad (Roberts *et al.*, 2004). No obstante, existen diferentes niveles de energía para cada tipo de transición, permitiendo la posibilidad de absorción de varias longitudes de onda. Los niveles relativos de energía entre los tres procesos siguen el orden de electrónica > vibracional > rotacional, por ende las transiciones rotacionales pueden realizarse con bajos niveles de energía sea de microondas o del infrarrojo cercano, mientras que las transiciones vibracionales requieren de niveles de energía mayores como las de la región del infrarrojo cercano y las transiciones electrónicas necesitan de cantidades de energía mucho mayores, es decir de la región visible o ultravioleta (Christian, 2009).

Cuando en un espectro sólo existen transiciones rotacionales se observan líneas o rayas de absorción discretas y la longitud de onda de cada línea corresponderá a determinada transición, en el caso de las transiciones vibracionales se pueden presentar junto con las rotacionales dando como resultado en el espectro de máximos o envoltentes de estructura fina no definida, de las cuales las longitudes de onda relacionadas a los picos se pueden relacionar a modos vibracionales dentro de la molécula.

De manera similar ocurre con energías mayores en las cuales se producen transiciones electrónicas junto con las transiciones vibracionales y rotacionales por lo que los espectros se observan como anchas bandas de longitudes de onda de absorción (Christian, 2009). Los estados excitados de las moléculas duran poco, luego las moléculas disipan su energía y regresan a su estado fundamental (Christian, 2009).

### **2.3.3. Absorción en el infrarrojo y estructura molecular**

Para que una molécula absorba energía en el infrarrojo esta debe de presentar un cambio en el momento dipolar, es decir en su polaridad (Christian, 2009). Los grupos funcionales representativos en el infrarrojo absorben dentro de ciertas regiones longitudes de onda específicas y la longitud de onda exacta está también influida por los grupos vecinos (Christian, 2009).



La región del infrarrojo medio (1.5 a 25  $\mu\text{m}$ ) se suele usar con fines cualitativos, mientras que la del infrarrojo cercano o NIR se suele usar para pruebas cuantitativas no destructivas, como el análisis de muestras sólidas (Christian, 2009). La absorción en la región del infrarrojo cercano es principalmente debido a movimientos de alargamiento y flexión de enlaces C—H, O—H y N—H (Christian, 2009).

Las vibraciones moleculares están presentes en la región NIR en forma de X—H, donde X es carbono, nitrógeno u oxígeno. Las funcionalidades X—H se deben a vibraciones de estiramiento, flexión o deformación del hidrógeno. Otras funciones importantes en la región NIR son las vibraciones de estiramiento del doble enlace carbonilo de carbono a oxígeno, las vibraciones de estiramiento de carbono a carbono y los haluros metálicos (Burns y Ciurczak, 2008).

#### **2.3.4. La ley de Beer: La relación entre la radiación absorbida y la concentración**

La ley de Lambert – Beer – Bouguer, comúnmente conocida como ley de Beer, explica que la cantidad de radiación monocromática que absorbe una muestra está relacionada directamente con su concentración en un medio homogéneo donde su densidad molecular es constante (Christian, 2009). Cuando la materia absorbe radiación electromagnética, la energía transmitida disminuye en forma exponencial, es decir geoméricamente. Entonces se concluye que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de un componente determinado (Christian, 2009).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Donde:

A: Absorbancia del analito

$\epsilon$ : Absortividad molar (es un valor específico para cada sustancia)

b: Longitud de la trayectoria o ancho de la celda

c: Concentración del analito en estudio

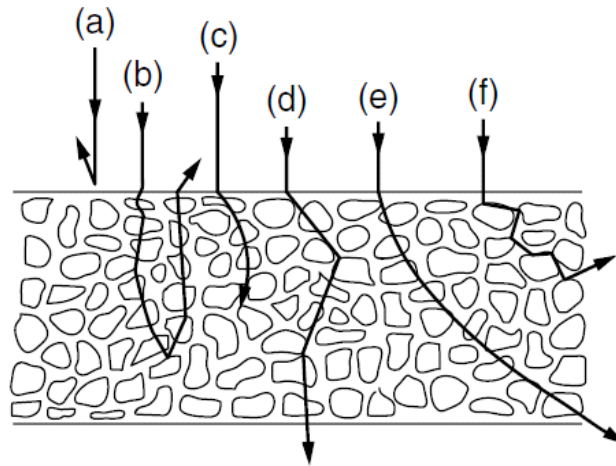
#### **2.3.5. Reflexión y dispersión de la luz**

Cuando la luz incide sobre una muestra de naturaleza orgánica, un conjunto de fotones puede transmitirse a través de ella y el resto se refleja, o absorbe por algunos enlaces

covalentes que actúan como resortes oscilantes que se acoplan con la longitud de onda ( $\eta\text{m}$ ) exacta de la radiación lumínica. La absorción es selectiva y depende de las moléculas involucradas (Murray, 1993).

El funcionamiento de los instrumentos de espectroscopia NIR implica la medición del haz incidente reflejado desde la superficie de la muestra en varias longitudes de onda y desde una superficie reflectora estándar a las mismas longitudes de onda. Por lo tanto, en la práctica, la medición de la reflectancia de la muestra es una medida relativa en comparación con un reflector no estándar (Burns y Ciurczak, 2008). Para este caso se considera nula la transmisión de radiación, siendo la muestra suficientemente opaca (Murray, 1993).

En modo de reflexión o Reflectancia (R) se define Absorbancia (A) como el  $\text{Log}(1/R)$ , asumiéndose que cumple la ley de Lambert – Beer, que establece que la Absorbancia para una longitud de onda monocromática, es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Christian, 2009; Murray, 1993). De manera más específica, la energía total reflejada por una muestra, es la suma de la reflexión especular (superficial o en forma de espejo) más la reflexión difusa, que es aquella temporalmente absorbida y luego reflejada por la muestra (ver Figura 3). Sólo la reflexión difusa entrega información útil acerca de la naturaleza y composición de la muestra (Davies y Grant, 1987), lo que pone en evidencia el problema de dispersión de la luz que afecta a la reflexión difusa y depende del tamaño de partícula de la muestra. Esto dificulta el análisis NIR, especialmente en reflexión, ya que no se controla el camino recorrido por la radiación debido a la dispersión y hace indispensable el uso de un computador (Murray, 1993). La dispersión de la luz en partículas pequeñas es función de la longitud de onda, por lo que el desplazamiento debido al tamaño de partícula no es constante en todo el espectro (Macho, 2002). Actualmente no existe una teoría definitiva para la reflectancia difusa (Burns y Ciurczak, 2008). En la práctica la reflectancia difusa se mide respecto a un estándar no absorbente considerado dentro de la fórmula de la Figura 3 (Macho, 2002).



**Figura 3: Interacción de la radiación NIR con partículas sólidas en una muestra.**

Nota: a. Reflectancia especular; b. Reflectancia difusa; c. Absorbancia; d. Transmitancia; e. Refracción; f. Dispersión.

FUENTE: Adaptado de Burns y Ciurczak (2008).

En el caso de muestras sólidas, el programa del computador calcula la Absorbancia usando la siguiente fórmula (ISI, 1992; Citado por Keating, 2005):

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left( \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \right)$$

Donde:

$A_{\lambda}$ : Absorbancia de la muestra

$S_{\lambda}$ : Intensidad de luz reflejada de la muestra en la longitud de onda  $\lambda$

$D_{\lambda}$ : Densidad de la muestra oscura en la longitud de onda  $\lambda$

$R_{\lambda}$ : Intensidad de luz reflejada por la muestra de referencia en la longitud de onda  $\lambda$

Dicha absorbancia se puede considerar proporcional a la concentración de la sustancia que interactúa con la luz según la Ley de Lambert y Beer (ISI, 1992; Citado por Keating, 2005).

Las bandas de absorción en la región infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético (700 – 2500 nm), están relacionadas a las de la región infrarroja lejana, donde se producen las bandas de absorción fundamentales (SRM, 2010). Las bandas de absorción NIR corresponden a "ecos" o "rebotes" de esas absorciones fundamentales de las

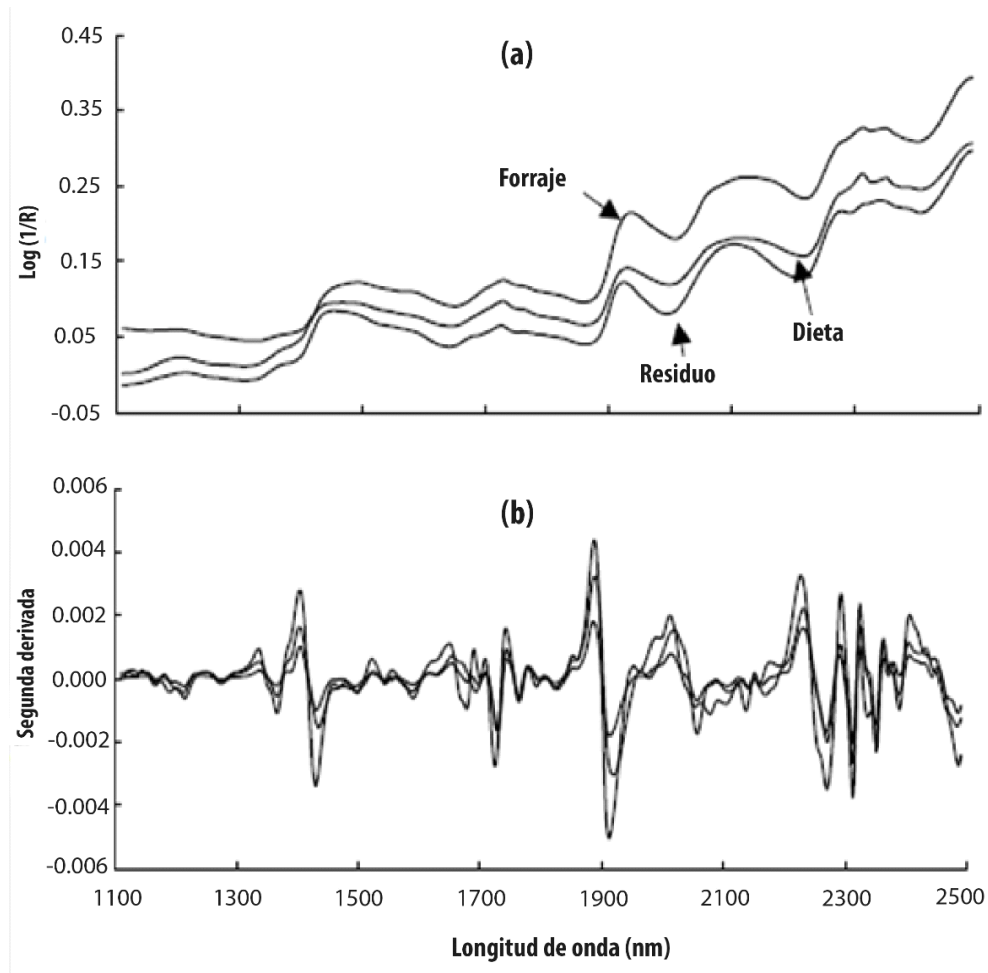
bandas fundamentales de absorción y sus combinaciones, aproximadamente a un medio o un tercio de la longitud de onda en que ellas ocurren (Davies y Grant, 1987; Barton, 1989). Para una muestra de naturaleza química heterogénea, el espectro obtenido en la región NIR, será una compleja combinación de bandas o picos de absorción parciales sobrepuestos o muy cercanos, que suelen confundirse en una línea suavizada en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombros y que sólo cobran sentido cuando dicha información se puede interpretar con tratamientos matemáticos complejos que son realizados con la ayuda de una computadora (Murray, 1993).

### **2.3.6. Métodos NIRS Directos e Indirectos**

La Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIRS), puede ser utilizada para estimar la concentración de nutrientes en forrajes de manera directa o indirecta.

Se denomina método directo cuando la estimación de la calidad nutricional usando el NIRS se realiza con muestras de forraje y junto al análisis de laboratorio de referencia se elaboran las ecuaciones de calibración (Stuth *et al.*, 2003).

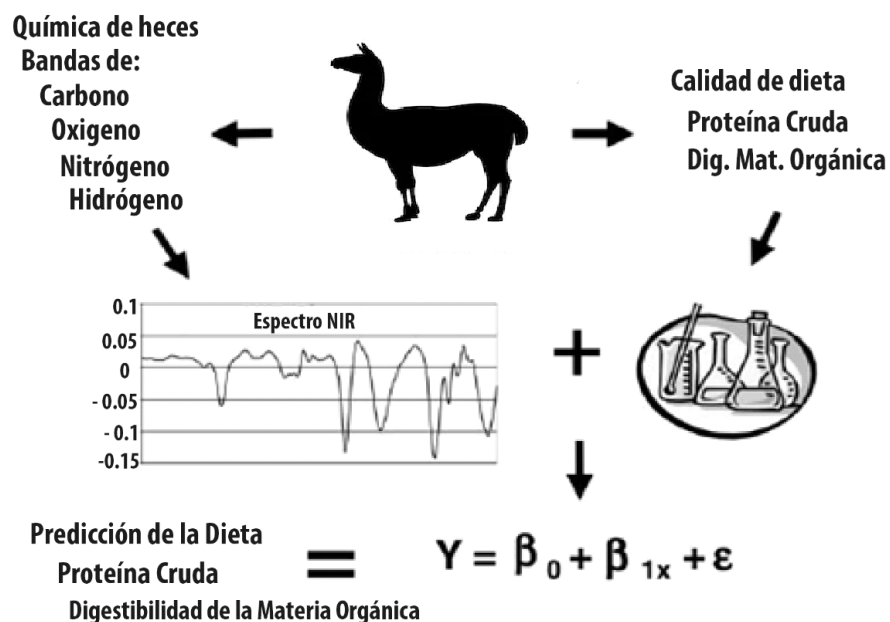
Método indirecto se denomina cuando se utiliza el NIRS para estimar la calidad nutricional de la dieta de animales a partir de sus muestras fecales partiendo de la premisa que las heces contienen información espectral suficiente, ya que existen similitudes entre las curvas espectrales de la dieta que consume un animal, el residuo que dejan y sus heces, aún luego de que se les aplique un pre procesamiento matemático, tal como se puede apreciar en la Figura 4 (Dixon y Coates, 2007).



**Figura 4: Curvas espectrales que representan el  $\text{Log}(1/R)$  y segunda derivada de  $\text{Log}(1/R)$ .  $R$  es la reflectancia, con respecto a la longitud de onda del espectro de heno de Pasto Guinea (*Panicum maximum*), residuo y heces de vacuno que las consumió, antes y después del pre procesamiento usando derivación.**

FUENTE: Adaptado de Dixon y Coates (2009).

La información espectral de cada muestra de heces es utilizada junto con el resultado del análisis de referencia de la dieta para formar pares dieta: heces (ver Figura 5). Se han realizado estudios de calibración y validación de ecuaciones de predicción para estimar indirectamente parámetros tales como Digestibilidad de la Materia Orgánica (DOM) y Proteína cruda en vacunos (Boval *et al.*, 2004; Coates, 1998), caprinos (Landau *et al.*, 2004; Leite y Stuth, 1995), ovinos (Awuma, 2003; Li *et al.*, 2007), alces (Keating, 2005) y venado de cola blanca (Jean, 2014), encontrándose resultados satisfactorios (ver Tabla 7).



**Figura 5: Esquema del método indirecto NIRS para estimar calidad de dieta.**

FUENTE: Adaptado de Stuth *et al.* (2003).

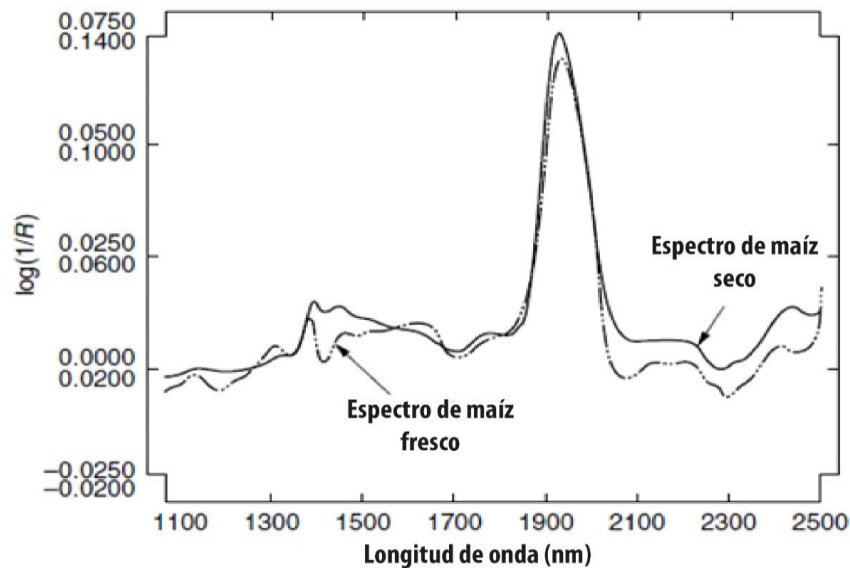
### 2.3.7. Calibración de modelos

El proceso de Calibración consiste en la creación de relaciones matemáticas entre el espectro infrarrojo cercano (NIR) y la concentración o calidad determinada por el método de laboratorio referencia. El objetivo es desarrollar una ecuación de predicción que sólo requiera de NIRS, obviando el método tradicional de referencia (Stuth *et al.*, 2003).

El punto clave en la calibración se encuentra en seleccionar el conjunto de muestras que representen el rango de variabilidad (físico, químico, botánico, etc.) presente en la población de interés. El muestreo estructurado está basado en conocimientos previos de las plantas tales como especie y estado de madurez que determinan la concentración del componente en estudio (Stuth *et al.*, 2003). La selección de un número de muestras adecuadas garantiza una representación equitativa en el conjunto de calibración (Stuth *et al.*, 2003).

Los procedimientos de secado y molienda son de mucha relevancia debido a que el agua absorbe la radiación infrarroja así como también las diferencias en el tamaño de partícula que influyen en la forma del espectro, tal como se puede apreciar en la Figura 6 (SRM,

2010; Stuth *et al.*, 2003). Las condiciones en la que se realiza el análisis de las muestras deben de ser lo más uniformes posibles para evitar variaciones en la obtención de los espectros, como por ejemplo la temperatura afecta la forma del espectro, desplazando los picos de absorción (Stuth *et al.*, 2003).



**Figura 6: Diferencias en los espectros de grano de maíz, antes y después del secado.**

FUENTE: Burns y Ciurczak 2008).

Una vez obtenidos los espectros se debe proceder a extraer la información espectral y química multivariada y evitar el efecto del tamaño de partícula (efecto en la dispersión de la luz) y otros que influyen en la precisión de la estimación utilizando herramientas matemáticas y estadísticas (Stuth *et al.*, 2003), que se describirán a continuación. Luego se debe procesar el espectro realizando un análisis de regresión para obtener la ecuación de calibración (Stuth *et al.*, 2003).

### **2.3.8. Métodos para crear pares dieta : heces**

Obtener muestras de dieta representativas en animales al pastoreo es complicado debido a la diversidad que estas presentan en especies y en calidad nutricional (SRM, 2010). No obstante, se han desarrollado metodologías para obtener muestras de dieta que sean lo suficientemente representativas para crear pares heces - dieta y usarlos en la construcción de ecuaciones de predicción confiables.

- **Fistulación Esofágica de animales al pastoreo**

En este método los ensayos de alimentación se realizan con un grupo de 3 a 5 animales experimentales en pequeños potreros de pasto cultivados o pastizales a los que ya están familiarizados. Se debe extraer muestras de dieta o *extrusa* almacenadas en bolsas que se encuentran dentro de fístulas esofágicas (SRM, 2010). Las muestras de *extrusa* son analizadas en el laboratorio con la metodología tradicional para proteína cruda o digestibilidad de materia seca. Los mismos días que se extraen muestras de *extrusa* se deben tomar muestras de heces en el mismo campo para luego ser analizadas con el NIRS. Las muestras de heces no son necesariamente de los mismos individuos de los que se colectan las muestras de *extrusa* (SRM, 2010). Al correr los resultados de los análisis de laboratorio con los del NIRS se forman los pares dieta: heces (SRM, 2010).

- **Animales en confinamiento con dietas de forraje seco**

En esta metodología los ensayos de alimentación se realizan con animales confinados en corrales individuales. Los individuos deben pasar por un periodo de adaptación mínimo de 9 días (SRM, 2010). Se deben suministrar un mínimo de 15 dietas con 3 a 10 individuos cada una. Los cuales reciben dietas con valor nutritivo conocido, compuestas de diversas especies de forraje henificado y picado (SRM, 2010).

- **Animales en confinamiento con dietas de forraje fresco**

Esta metodología es similar a la anterior ya que también se realiza con los individuos en confinamiento en corrales (SRM, 2010). Los individuos deben pasar por un periodo de adaptación similar de 9 días como mínimo. Se deben suministrar por lo menos 15 dietas con 3 a 10 individuos cada una, los cuales reciben dietas con valor nutritivo conocido, compuestas de diversas especies de forraje fresco cortado y picado (SRM, 2010).



**Tabla 7: Resultados de modelos de calibración usando NIRS realizados en otras especies herbívoras**

Especie	N° Dietas	%Proteína	Tipo de Regresión	N° Individuos	Longitud de onda ( $\lambda$ )	N° Muestras (D : F)	R <sup>2</sup>	SECV	Autor
Bovino	2	-	MSR	6 (dieta) y 8 (heces)	1620 - 2320 $\eta\text{m}$	54	0.63	1.21	Lyons y Stuth, (1992)
Bovino	16	8 – 13.2 y 7.7 – 14.1	MPLS	12	1100 - 2500 $\eta\text{m}$	88	0.95	0.5	Boval <i>et al.</i> (2004)
Bovino	3	4.8 – 8.9 9 – 11.9 12 – 15	MPLS	12	1100 – 2500 $\eta\text{m}$	156	0.92	1.12	Awuma (2003)
Ovino	3	4.8 – 8.9 9 – 11.9 12 – 15	MPLS	12	1100 – 2500 $\eta\text{m}$	158	0.95	1.08	Awuma (2003)
Caprino	3	4.8 – 8.9 9 – 11.9 12 – 15	MPLS	12	1100 – 2500 $\eta\text{m}$	101	0.97	1.03	Awuma (2003)
Caprino	5	4.3 – 25.1	MSR	-	1620 - 2320 $\eta\text{m}$	163	0.94	1.28	Leite y Stuth (1995)
Ovino	45 (2002) y 40 (2003)	4.3 – 23.5	PLS	15 (2002) y 20 (2003)	1108 - 2498 $\eta\text{m}$	78	0.95	1.51	Li <i>et al.</i> (2006)
Alce	5	3 – 27	PLS	18	1108 - 2498 $\eta\text{m}$	117	0.89	1.49	Keating (2005)
Venado de cola blanca	76	6 – 18.95	PLS	17	1108 - 2498 $\eta\text{m}$	76	0.95	1.17	Showers <i>et al.</i> (2006)

FUENTE: Adaptado de Lyons y Stuth (1992), Boval *et al.* (2004), Awuma (2003), Leite y Stuth (1995), Li *et al.* (2006), Keating (2005) y Showers (2006).

### **2.3.9. Validación**

El proceso de validación consiste en evaluar la habilidad predictiva del modelo construido usando un conjunto de muestras diferentes al de la calibración (Stuth *et al.*, 2004). El modelo calcula el porcentaje de proteína de las muestras a partir de sus espectros usando el modelo. Para la validación se suelen usar el Error Estándar de Predicción (SEP), Coeficiente de Determinación de la ecuación de validación ( $R^2$ ) y la distancia de Mahalanobis o también llamado H – valor (Stuth *et al.*, 2003).

## **III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Lugar de estudio**

El experimento se realizó en las instalaciones del Programa de Ovinos y Camélidos Sudamericanos (POCA) de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima – Perú. La fase de colección de muestras se realizó en la estación de verano en el periodo que comprende los meses de enero – abril del 2017, con una temperatura media de 25.2 °C. El procesamiento y medición de las muestras de heces se realizó en el Laboratorio de Ecología y Utilización de Pastizales (LEUP) y la determinación del porcentaje de proteína y Fibra Detergente Neutra (FDN) fue realizada por el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA).

### **3.2. Unidades experimentales**

Se utilizaron como animales experimentales 6 llamas (*Lama glama*) raza K'jara machos de dos a tres años, procedentes de la Cooperativa Comunal San Pedro de Racco del departamento de Pasco.

### **3.3. Manejo de animales experimentales**

#### **3.3.1. Adaptación**

Antes de iniciar la fase experimental se realizó un periodo de adaptación de aproximadamente 3 meses, desde la llegada de las llamas a la UNALM hasta el inicio de la toma de muestras de heces para la calibración. Esto es debido a la conducta neo-fóbica propia de los camélidos sudamericanos (Boogert *et al.*, 2006).

Durante las primeras tres semanas diariamente pastorearon en los jardines del Campus Universitario de la UNALM por un tiempo mínimo de dos horas, siendo reducido el tiempo y su frecuencia desde la segunda semana hasta que ya no fue necesario.

Paralelamente se fue introduciendo alimento en los corrales grupales donde se encontraban, siendo las especies forrajeras ofrecidas como alimento heno de alfalfa (*Medicago sativa*), Panca seca de maíz (*Zea maiz*) y Pasto Elefante Var. Camerún (*Pennisetum purpureum*) picados a un tamaño de partícula de 2.5 cm. suministrado *ad libitum* al igual que el agua.

El primer mes de adaptación las 6 llamas permanecieron en el corral grupal y los dos siguientes en corrales individuales de 1.3 x 2.6 m<sup>2</sup>, siendo los últimos los utilizados para la fase experimental. Las llamas recibieron un golpe vitamínico y una dosis de antiparasitario al iniciar y terminar el periodo de adaptación.

### **3.3.2. Entrenamiento para colección de muestras**

En el último mes del ensayo se colocó a cada llama arneses con bolsas de colección para heces de tela y fueron entrenadas para la colección diaria de heces (ver Figura 7).

### **3.4. Dietas usadas para Calibración y Validación**

Se utilizaron como fuentes de forraje para las dietas heno de alfalfa (*Medicago sativa*), panca seca de maíz (*Zea mays*) y pasto elefante Var. Cameroon (*Pennisetum purpureum*). El forraje fue picado a un tamaño de partícula de 2.5 cm.

Para la construcción del modelo se utilizaron 12 dietas con un contenido proteico de entre 5.06 y 16.81 % de proteína cruda en base seca para las 6 llamas (Tabla 8).

**Tabla 8: Dietas para el ensayo de Calibración**

Dieta	% Panca Seca	% Heno Alfalfa	% Pasto Camerún	% Proteína
Dieta 1	100	0	0	5.06
Dieta 2	85	15	0	6.045
Dieta 3	70	30	0	8.475
Dieta 4	50	50	0	10.37
Dieta 5	30	70	0	12.96
Dieta 6	15	85	0	13.45
Dieta 7	0	100	0	16.81
Dieta 8	0	90	10	14.61
Dieta 9	0	60	40	12.16
Dieta 10	0	40	60	8.57
Dieta 11	0	20	80	6.79
Dieta 12	0	5	95	4.97

### 3.5. Colección de muestras

#### 3.5.1. Muestras de dieta y residuo de alimento

Cada dieta fue suministrada diariamente durante 7 días. Se colectaron muestras de dieta 12 horas antes de la colección de heces, los días 5 y 6 a las 8 p.m. El proceso para recolectar una muestra de dieta consistió en extraer una alícuota de entre 100 y 150 g. de alimento del total que se suministró a las llamas inmediatamente.

Para las muestras de residuo de las dietas estas fueron tomadas directamente del comedero de cada una de las llamas 12 horas después de la colección de heces los días 6 y 7 a horas 8 p.m. La cantidad de residuo recolectado fue como máximo 100 g. del total que se encontró en el comedero.

#### 3.5.2. Colección de muestras de heces para análisis NIR

La colección de muestras de heces se realizó los días 6 y 7 a las 8 a.m., mientras que los demás días se realizó a la misma hora pero dichas heces no fueron consideradas como muestras (ver Figura 7).



**Figura 7: Llama con arnés de colección de heces y bolsa de colección en el momento del muestreo.**

Al finalizar la dieta 7 se dio un periodo de descanso de 7 días a las llamas hasta iniciar las dietas restantes para permitir que la flora del primer compartimento (C – 1) se adapte al Pasto Camerún, que formó parte de las siguientes dietas y así disminuir el error de

muestreo (Dixon y Coates, 2007).

### **3.6. Procesamiento de las muestras de heces y alimento**

#### **3.6.1. Muestras de heces**

Las muestras de heces, previamente identificadas se almacenaron en congelamiento a -10°C hasta su procesamiento. Posteriormente, las muestras de dietas pasaron a una estufa a 60°C por 48 horas y luego por molienda a un tamaño de partícula de 1 mm. Antes del análisis las muestras se colocaron en estufa a 60 °C para estabilizar la humedad y luego se colocaron en un desecador por 1 hora y fueron analizadas con el espectrómetro NIRQuest 512 tal como lo describe Li *et al.* (2007).

#### **3.6.2. Muestras de alimento y residuo de alimento**

Se tomaron muestras de la dieta suministrada a las llamas así como de su residuo los días 6 y 7 de cada dieta de calibración, 12 horas antes y 12 horas después de coleccionar las muestras de heces. Las muestras de las dietas fueron pulverizadas en el molino Twister Retsch usando la criba de 1mm., en el caso de las muestras de pasto Camerún, antes de la molienda pasaron por estufa durante 24 horas a 60 °C.

Luego las muestras de dieta y residuo de alimento se analizaron mediante el método Kjeldahl modificado para determinar Proteína Cruda en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA). El cálculo del porcentaje de Proteína Cruda se realiza mediante la siguiente fórmula (Mc. Donald, 1999):

$$PC (g/Kg) = gN/Kg * 6.25$$

### **3.7. Cálculo del porcentaje de proteína de la dieta consumida**

Conocidos los porcentajes de proteína cruda de las dietas así como los porcentajes del alimento y su residuo, respecto del total, se calculó el porcentaje de proteína consumido por las llamas en cada dieta mediante la siguiente fórmula (Keating, 2005):

$$Y = (x_1 - a.x_2)/b$$

Donde:

Y: porcentaje de proteína consumido

x<sub>1</sub>: porcentaje de proteína de la dieta suministrada

a: porcentaje de la dieta rechazada

x<sub>2</sub>: porcentaje de proteína del residuo de la dieta suministrada

b: porcentaje de la dieta rechazada (100 – a)

De la misma manera se calculó el consumo de proteína considerando el porcentaje de proteína y el consumo de alimento. Se ajusta con el Peso Metabólico de cada individuo (PV<sup>0.75</sup>). La fórmula es la siguiente:

$$Cons\ Prot = \frac{PC\% * CA}{PV^{0.75}}$$

Donde:

Cons Prot: Consumo de proteína por cada llama (g PC MS/PV<sup>0.75</sup>)

PC%: Porcentaje de proteína consumida por la llama

CA: Consumo de alimento de cada llama en gramos

PV: Peso vivo de cada llama en Kg

La información fue sistematizada en un documento de Microsoft Excel donde se realizaron los cálculos en línea para determinar el Consumo de proteína (ver Anexo 2).

### **3.8. Procesamiento de información espectral y calibración**

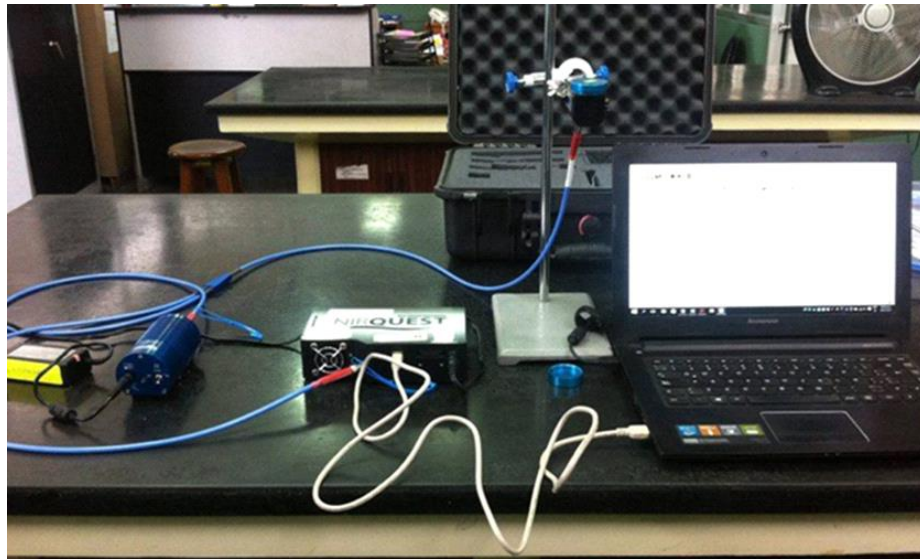
#### **3.8.1. Obtención de espectros de absorbancia y calibración**

Para obtener los espectros de absorbancia se utilizó el Espectrómetro de infrarrojo cercano NIRQuest – 512®, el cual consta de una lámpara halógena de tungsteno, un detector Hamamatsu Indio – Galio (InGaAs) y una fibra óptica que los comunica entre sí. La lámpara emite haces de luz en el rango de 900 a 1700 nm que son transmitidos a través de la fibra óptica a la muestra.

Dichos haces de luz luego de interactuar con la muestra son reflejados y recibidos por la fibra óptica que los envía al detector que interpreta la información espectral (ver Figuras 8

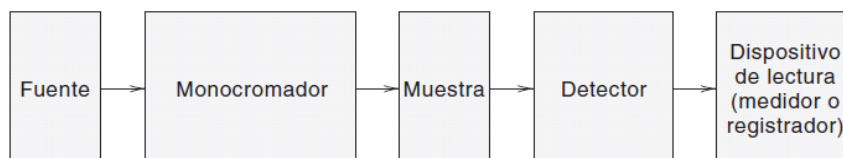


y 9). La información espectral se visualiza en una computadora usando el programa Spectrasuite.



**Figura 8: Espectrómetro de infrarrojo cercano NIRquest 512.**

Nota: Se distingue la Lámpara (a) que emite la luz monocromática que se transmite a través de la Fibra óptica (b) a la Muestra (c), luego de la interacción la luz resultante por medio de la misma fibra óptica se envía al detector del espectrómetro (d) que interpreta la información espectral y por medio de un cable USB es enviada a una laptop para almacenar la información espectral.



**Figura 9: Diagrama de bloques de un espectrómetro**

FUENTE: Christian (2009).

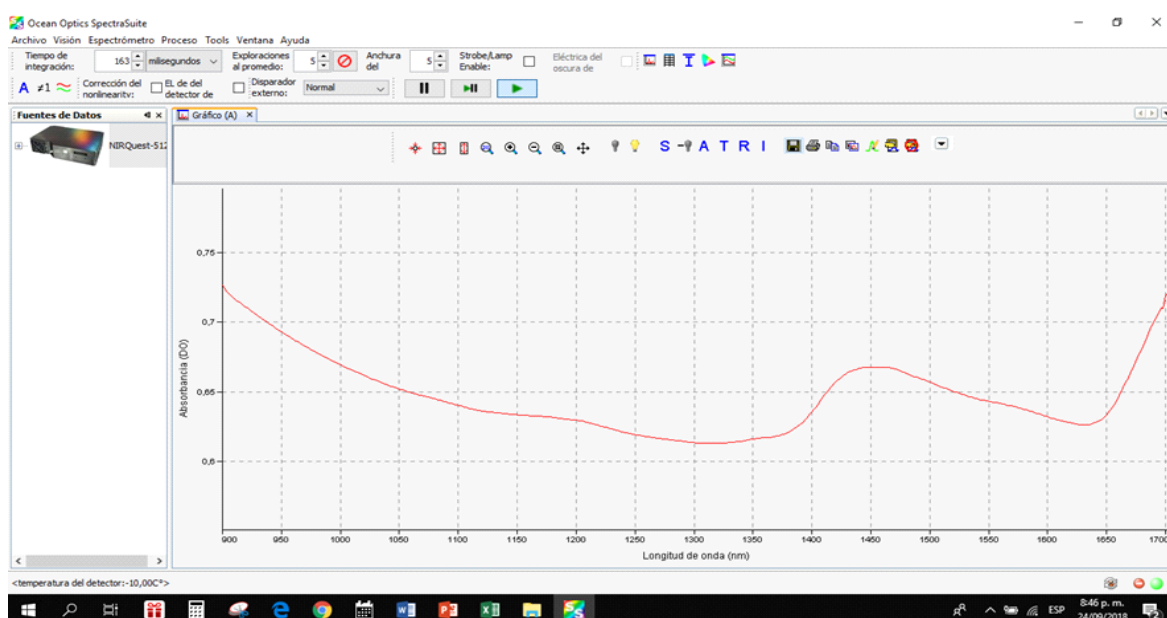
### 3.8.2. Calibración del espectrómetro

Para realizar las mediciones con el espectrómetro este se encendió previamente media hora antes y se ajustaron los 3 primeros coeficientes y el intersepto para asegurar que las mediciones se encuentren en el espectro infrarrojo especificado para el espectrómetro usado (900 a 1700 nm.), luego se ajustó el tiempo de integración del espectrómetro. Antes de medir las curvas espectrales de un conjunto de muestras se realizó la medición del espectro de referencia (contiene Spectralon que es un polímero de tetrafluoretileno) y el

espectro oscuro.

### 3.8.3. Medición de espectros absorbancia de las muestras de heces

Las muestras ya procesadas, fueron medidas con el espectrómetro almacenando la información espectral en formato spc, para ser utilizada posteriormente en la construcción de la ecuación de calibración y su validación (ver Figura 10). A cada muestra se le colocó un número de correlativo en el nombre del archivo para identificarla con su par correspondiente que procede de los análisis de proteína de referencia.



**Figura 10: Medición de absorbancia de muestra de heces con equipo NIRS usando el programa Spectrasuite.**

### 3.8.4. Selección de los pares dieta: heces

La información espectral de las muestras de heces junto con los resultados de proteína consumida correspondiente a cada llama en cada dieta y día colectado, formaron 109 pares heces - dieta, de los cuales se eliminó un par heces: dieta debido a que presentó un valor de proteína inconsistente con respecto los pares pertenecientes a la misma dieta.

Para la construcción de la ecuación de calibración se seleccionó aleatoriamente el 70% del total de pares dieta: heces (76 muestras). Los pares restantes se usaron en la validación. Se

utilizó todo el espectro que proporciona el espectrómetro (900 a 1700 nm), donde se encuentran bandas espectrales relacionadas a los enlaces C—N.

Los espectros de las muestras de calibración en formato spc se cargaron al programa Grams AI para almacenarla en un multi-archivo de formato spc que incluye todos los espectros seleccionados para la calibración.

### **3.8.5. Creación del conjunto de entrenamiento**

Posteriormente se debe de abrir el archivo recientemente creado en el programa Grams IQ en la ventana llamada conjunto de entrenamiento o *Training set*, al cual se le debe incluir los resultados de los análisis de proteína que le corresponden a cada muestra, asignando a cada muestra de absorbancia un resultado de proteína respectivo usando el número correlativo para la identificación.

Para la corrida del experimento se abrió la ventana configuración de experimento o *Experiment setup* en dicha ventana se eligieron un conjunto de parámetros antes de realizar la corrida del modelo.

### **3.8.6. Procesamiento previo de la información espectral**

Los espectros contienen información adicional que otorga variabilidad innecesaria, que pueden ser de carácter aleatorio como el ruido o sistemático como las variaciones en la línea de base, disminuyendo su habilidad predictiva (Thermofisher, 2016); sin embargo se pueden usar un conjunto de tratamientos matemáticos a los espectros antes de realizar la calibración. Se realizaron múltiples corridas con los diferentes tratamientos matemáticos, buscando obtener la ecuación con mayor  $R^2$ , menores PRESS y SECV y al mismo tiempo usando el menor número de factores. A continuación se describen los tratamientos utilizados en el presente estudio.

- **Centrar al medio**

Se aplicó centrar al medio (*Mean centering*), para eliminar las posibles desviaciones, poniendo en evidencia las diferencias entre los espectros al eliminar la tendencia común

(Thermofisher, 2016). Para un conjunto de datos  $R$  ( $I \times J$ ) de  $I$  muestras cada una de las  $J$  longitudes de onda digitalizadas discretas, la media longitud de onda  $j$  –ésima centrada de la  $i$  –ésima muestra se define según Burns y Ciurczak (2008) como:

$$mcR_{ij} = R_{ij} - \sum_{j=1}^J R_{ij}/J$$

- **Escala de Varianza**

La escala de varianza se usó para resaltar y ponderar las características espectrales del conjunto de muestras (Thermofisher, 2016). Se calculó dividiendo la respuesta en cada punto de datos espectrales por la desviación estándar de las respuestas de todos los espectros de entrenamiento en ese punto. Los datos de concentración se escalaron igualmente para cada constituyente (Thermofisher, 2016).

- **Derivación**

Se aplicó la primera derivada de Savitzky – Golay (SG – 1st) para minimizar el desplazamiento de la línea de base, aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro y el efecto de la dispersión por el tamaño de partícula (Thermofisher, 2016). Se eligió 9 puntos de suavizado.

### **3.8.7. Regresiones multivariadas usando PLS – 1 y PCR**

Los espectros contienen información multivariada correspondiente a 512 valores de absorbancia en cada muestra individual, dificultando su análisis. Empero el programa Grams IQ se vale de métodos multivariados basándose en el Análisis de Componentes Principales para reducir las variables hasta sólo las que contienen información necesaria para el modelo.

En análisis instrumental se considera que los resultados obtenidos por el método de laboratorio convencional presentan un error nulo, mientras que los que se determinan con el instrumento de medición tienen un error aleatorio (Miller y Miller, 2002). Por lo tanto; los porcentajes de proteína hallados en laboratorio (Kjeldahl) se colocaron en el eje  $x$ , mientras que los porcentajes de proteína estimados por el NIRS se ubicaron en el eje  $y$ .

Se elaboraron dos modelos, uno usando una regresión usando mínimos cuadrados para un solo factor (PLS – 1) y otra con regresión por componentes principales (PCR). El programa realizó para cada modelo 25 corridas usando desde 1 hasta 25 factores. A partir de los 25 modelos posibles en cada tipo de regresión se seleccionó el mejor respectivamente usando la Validación Cruzada considerando que este debe usar la menor cantidad de variables artificiales o componentes principales y al mismo tiempo teniendo el mayor  $R^2$ , menor PRESS y SECV (Thermofisher, 2016).

- **Coefficiente de determinación ( $R^2$ )**

Se utilizó para explicar la variabilidad de  $y$  sin considerar el efecto de la variable regresora  $x$ .

El  $R^2$  obtiene por la siguiente ecuación (Burns y Ciurczak, 2008):

$$R^2 = \frac{SC_{tot} - SC_{res}}{SC_{tot}}$$

Donde:

$R^2$ : Coeficiente de Determinación ( $0 \leq R^2 \leq 1$ )

$SC_{tot}$ : Suma de Cuadrados del Total

$SC_{res}$ : Suma de Cuadrados de los residuos

- **Error Estándar de Validación Cruzada (SECV)**

El Grams al realizar el algoritmo de Validación Cruzada produce como uno de sus indicadores estadísticos al Error Estándar de Validación Cruzada (SECV) para determinar el número de variables independientes o factores que son necesarios para construir la ecuación de calibración (Burns y Ciurczak, 2008). El SECV se calculó para varias ecuaciones simultáneas, usando desde 1 hasta 25 componentes principales y se seleccionó la ecuación con menor SECV y número de factores (Burns y Ciurczak, 2008). Shenk y Westerhaus (1996) afirman que el SECV es la mejor estimación individual de la capacidad de predicción de una ecuación.

El SECV se representa mediante la siguiente fórmula según Burns y Ciurczak (2008):

$$SECV = \left\{ \frac{\{SCres\}}{N - 1} \right\}^{1/2}$$

Donde:

SECV: Error estándar de Validación Cruzada

SCres: Suma de cuadrados de los residuos

N: Grados de libertad de cada modelo

- **Suma de Cuadrados de Error de Predicción de los Residuales (PRESS)**

El algoritmo de validación cruzada utiliza como uno de los estadísticos para evaluar los modelos generados a la Suma de Cuadrados de Error de Predicción de los Residuales (PRESS, por sus siglas en inglés), se usó para determinar el número óptimo de componentes principales. El procedimiento se realiza calculando el error de predicción  $e_{(i)}$  que se halla mediante la siguiente fórmula:

$$e_{(i)} = y_{(i)} - \bar{y}_{(i)}$$

Donde:

$e_{(i)}$ : Error de predicción del valor de la  $i$ -ésima respuesta

$y_{(i)}$ : Valor observado de la  $i$ -ésima respuesta

$\bar{y}_{(i)}$ : Valor ajustado de la  $i$ -ésima respuesta basado en todas las observaciones menos la  $i$ -ésima.

El procedimiento se realizó primero para un solo factor y luego se realiza para dos y se repitió el proceso sucesivamente hasta llegar al total de 25 factores o componentes principales y se seleccionó el modelo de calibración con el menor PRESS y menor número de factores (Burns y Ciurczak, 2008, Thermofisher, 2016).

El PRESS se define según Montgomery *et al.* (2007):

$$\text{PRESS: } \sum_{i=1}^n e^2 = \sum_{i=1}^n [y_i - \widehat{y(i)}]^2$$

Donde:

PRESS: Suma de cuadrados de error de predicción de los residuales

$e$ : error de predicción o residual

$n$ : número de observaciones

$i$ : observación  $i$ -ésima ( $i= 1, 2, 3\dots$ )

### **3.8.8. Creación del archivo de calibración**

Una vez que se seleccionó el modelo de calibración, se almacenó el archivo en formato cal, para posteriormente usarlo para la validación. Este archivo de calibración no proporciona los coeficientes de regresión sino que es válido para estimar el contenido de proteína de la dieta en muestras nuevas.

### **3.9. Validación de los modelos**

Los 32 pares restantes que no se usaron para la calibración se utilizaron para validar el modelo. Para ello, dentro del programa Grams IQ en la opción “*Add-ons*” de la barra de herramientas se abrió la herramienta *IQ Predict*. En *IQ Predict*, se cargó el modelo de calibración en formato cal. y se abrieron los espectros de las muestras de validación. Luego se dio clic en la opción *Predict*, previamente habiendo seleccionado como *outputs* la concentración estimada a partir del modelo y la distancia de *Mahalanobis* como indicador (Stuth *et al.*, 2003). Luego de esto aparece un reporte que puede ser copiado a una hoja de Excel para observar los resultados. Los porcentajes de proteína predichos por el modelo fueron comparados con los obtenidos a partir de análisis químico por medio de una regresión lineal usando mínimos cuadrados para un solo factor en el programa Microsoft Excel. La representación de las variable en los ejes  $x$  y  $y$  en las ecuaciones de Validación siguió el mismo criterio que en los modelos de Calibración.

### **3.10. Diseño Estadístico**

El diseño estadístico utilizado fue un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA). El análisis tuvo 12 tratamientos con 6 Bloques donde cada bloque corresponde a cada llama. En algunos tratamientos estuvo desbalanceado, por tanto se utilizó el procedimiento GLM. El análisis se realizó en el paquete estadístico SAS (*Statistical Analysis System*) versión 9.4.

La variable evaluada fue Consumo de proteína.

### 3.10.1. Consumo de proteína

Para los tratamientos se estableció el siguiente modelo aditivo lineal (Montgomery, 2004):

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, t \quad j = 1, \dots, b_i$$

Donde:

$y_{ij}$ : Consumo de proteína de la  $i$  – ésima dieta en la  $j$  – ésima llama

$\mu$ : media general, común a todas las unidades experimentales

$\alpha$ : efecto de la dieta  $i$  – ésima

$\beta$ : efecto de la llama  $i$  – ésima

$\epsilon$ : efecto del error de la dieta  $i$  – ésima en la  $j$  – ésima llama

### 3.10.2. Diferencia Límite Significativa (DLS)

Para determinar la diferencia entre los tratamientos se utilizó la prueba de Diferencia Límite de Significación (DLS). Para cualquier par de medias de tratamiento observadas  $y$  y la mínima diferencia significativa es (Kuehl, 2001):

$$DLS(\alpha) = t_{\alpha/2, v} \sqrt{s^2 \left[ \frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j} \right]}$$

La hipótesis nula se rechaza si:

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DLS(\alpha)$$

El nivel de significancia utilizado fue de  $\alpha = 0.05$ .



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Consumo de proteína

En la Tabla 9 se muestran los resultados para consumo de proteína expresado en  $\text{g/PV}^{0.75}$

**Tabla 9: Consumo de proteína ( $\text{g/PV}^{0.75}$ ) de llamas con diferentes niveles de proteína**

Dieta	Nivel de proteína	Consumo de proteína $\text{g/PV}^{0.75}$
9	12.1	12.0602 <sup>a</sup>
7	17.1	11.8136 <sup>a</sup>
8	14.3	10.6342 <sup>a</sup>
10	8.3	9.8097 <sup>b</sup>
6	13.2	8.2004 <sup>c</sup>
5	13.7	8.1343 <sup>c</sup>
11	6.8	8.0388 <sup>c</sup>
4	10.6	5.6409 <sup>d</sup>
12	4.8	5.3784 <sup>e</sup>
3	9.0	3.5297 <sup>f</sup>
2	5.9	1.8895 <sup>f</sup>
1	4.9	1.1406 <sup>f</sup>

Nota: Promedios con letras diferentes indica diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

Se evidenciaron diferencias significativas en el consumo de proteína entre las dietas evaluadas (ver Anexo 5). Según se observa en la Tabla 9 el consumo de proteína cruda en gramos en  $\text{g MS/Kg PV}^{0.75}$  para las dietas 1, 2 y 3 estuvo por debajo de los 5.2 de mantenimiento sugeridos por San Martín y Van Saun, (2014). Sin embargo, en condiciones de mayor altitud, se ha registrado un requerimiento de proteína de  $3.25 \text{ g PC/ Kg PV}^{0.75}$ , lo cual guarda relación con la mayor eficiencia que poseen los camélidos en estas condiciones extremas (San Martín y Van Saun, 2014). En el Anexo 7, se puede observar los porcentajes de proteína consumida promedio por cada dieta usada en el presente estudio, estos se encuentran en el rango de 4.8 a 17.1%.

San Martín (1987), en 5 llamas castradas y con fístula esofágica, obtuvo en dietas de pasto cultivado (*Festuca rubra*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens*), pastizal de *Festuca dolicophylla* (Fedo) y pastizal de *Festuca rigida* (Feri) porcentajes de proteína en muestras de la extrusa de 16.1, 9.0 y 9.8, respectivamente.

Según NRC (2007), las dietas 1, 2, 10, 11 y 12 no habrían cubierto el % de proteína mínimo para mantenimiento. Según San Martín y Van Saun (2014) se estarían cubriendo los niveles de mantenimiento todas las dietas, excepto las 1, 2 y 12.

## **4.2. Modelo de calibración**

### **4.2.1. Análisis de los modelos usando PCR y PLS – 1**

- **Número de factores o componentes principales**

La ecuación usando la regresión PLS – 1 sólo requirió 4 componentes principales a diferencia de los 5 que empleó la regresión PCR (ver Anexos 9 y 10). Por tanto la regresión PLS – 1 muestra ser superior a la PCR al utilizar una menor cantidad de componentes principales para el modelo, reduciendo la variabilidad innecesaria que a su vez disminuye la habilidad predictiva del modelo (Thermofisher, 2016).

El método de regresión PCR no considera para el cálculo de las componentes la composición química de la muestra, sin embargo si es tomado en cuenta por la regresión PLS – 1, permitiendo que esta requiera por lo general menos componentes principales y tener más precisión, como lo demuestran sus respectivos  $R^2$  y SECV (Shenk *et al.*, 1995; Naes *et al.*, 2002).

- **PRESS**

El estadístico PRESS de la ecuaciones de calibración usando PCR y PLS – 1 presentó valores de 479.3074 y 477.8687, menores al de los otros modelos desarrollados a partir de las muestras por el programa Grams, indicando que estos son los mejores modelos a comparación de cada uno de sus respectivos grupos (Ver Anexos 9, 10 y 11). No obstante, el PRESS del modelo con regresión PLS – 1 tiene un resultado numéricamente menor al

PCR (Montgomery, 2007; Burns y Ciurczak, 2008).

El PRESS se calcula a partir de la suma de los cuadrados de la diferencia del error de predicción. Se emplea para evaluar que tan bien funciona un modelo de regresión para predecir nuevos datos. Por tanto, se entiende que a un mayor valor de residuales, el cuadrado de los mismos también será mayor y se reflejará en el PRESS (Montgomery, 2007; Burns y Ciurczak, 2008).

- **R<sup>2</sup> y SECV**

La ecuación usando PCR obtuvo un R<sup>2</sup> de 0.58, mientras que para el PLS – 1 el R<sup>2</sup> fue de 0.61 indicando que cada modelo de regresión explica el 58 y 61% de la variabilidad de los datos (Montgomery et al, 2007). Las ecuaciones de calibración usando regresión PCR y PLS – 1 (ver Figuras 11 y 12), mostraron valores de SECV de 2.545 y 2.507, respectivamente. Se puede inferir que el SECV de la ecuación PLS – 1 es superior al PCR. Los resultados de trabajos anteriores en especies rumiantes se resumen en la Tabla 7.

Según Li (2007), para que una ecuación NIRS se considere aceptable R<sup>2</sup> > 0.8. El espectro de longitud de onda utilizado para las calibraciones en experiencias previas en promedio estuvo en el rango de 1100 – 2500 nm (ver Tabla 7). Esto es confirmado por la literatura (Shenk *et al.*, 2008), pues sólo hay una banda espectral relacionada intrínsecamente a proteínas en el rango del espectro utilizado en el presente trabajo (900 – 1700 nm), mientras que en longitudes de onda de 2180 – 2470 nm existen hasta 4 bandas relacionadas a proteína. Esto explicaría el R<sup>2</sup> más bajo y el SECV más alto que los encontrados en la bibliografía. Sin embargo, Awuma (2003) encontró que las longitudes de onda de 1620 y 1124 nm en vacunos, 1300 y 1564 nm para ovinos y 1532 y 1188 nm para caprinos, eran las que tenían más relación con los enlaces N – H, amidas y grupos de aminoácidos en cada uno de los modelos. No obstante Leite y Stuth (1995), encontraron que las longitudes de onda más relevantes para su modelo de calibración fueron 2027, 2174, 2241, 2260 y 2305 nm.

Acosta *et al.* (2020), realizó un conjunto de calibraciones para estimar el valor nutritivo (%PC) de muestras de Pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) y Pasto Varilla (*Panicum*

*virgatum*) usando espectrómetros con diferentes rangos de longitud de onda. Los  $R^2$  obtenidos fueron los siguientes: 0.99, 0.98 y 0.96 para los equipos Foss 6500 (1100 – 2498 nm), microPHAZIR (1600 – 2400 nm), DRP NIRscan Nano (900 – 1700 nm) respectivamente. Estos resultados demuestran que los equipos NIR portátiles poseen el potencial para proveer resultados similares a los dispositivos estándar, pero se requiere de mayor investigación al respecto.

Según se puede apreciar en la Tabla 7, los tipos de regresión más utilizados son los de Regresión Escalonada Modificada (MSR) Mínimos Cuadrados Parciales Modificados (MPLS) y Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).

#### **4.2.2. Análisis de las gráficas de los modelos**

Las gráficas de los modelos de calibración PCR y PLS – 1 muestran una sobreestimación de porcentaje de proteína en las dietas de menor concentración de dicho nutriente, frente a los resultados de laboratorio (ver Figuras 11 y 12).

Se puede observar que en los dos modelos de calibración en los ejes  $x$  se encuentran los valores de proteína de referencia del análisis Kjeldahl y en el eje  $y$  los estimados de proteína del modelo. Esto se debe a que en análisis instrumental para las curvas de calibración se considera que el error de los valores de referencia es despreciable (Miller y Miller, 2000).

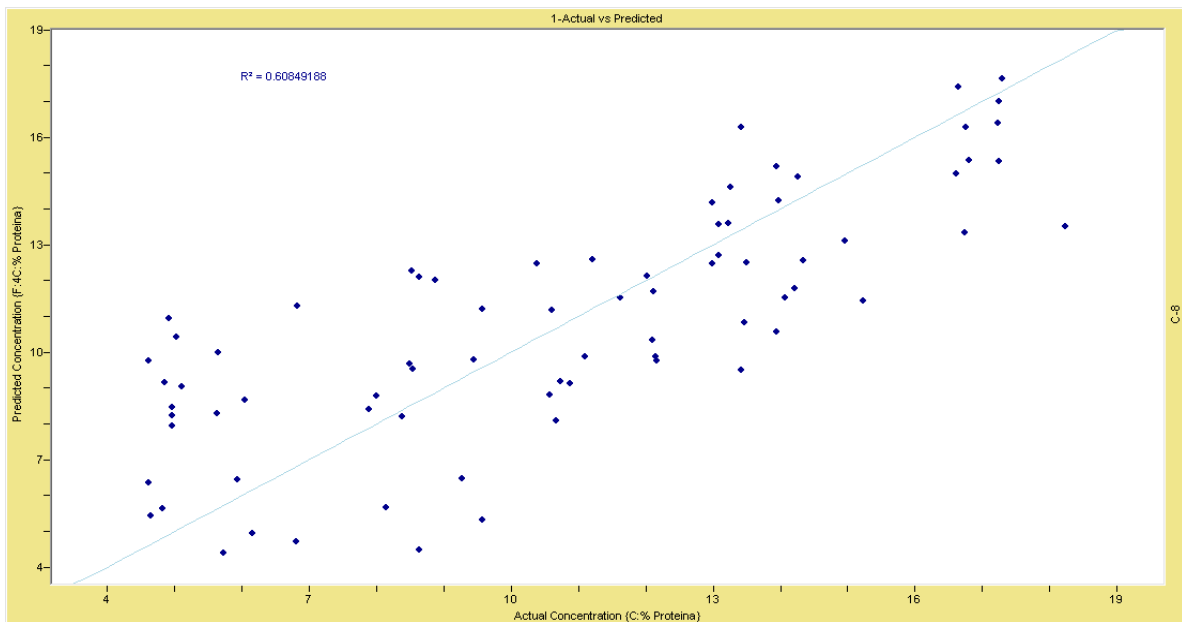
Una posible explicación de la sobreestimación del porcentaje de proteína en dietas de menor calidad, es que los camélidos sudamericanos poseen características digestivas que les permiten mayor eficiencia al consumir plantas de baja calidad nutritiva, produciendo más proteína microbiana en comparación a especies rumiantes (San Martín y Van Saun, 2014).

Robinson *et al.* (2006), evaluó el flujo de nitrógeno (N) en 4 llamas y 4 cabras (*Capra hircus*) raza Boer utilizando 3 dietas con diferentes especies forrajeras: Alfalfa (*Medicago sativa*), Festuca alta (*Festuca arundinacea*) y pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) cada una con 20, 10.4 y 10.3%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en

el N excretado en heces por las llamas. No obstante, si se observó diferencias en el N excretado en las 3 dietas para las cabras observándose una mayor excreción en la dieta de heno de alfalfa, seguido de pasto Bermuda y por último Festuca alta.

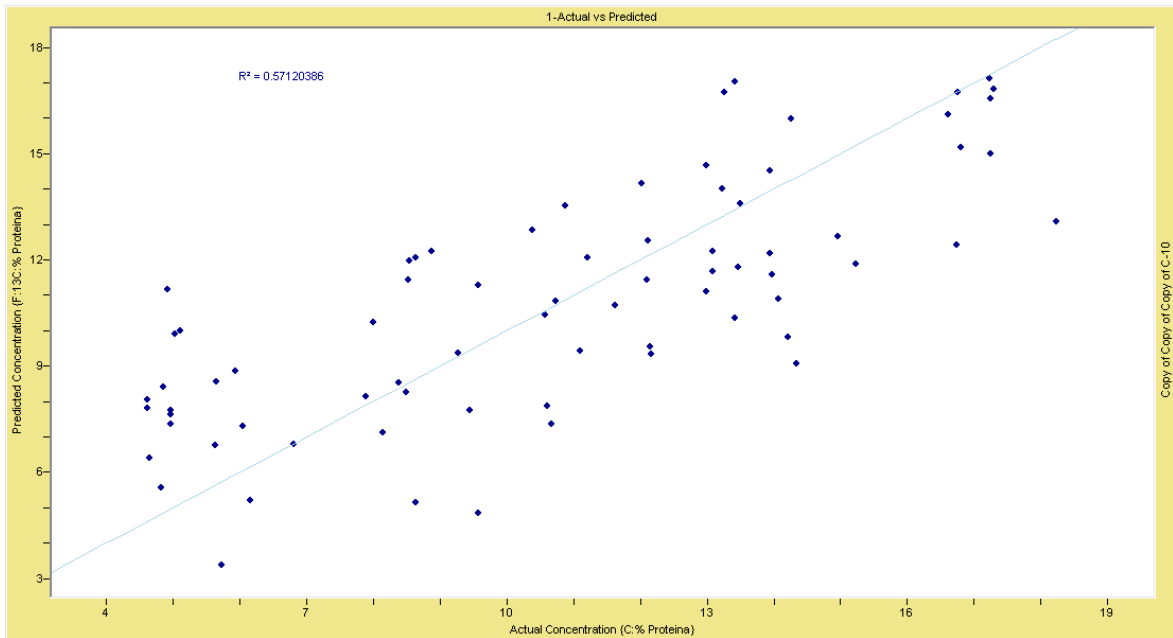
Dixon y Coates (2008), afirman que parte del N hallado en heces de especies rumiantes procede de la dieta, sumado al N microbiano producido por medio de la fermentación de la dieta consumida y el N endógeno de las secreciones y paredes del tracto digestivo.

Las ecuaciones de calibración han identificado alrededor de 8 – 12 longitudes de onda que explican el 85 – 95% de la variabilidad en la calidad de dieta con una precisión similar a los métodos tradicionales de laboratorio (Stuth *et al.*, 2003). Una dificultad que presentan los modelos obtenidos con el programa GRAMS es que no se muestran los coeficientes de regresión ni las longitudes de onda relevantes.



**Figura 11: Ecuación de calibración usando regresión PLS – 1. ( $R^2= 0.6084918$ ).**

FUENTE: Tomado del programa Grams IQ.



**Figura 12: Ecuación de calibración usando regresión PCR ( $R^2= 0.5877677$ ).**

FUENTE: Tomado del programa Grams IQ.

### 4.3. Validación de los modelos

Se realizó la validación de los modelos de calibración PLS – 1 y PCR usando el programa Grams IQ (ver Anexos 12 y 13). El análisis de regresión lineal realizado en Microsoft Excel con cada modelo se encuentra en los Anexos 14 y 15.

Según las Figuras 13 y 14, a partir de las regresiones de mínimos cuadrados de los resultados de laboratorio en contraste de los estimados por los modelos PLS – 1 y PCR donde sus  $R^2$  son 0.46 y 0.45 y los valores promedio de la distancia de Mahalanobis (H – valor) son de  $0.7 \pm 0.25$  y  $0.8 \pm 0.2$  para cada uno.

Es notoria la diferencia entre los  $R^2$  de la calibración con la validación. Esto podría deberse al rango de longitud de onda utilizada por el NIRQUEST, que no contiene suficientes bandas espectrales relacionadas a la proteína, lo cual reduce su habilidad predictiva (Awuma, 2003; Lyons y Stuth, 1995; Shenk *et al.*, 2008).

Según Robinson *et al.* (2006), no se encontraron diferencias en el N fecal/Peso Metabólico en las dietas de Heno de Alfalfa, Festuca alta y Pasto Bermuda en llamas (0.23 - 0.27 g/d FN/BW). Mientras que en cabras si se encontraron diferencias en el N fecal entre las

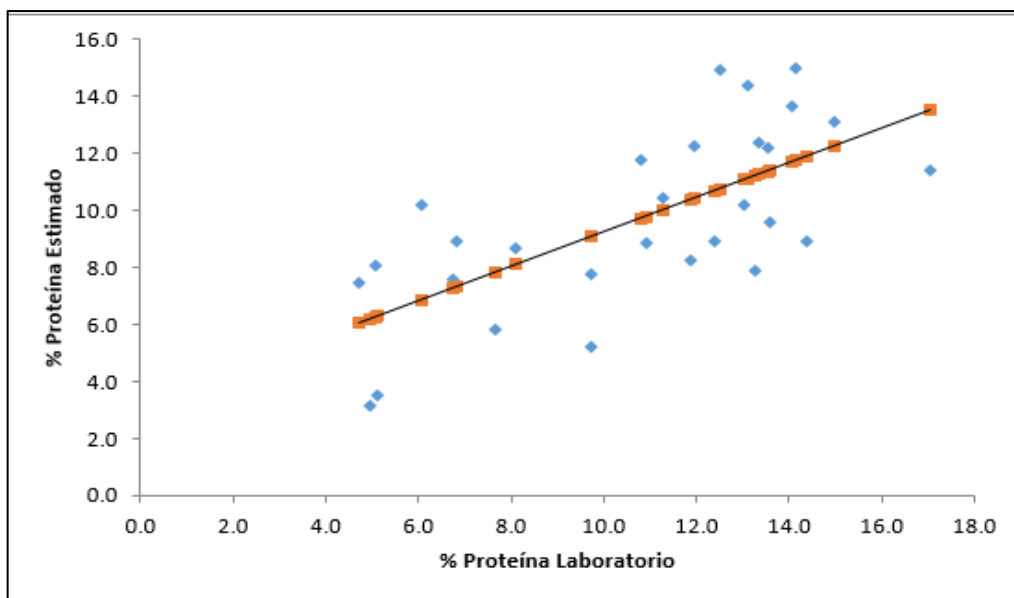
mismas dietas (0.17, 0.26 y 0.43 g/d FN/BW).

Davies *et al.*, (2007), realizaron un ensayo de balance de nitrógeno en llamas y alpacas usando una dieta de 100% Cebada (9.9 %PC) y otra dieta con 80% de Cebada y 20% de Heno de alfalfa (12 %PC). Se hallaron diferencias en los niveles de N fecal (g/d) en cada una de las dietas, tanto en llamas como en alpacas.

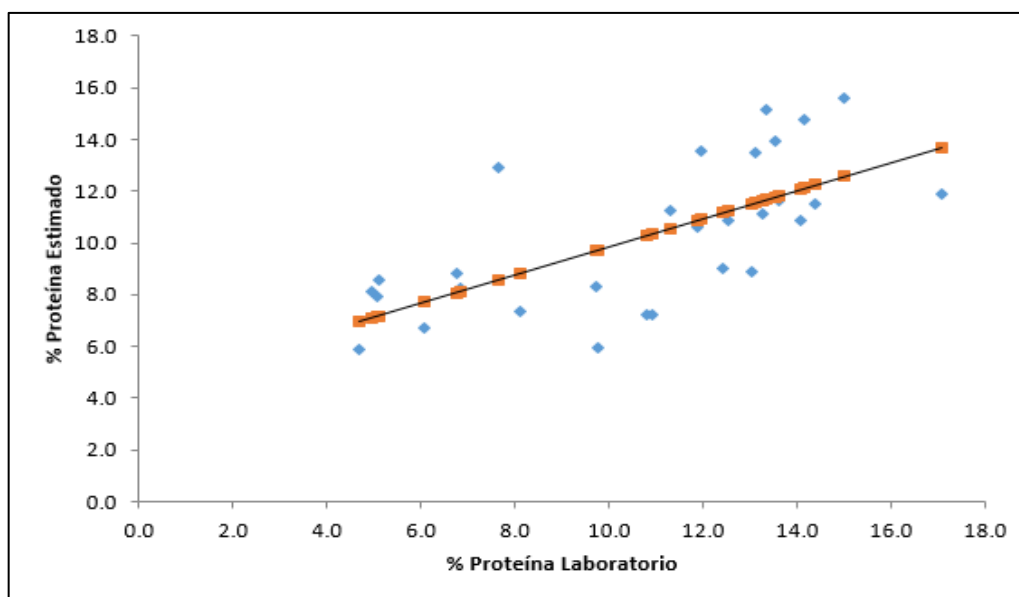
Leite y Stuth (1995) en cabras, obtuvieron un  $R^2$  de 0.94 en la validación de un modelo de regresión escalonada modificada (MSR) con muestras distintas de una región geográfica diferente a las utilizadas en la calibración. Lyons y Stuth (1992), en dos validaciones de modelos MSR con 18 vacas en producción y 18 en seca se obtuvieron  $R^2$  de 0.45 y 0.57, respectivamente.

Li *et al.* (2007), con un  $P < 0.03$  en dos validaciones de modelos PLS de ovinos realizadas en Dakota del Sur usando 10 y 12 muestras obtuvieron un  $R^2$  de 0.55 y 0.8, respectivamente; mientras que en Texas en dos validaciones con 78 muestras cada uno se obtuvo un  $R^2$  de 0.81 y 0.66. Showers *et al.* (2006), realizó una validación de un modelo PLS – 1 en venado de cola blanca en confinamiento y con 11 muestras obtuvo un  $R^2$  de 0.79. El H – valor promedio hallado fue de  $1.26 \pm 0.14$  lo cual indicaría características espectrales similares a su conjunto de Calibración.

Landau *et al.* (2004) explica que si en la validación H – valor  $< 0.5$  se puede considerar que las cabras usadas en su experimento comieron lo mismo que en la calibración. No obstante, la probabilidad de redundancia en la información espectral en muestras de heces es menor que en modelos de calibración con plantas debido a que el espectro de las heces contiene características inherentes a la digestión de cada individuo, otorgándole mayor variabilidad.



**Figura 13: Análisis de regresión de mínimos cuadrados para la validación del modelo PLS – 1 ( $R^2= 0.46459414$ ).**



**Figura 14: Análisis de regresión de mínimos cuadrados para la validación del modelo PCR ( $R^2= 0.4541577$ ).**

#### 4.4. Ventajas de la espectrometría de infrarrojo cercano

La espectrometría de infrarrojo cercano como método de predicción de calidad de dieta presenta ventajas comparativas frente a los análisis tradicionales, ya que los modelos construidos usando NIRS al incorporarse a un software nutricional como el NutBal – Pro,



se pueden utilizar como parte de un Sistema de Soporte de Decisiones. Sólo se requieren muestras de heces del ganado al pastoreo para estimar el desempeño productivo proyectado en un periodo de tiempo determinado y en caso sea necesario el requerimiento de suplementación para el ganado mientras continúe alimentándose en dicho campo (SRM, 2010). En el caso de proteína cruda, su estimación se ve favorecida debido a las altas concentraciones que se encuentran en las plantas a comparación de componentes traza como minerales, ceniza y otros (Stuth *et al.*, 2003).

## V. CONCLUSIONES

1. El consumo de alimento de las llamas fue afectado por el porcentaje de FDN, siendo la alfalfa de mayor preferencia frente a la panca molida y el pasto Camerún.
2. La calibración y validación de las ecuaciones de predicción NIRS para proteína tuvieron un  $R^2$  de 0.61 y 0.46 respectivamente, evidenciando una baja habilidad predictiva del modelo en el rango de 900 a 1700 nm.
3. La diferencia entre los  $R^2$  de calibración con los de la validación del NIRS demuestran que los modelos PLS – 1 y PCR no son buenos predictores cuando se usan muestras nuevas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Incrementar el número de muestras de dieta, especies forrajeras y heces para aumentar la precisión de la ecuación e incluir especies de pastizal en el desarrollo del modelo.
2. Desarrollar un modelo de calibración similar para la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y realizar ensayos similares en otras especies de camélidos sudamericanos.
3. Evaluar un modelo similar ampliando el rango del espectro infrarrojo cercano de 1100 – 2500 nm.
4. Incorporar los modelos desarrollados usando NIRS a un modelo nutricional que sirva como Sistema de Soporte de Decisiones para camélidos al pastoreo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J.J.; Castillo, M.S.; Hodge, G.R. (2020). Comparison of Benchtop and Handled Near Infrared Spectroscopy Devices to Determine Forage Nutritive Value. *Crop Science*. <https://doi.org/10.1002/csc2.20264>
- Alvarez, J.B. (1993). Composición botánica y valor nutricional de las dietas de alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) y ovinos (*Ovis aries*) al pastoreo libre, durante el periodo de secano en puna seca. (Tesis Pregrado). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Arnold, G.W.; Mc. Manus, W.R.; Bush, F.G. (1964). The use of sheep fitted with oesophageal fistulas to measure diet quality. *Exp. Agr. Animal Hub.* 4:71
- Austin, D.D.; Urnes, P.J.; Fierro, L.C. (1983). Spring Livestock Grazing affects crested Wheatgrass Regrowth and Winter use by Mule deer. *Journal of Range Management*.
- Awuma, K. (2003). Application of NIRS fecal profiling and geostatistics to predict diet quality of African livestock. (Tesis Doctoral). Texas A&M University, College Station, Texas. Recuperada de <https://core.ac.uk/download/pdf/4269101.pdf>
- Barton, F.E. (1989). Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No.643
- Boogert, N.J.; Reader, S.M.; Laland, K.N. (2006). The relation between social rank, neophobia and individual learning in starlings. *Animal Behaviour*, 72(6), 1229–1239. DOI:10.1016/j.anbehav.2006.02.021

- Boval, M.; Coates, D.B.; Lecomte, P.; Decruyenaere, V.; Archimede, H. (2004). Faecal near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to assess chemical composition, in vivo digestibility and intake of tropical grass by Creole cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114. 19–29. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2003.12.009
- Burns, D.A.; Ciurczak, E.W. (2008). Handbook of Near – Infrared Analysis. (3° ed.). CRC Press. Recuperado de <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Near-Infrared-Analysis/Burns-Ciurczak/p/book/9780849373930>
- Burrit, E.A.; Provenza, F.D. (1991). Ability of lambs to learn with a delay between food ingestion and consequences given meals containing novel and familiar foods. *Appl Anim Behav Sci* 32: 179-189. DOI: 10.1016/S0168-1591(05)80041-3
- Carmean, B.R.; Johnson, K.A.; Johnson, D.E.; Johnson, L.W. (1992). Maintenance energy requirement of llamas. *Am. J. Vet. Res.* 53. 1696–1698.
- Cebra, C.; Anderson, D.E.; Tibary, A.; San Martin, F.; Van Saun, R.; Johnson, L.R. (2014). Llama and alpaca care, Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health. En C. Cebra; D.E. Anderson; A. Tibary; R. Van Saun; L.R. Johnson. Capítulo 8: Applied Digestive Anatomy and Feeding Behavior, Capítulo 9: Nutritional Requirements. Elsevier. Canada.
- Christian, G.D. (2009). *Química Analítica*. México: Mc. Graw-Hill Interamericana.
- Coates, D.B. (1998). Predicting diet digestibility and crude protein content from the faeces of grazing cattle. Final Report, Project CS.253, CSIRO, Townsville, Australia.
- Davies, A.M.; Grant, A. (1987). Review: Near infra-red analysis of food. *Int. J. Food Sci. Technol.* 22: 191 – 207
- Davies, H.L.; Robinson, T.F.; Roeder, B.L.; Sharp, E.M.; Johnston, N.P.; Christensen, A.C.; Shaalje, G.B. (2007). Digestibility, nitrogen balance, and blood metabolites in llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) fed barley or barley alfalfa diets. *Small Ruminant Research* 73 (2007) 1 – 7

- Dixon, R.; Coates D.B. (2009). Near infrared spectroscopy of feces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17, 1 – 31
- Fernández, S. (1962). Algunos aspectos del desarrollo dentario en la alpaca (*Lama pacos*). *Rev. Fac. Med. Vet. Lima*, 16-17: 88 – 103
- Fowler, M.E. (1998). *Feeding and nutrition*. In: *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco*. (2<sup>th</sup> ed.). Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp. 12 – 48.
- Grams Suite Help. (2016). Massachusetts, United States of America: Thermo Fisher Scientific.
- Gutiérrez, G. (1993). Masticación ingestiva y fragmentación de forrajes de diferente longitud en ovinos, alpacas y llamas. (Tesis Maestría). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina
- Hodgson, J. (1969). The use of sheep fitted with oesophageal fistulae in grazing studies. *J. Br. Grasslands*.
- Infrasoft International. (1992). NIRS3 Version 3.00: Routine Operation, Calibration and Network System Management Software for Near Infrared Instruments. InfraSoft International, Port Matilda, Pennsylvania. United States of America
- Jean, P. O; Bradley, R.L.; Giroux, M.A.; Tremblay, J. P.; Coté, S.D. (2014). Near Infrared Spectroscopy and Fecal Chemistry as Predictors of the Diet Composition of White-Tailed Deer. *Rangeland Ecol Manage* 67:154–159 | March 2014 | DOI: 10.2111/REM-D-13-00112.1.
- Keating, M. S. (2005). Prediction of diet quality parameters of Rocky Mountain Elk via near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) fecal profiling. Tesis Doctoral, Texas A&M University Texas – United States of America

- Landau, S.; Glasser, T.; Dvash, L.; Perevolotsky, A. (2004). Faecal NIRS to monitor the diet of Mediterranean goats. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34 (Suppl. I). 76–80. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/6feb/1a909b66a921ed3a06ad48c352d309d3ad28.pdf>
- Langlands, J.P. (1975). Techniques for estimating nutriente intake and its utilization by the grazing ruminant. In: *Digestion and metabolism in the ruminant*. Mc Donald I.W., A.C.I. Warner. Proc, IV Int. Symp. Ruminant Phisiol. University of New England Publications Unit.
- Leite, E.R.; Stuth, J.W. (1995). Fecal NIRS equations to assess diet quality of free-ranging goats. *Small Rumin. Res.* 15, 223 – 230. DOI.org/10.1016/0921-4488(94)00026-4
- Li, H.; Tolleson, D.; Stuth, J.; Baic, K.; Moa, F.; Kronberg, S. (2007). Faecal near infrared reflectance spectroscopy to predict diet quality for sheep. *Small Ruminant Research* 68 (2007) 263–268. Recuperado de: <https://naldc.nal.usda.gov/download/10817/PDF>
- Lyons, R.K.; Stuth, J.W.J. (1992). Fecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle *Range Manage.* 45:238-244, May 1992.
- Mc. Donald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D. (1999). *Nutrición Animal*. Zaragoza, España: Acribia.
- Montgomery, D. (2012). *Diseño y Análisis de Experimentos*. México D.F., México: Limusa Wiley.
- Miller, N.J.; Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid, España. Pearson Education Limited.
- Murray, I. (1993). Forage Analysis by Near Infra-Red Reflectance Spectroscopy. In: Davies, Baker, Grant and Laidlaw (Eds.), *Sward Measurement Handbook*. British Grassland Soc., pp: 285 – 312.
- National Research Council (NRC). (2007). *Nutrient Requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and New World camelids*. Washington D.C., United States of

America: National Academic Press.

National Research Council (NRC). (1981a). Nutrient Requirements of Goats: Angora, Dairy and Meat Goats in Temperate and Tropical Countries. Washington D.C., United States of America: National Academy Press.

National Research Council (NRC). (1996). Nutrient Requirements of Beef Cattle, seventh revised ed. Washington D.C. United States of America: National Academy Press.

National Research Council (NRC). (1981b). Effect of Environment on Nutrient Requirements of Domestic Animals. Washington D.C., United States of America: National Academy Press.

National Research Council (NRC). (1985). Nutrient Requirements of Sheep, sixth revised ed. National Academy Press. Washington D.C. 99 pp.

Ñaupari, J.A. (2000). Comportamiento Nutricional y Perfil Alimentario de Vacas Lecheras en Pastos Cultivados Rye Grass/Trébol de la U.P. Consac. (Tesis Maestría). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Ohanian, H.; Markert, J. (2009). *Física para Ingeniería y Ciencias*. México D.F., México: Mc. Graw-Hill.

Oscanoa, L.L.; Flores, E.R. (1992). Avances en la Ecología de la Nutrición de ovinos, alpacas y llamas en el Ecosistema de Puna Seca. Boletín Técnico No. 3 Programa de Ovinos y Camélidos Americanos: División de Pastos Naturales. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Ozaki, Y.; Mc Clure, F.D; Christy, A.A. (2007). Near -Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. Wiley Online Library. Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. <https://doi.org/10.1002/9780470047705.ch2>

Provenza, F.D. (1995). Tracking variable environments: there is more than one kind on memory. J Chem Ecol 21: 911-923. doi: 10.1007/BF02033798



- Provenza, F.D.; Launchbaugh, K.L. (1999). Foraging on the edge of chaos. In: Grazing behavior of livestock and wildlife. USA: Univ of Idaho. 1-12 p.
- Roberts, C.A.; Workman, J.; Reeves, J.B. (2004). Near - Infrared Spectroscopy in Agriculture. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America.
- Robinson, T.F.; Sponheimer, M.; Roeder, B.L.; Passey, B.; Cerling, T.E.; Dearing, M.D.; Ehleringer, J.R. (2006). Digestibility and nitrogen retention in llamas and goats fed alfalfa, C<sub>3</sub> grass, and C<sub>4</sub> grass hays. *Small Ruminant Research* 64 (2006) 162–168.
- San Martín, F. (1987). Comparative Forage Selectivity and Nutrition of South American Camelids and Sheep. Presentado a la Facultad de Graduados de Texas Tech University en Cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de Ph. D. URI: <http://hdl.handle.net/2346/14488>
- San Martín, F.; Bryant, F.C. (1987). Nutrición de los camélidos sudamericanos. Estado de nuestro conocimiento. Artículo técnico. Texas, Estados Unidos de América: College of Agricultural Sciences. Texas Tech University
- Schneider, W.; Hauffe, R.; Von Engelhardt, W. (1974). Energy and nitrogen exchange in the llama. In: Proceedings of Sixth Symposium Energy Metabolism of Farm Animals, European Assoc. Anim. Prod. Pub. No. 14. 127–130.
- Showers, S.E.; Tolleson, D.R.; Stuth, J.W.; Kroll, J.C.; Koerth, B.H. (2006). Predicting Diet Quality of White-Tailed Deer via NIRS Fecal Profiling. *Rangeland Ecol Manage* 59:300–307 | May 2006.
- Society of Range Management. (2010). Shining Light on Manure Improves Livestock and Land Management. Technical Bulletin SANG-2010-0250.
- Stuth, J.; Jama, A.; Tolleson, D. (2003). Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance. *Field Crops Research* 84, 45-56.

- Turin, C.; Gamarra, J.; Gutiérrez G. (2001). Influencia de la alimentación con pastos naturales y cultivados en alpacas Tuis Huacaya de 6 y 18 meses de edad. *Anales Científicos UNALM*. Setiembre – Diciembre 2001. Volumen XLIX.
- Van Saun, R.J. (2009). Nutritional Requirements and Assessing Nutritional Status in Camelids. *Vet Clin Food Anim* 25 (2009) 265–279. doi:10.1016/j.cvfa.2009.03.003
- Vilá, B. (2012). *Camélidos sudamericanos*. Buenos Aires, Argentina: Eudeba.
- Wofford, H.; Holechek, J.L.; Gaylean, M.L.; Wallace, J.D.; Cardenas, M. (1985). Evaluation of Fecal Indices to Predict Cattle Diet Quality. *Journal of Range Management* 38(5) (1985).

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Glosario de terminología usada en el trabajo de investigación

ANOVA: Análisis de Varianza

Cross – Validation: Validación Cruzada

DLS: Diferencia Límite Significativa

Extrusa: Porción de alimento procedente del esófago

FDN: Fibra Detergente Neutra

Near Infrared Reflectance Spectrometry (NIRS): Espectrometría de infrarrojo cercano

National Research Council (NRC): Consejo Nacional de Investigación

Prediction Residual Error Squares Sum (PRESS): Suma de Cuadrados de Error del Residual

Principal Least Squares (PLS – 1): Mínimos Cuadrados Parciales para un solo Factor

Principal Component Analysis (PCA): Análisis de Componentes Principales

Principal Components Regression (PCR): Regresión por Componentes Principales

R<sup>2</sup>: Coeficiente de Determinación

Standard Error of Cross Validation (SECV): Error Estándar de Validación Cruzada

$\lambda$ : Longitud de onda

**ANEXO 2 : Base de datos de Porcentaje de proteína consumido, Peso vivo de las llamas (Kg), Peso metabólico (PV)<sup>0.75</sup>, Consumo de alimento (g), Consumo de proteína (g) y Consumo de Proteína (g MS/Kg PV<sup>0.75</sup>)**

Código	%Proteína	PV llama (Kg)	Peso Met (PV) <sup>0.75</sup>	Cons alimento (g)	Cons Proteina (g)	Cons Prot gMS/Kg PV <sup>0.75</sup>
F_D1_D6	4.81184679	115	35.11748	731	35.1746	1.002
T_D1_D6	4.6380531	155	43.92874	1243	57.651	1.312
C_D1_D6	5.02808714	137	40.04427	941	47.3143	1.182
M_D1_D6	4.96125884	124	37.15919	707	35.0761	0.944
F_D1_D7	5.06351064	115	35.11748	752	38.0776	1.084
T_D1_D7	4.84518243	155	43.92874	1343	65.0708	1.481
C_D1_D7	5.10537961	137	40.04427	922	47.0716	1.175
M_D1_D7	5.09813953	124	37.15919	688	35.0752	0.944
T_D2_D6	6.07710372	155	43.92874	2044	124.216	2.828
C_D2_D6	6.04868093	137	40.04427	1122	67.8662	1.695
L_D2_D6	5.93026052	137	40.04427	998	59.184	1.478
M_D2_D6	6.14725768	124	37.15919	846	52.0058	1.400
F_D2_D7	5.63649351	115	35.11748	1232	69.4416	1.977
T_D2_D7	5.63879177	155	43.92874	1945	109.6745	2.497
C_D2_D7	5.73185185	137	40.04427	945	54.166	1.353
F_D3_D6	9.74128447	115	35.11748	1338.3	130.36761	3.712
T_D3_D6	9.27336167	155	43.92874	2093.9	194.17492	4.420
C_D3_D6	9.57361262	137	40.04427	1378.5	131.97225	3.296
D_D3_D6	9.45002127	127	37.83143	1222.2	115.49816	3.053

«continuación»

---

L_D3_D6	9.74496201	137	40.04427	1487.1	144.91733	3.619
M_D3_D6	9.5722659	124	37.15919	1424.6	136.3665	3.670
F_D3_D7	8.63810437	115	35.11748	1460.2	126.1336	3.592
T_D3_D7	8.11463109	155	43.92874	2346.1	190.37736	4.334
C_D3_D7	8.37848345	137	40.04427	1513.3	126.79159	3.166
D_D3_D7	8.29224928	127	37.83143	1347.1	111.70489	2.953
L_D3_D7	8.13703463	137	40.04427	1648.7	134.15529	3.350
M_D3_D7	8.49830408	124	37.15919	1395.7	118.61083	3.192
F_D4_D6	10.8743697	115	35.11748	1665.1	181.06913	5.156
T_D4_D6	10.5690345	155	43.92874	2402.9	253.96333	5.781
C_D4_D6	11.2076996	137	40.04427	2025.3	226.98954	5.668
D_D4_D6	8.12648236	127	37.83143	1924.3	156.3779	4.134
L_D4_D6	10.7289946	137	40.04427	2194.1	235.40487	5.879
M_D4_D6	11.2837549	124	37.15919	1870.9	211.10777	5.681
F_D4_D7	10.3905046	115	35.11748	1851.1	192.33863	5.477
T_D4_D7	10.8112002	155	43.92874	2449.5	264.82035	6.028
C_D4_D7	10.9177012	137	40.04427	2072.4	226.25844	5.650
D_D4_D7	11.1020468	127	37.83143	2126.2	236.05172	6.240
L_D4_D7	10.5992525	137	40.04427	2194	232.5476	5.807
M_D4_D7	10.6654162	124	37.15919	2156.5	229.9997	6.190
F_D5_D6	13.4721739	115	35.11748	2070	278.874	7.941

---

«continuación»

---

T_D5_D6	13.0828769	155	43.92874	2488.8	325.60664	7.412
C_D5_D6	13.9825072	137	40.04427	2233.6	312.31328	7.799
M_D5_D6	12.985979	124	37.15919	2264.6	294.08048	7.914
F_D5_D7	14.0779094	115	35.11748	2244.3	315.95052	8.997
T_D5_D7	13.4223864	155	43.92874	2690.2	361.08904	8.220
C_D5_D7	14.2167579	137	40.04427	2192.1	311.64555	7.783
D_D5_D7	13.9374928	127	37.83143	2287.8	318.86196	8.428
L_D5_D7	13.3397045	137	40.04427	2477.4	330.47784	8.253
M_D5_D7	14.1564858	124	37.15919	2256.3	319.41279	8.596
T_D6_D6	13.5343228	155	43.92874	2498.4	338.14152	7.698
C_D6_D6	12.5160425	137	40.04427	2146.8	268.6944	6.710
D_D6_D6	13.2540652	127	37.83143	2468.5	327.1766	8.648
L_D6_D6	13.0453652	137	40.04427	2556.1	333.45258	8.327
M_D6_D6	12.9890383	124	37.15919	2486.1	322.92048	8.690
F_D6_D7	13.2518423	115	35.11748	2438.2	323.10642	9.201
T_D6_D7	13.5010296	155	43.92874	2507.8	338.57882	7.707
C_D6_D7	13.4137516	137	40.04427	2383	319.6497	7.982
L_D6_D7	13.0935031	137	40.04427	2540.3	332.61426	8.306
M_D6_D7	13.1091154	124	37.15919	2475.8	324.55548	8.734
F_D7_D6	16.7399059	115	35.11748	2974.5	497.9285	14.179
T_D7_D6	17.2429065	155	43.92874	3124	538.6684	12.262

---

«continuación»

---

C_D7_D6	18.2431762	137	40.04427	780.5	142.3879901	3.556
D_D7_D6	17.0591059	127	37.83143	3104.8	529.65112	14.000
L_D7_D6	16.8114609	137	40.04427	2966.6	498.7288	12.454
M_D7_D6	16.7623706	124	37.15919	3053.7	511.87251	13.775
F_D7_D7	16.6516738	115	35.11748	3168.8	527.65824	15.026
T_D7_D7	17.2529751	155	43.92874	3127.3	539.55229	12.282
C_D7_D7	17.233003	137	40.04427	974.7	167.97008	4.195
D_D7_D7	17.2970295	127	37.83143	3105.2	537.10736	14.197
M_D7_D7	16.6185106	124	37.15919	3135.5	521.0734	14.023
F_D8_D6	13.5961263	115	35.11748	3126.7	425.11008	12.105
T_D8_D6	14.9837699	155	43.92874	2042.5	306.0435	6.967
C_D8_D6	15.2324349	137	40.04427	3050.6	464.68066	11.604
L_D8_D6	13.231347	127	37.83143	2850.8	377.19924	9.971
M_D8_D6	14.2649254	124	37.15919	3606.2	514.42174	13.844
T_D8_D7	14.9622326	155	43.92874	1771.5	265.05595	6.034
C_D8_D7	14.3420698	137	40.04427	2819.6	404.389	10.099
L_D8_D7	13.9507551	137	40.04427	3146.4	438.94656	10.962
M_D8_D7	14.3918799	124	37.15919	3646.5	524.7999	14.123
F_D9_D6	11.9648795	115	35.11748	4062.1	486.02537	13.840
T_D9_D6	12.1598738	155	43.92874	4443.9	540.37263	12.301
C_D9_D6	12.0969608	137	40.04427	4096.5	495.552	12.375

---

«continuación»

---

L_D9_D6	12.1190136	137	40.04427	3925.4	475.71976	11.880
M_D9_D6	11.8856714	124	37.15919	4089.1	486.01699	13.079
T_D9_D7	12.407447	155	43.92874	3964	491.8312	11.196
C_D9_D7	12.1539877	137	40.04427	3459.9	420.51582	10.501
L_D9_D7	12.0262138	137	40.04427	4004	481.5296	12.025
M_D9_D7	11.6289655	124	37.15919	3625	421.55	11.344
F_D10_D6	8.40997429	115	35.11748	4668	392.5776	11.179
T_D10_D6	8.53077694	155	43.92874	4891	417.2403	9.498
C_D10_D6	7.88902494	137	40.04427	4410	347.906	8.688
L_D10_D6	7.99783993	137	40.04427	4398	351.745	8.784
F_D10_D7	8.54215054	115	35.11748	4650	397.21	11.311
T_D10_D7	8.63909091	155	43.92874	4840	418.132	9.518
L_D10_D7	8.8797829	137	40.04427	4422	392.664	9.806
M_D10_D7	7.64256312	124	37.15919	4713	360.194	9.693
C_D11_D6	6.82373065	137	40.04427	4845.8	330.66434	8.257
L_D11_D6	6.80705632	137	40.04427	4457	303.3905	7.576
C_D11_D7	6.82720301	137	40.04427	4785.5	326.7158	8.159
L_D11_D7	6.75038995	137	40.04427	4539	306.4002	7.652
M_D11_D7	6.74399066	124	37.15919	4711	317.7094	8.550
F_D12_D6	4.60571429	115	35.11748	3500	161.2	4.590
T_D12_D6	4.97	155	43.92874	5000	248.5	5.657

---



«continuación»

---

C_D12_D6	4.60571429	137	40.04427	4962	228.5355429	5.707
L_D12_D6	4.91785417	137	40.04427	4567	224.5984	5.609
M_D12_D6	4.96036472	124	37.15919	4716	233.9308	6.295
F_D12_D7	4.43491752	115	35.11748	4486	198.9504	5.665
L_D12_D7	4.93821088	137	40.04427	3879	191.5532	4.784
M_D12_D7	4.69566265	124	37.15919	3735	175.383	4.720

---

**ANEXO 3: Análisis de Varianza, gráficas y prueba t de Diferencia Límite Significativa (DLS) para Consumo de proteína vs. Dietas**

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
dieta	12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
llama	6	1, 2, 3, 4, 5, 6

Número de observaciones leídas 109

Número de observaciones usadas 109

Análisis de Varianza ANOVA para variable Consumo de Proteína vs. Dietas

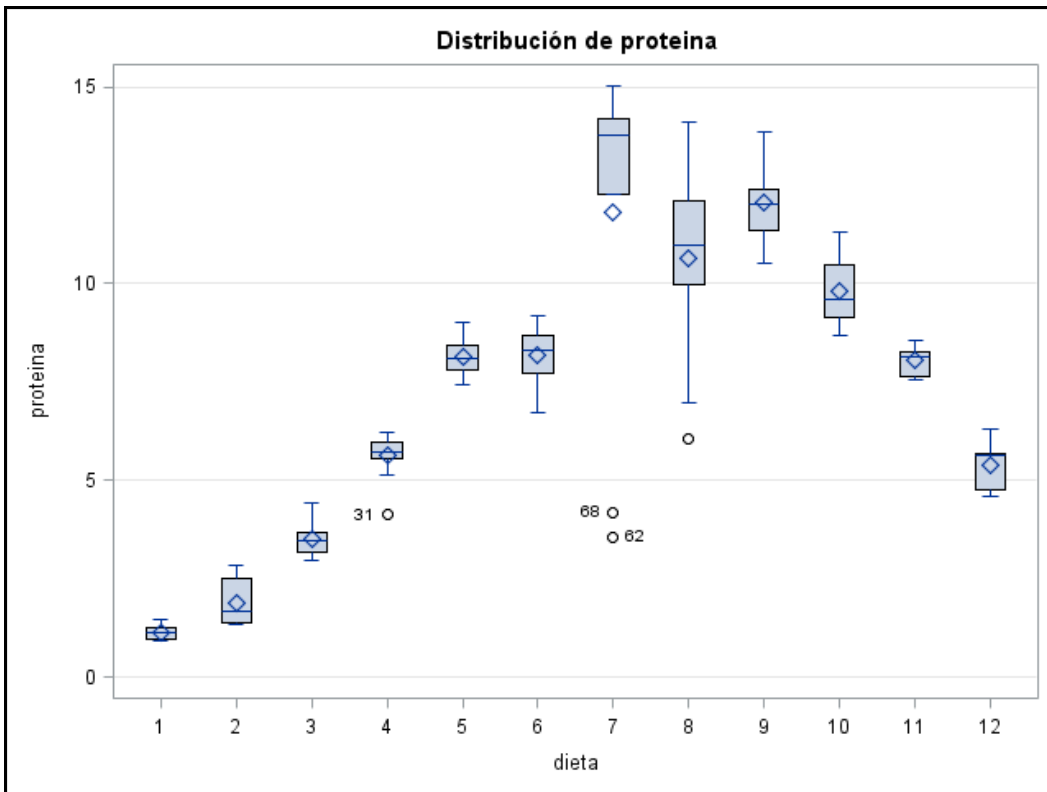
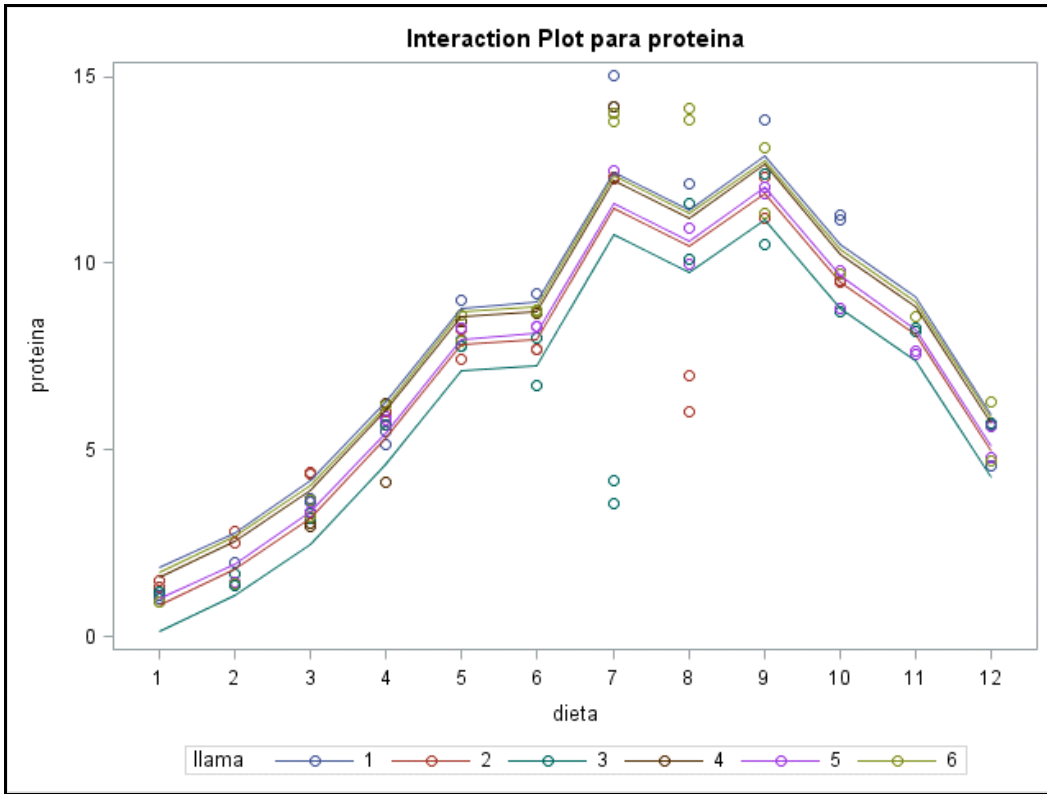
Variable dependiente: Consumo de proteína

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F – Valor	Pr > F
Modelo	16	1377.665307	86.104082	36.72	<.0001
Error	92	215.724932	2.344836		
Total corregido	108	1593.390239			

R <sup>2</sup>	Coef Var	Raíz MSE	Consumo Medio de proteína
0.864613	21.08400	1.531286	7.262785

Fuente	GL	Tipo I SS	Cuadrados Medios	F – Valor	Pr > F
dieta	11	1337.694796	121.608618	51.86	<.0001
llama	5	39.970511	7.994102	3.41	0.0072

Fuente	GL	Tipo III SS	Cuadrados Medios	F – Valor	Pr > F
dieta	11	1335.980847	121.452804	51.80	<.0001
llama	5	39.970511	7.994102	3.41	0.0072



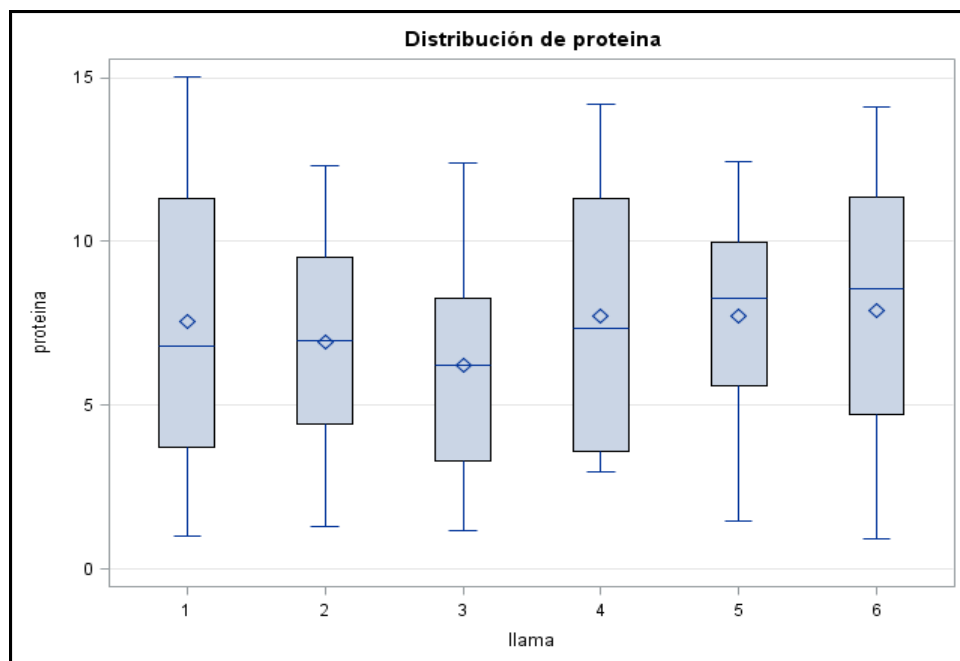
Prueba DLS para variable Consumo de Proteína vs. Dietas

Nivel de Significancia ( $\alpha$ )	0.05
Grados Libertad del Error	92
Cuadrados Medios del Error	2.344836
Valor crítico de $t$	1.98609
Diferencia menos significativa	1.4678
Media armónica de tamaño de celdas	8.585809

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

t Agrupamiento	Media	N	dieta
A	12.0602	9	9
A			
A	11.8136	11	7
A			
B	10.6342	9	8
B			
B	9.8097	8	10
C	8.2004	10	6
C			
C	8.1343	10	5
C			
C	8.0388	5	11
D	5.6409	12	4
D			
D	5.3784	8	12
E	3.5297	12	3
F	1.8895	7	2
F			
F	1.1406	8	1

**ANEXO 4: Gráficas y prueba t de Diferencia Límite Significativa (DLS) para variable Consumo de proteína vs. Llamas**



Prueba DLS para variable Consumo de proteína vs. Llamas

Nivel de Significación ( $\alpha$ )	0.05
Grados de Libertad del Error	92
Cuadrados Medios del Error	2.344836
Valor crítico de $t$	1.98609
Diferencia menos significativa	1.0736
Media armónica de tamaño de celdas	16.04794

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

t Agrupamiento	Media	N	llama
A	7.8762	21	6
A			
A	7.7116	19	5
A			
A	7.7067	8	4
A			
A	7.5575	18	1
A			
B	6.9255	21	2
B			
B	6.2091	22	3

## **ANEXO 5: Porcentaje de Proteína consumida promedio de las dietas**

<b>Dieta</b>	<b>% Proteína consumida</b>
1	4.9
2	5.9
3	9.0
4	10.6
5	13.7
6	13.2
7	17.1
8	14.3
9	12.1
10	8.3
11	6.8
12	4.8

**ANEXO 6: Porcentaje de proteína y FDN en los ingredientes utilizados en las dietas de calibración**

Ingrediente	% Proteína	%FDN
Heno de alfalfa	17.08	53.54
Panca molida de maíz	4.94	73.12
Pasto Camerún	4.16	67.28

**ANEXO 7: Indicadores de los modelos desarrollados por el programa GRAMS para la regresión PLS – 1**

Factores	PRESS	R <sup>2</sup>	SECV
1	904.2136	0.2568739	3.449282
2	765.7278	0.3873695	3.174172
3	591.5287	0.5154864	2.789852
4	477.8687	0.6084918	2.507538
5	487.1663	0.6071054	2.531814
6	457.5736	0.6285847	2.453712
7	439.5528	0.642499	2.404909
8	421.8551	0.6589772	2.355998
9	438.6472	0.6486432	2.402431
10	461.745	0.6370031	2.464872
11	470.7022	0.634082	2.488664
12	498.4127	0.6203877	2.560871
13	528.6449	0.6013581	2.637395
14	542.3323	0.5932555	2.67132
15	547.9929	0.5901693	2.685225
16	554.6652	0.5874636	2.701523
17	554.0322	0.5889794	2.699981
18	553.8989	0.5891792	2.699656
19	554.1035	0.58943	2.700155
20	551.8767	0.5907922	2.694724
21	545.8408	0.5941673	2.679947
22	543.0516	0.5958017	2.673091
23	538.8245	0.5983549	2.662667
24	534.0513	0.6008719	2.650847
25	528.6802	0.6036178	2.637483

Nota. Adaptado del programa Grams IQ

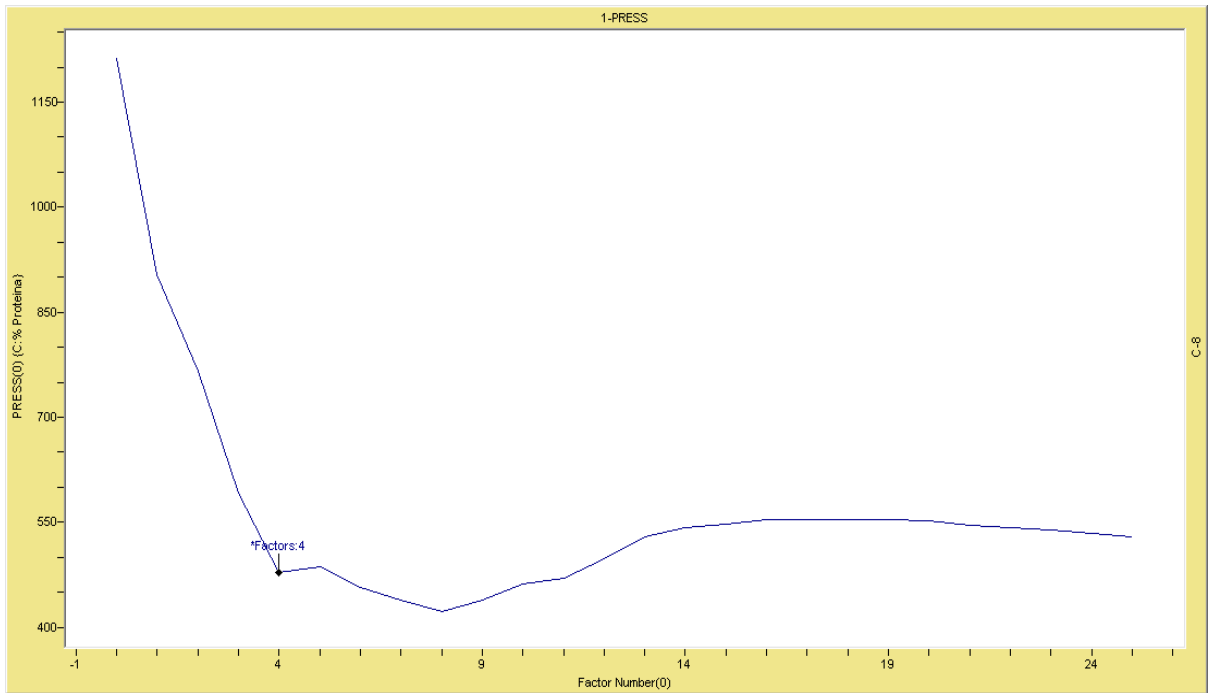


**ANEXO 8: Indicadores de los modelos desarrollados usando el programa GRAMS para la regresión PCR**

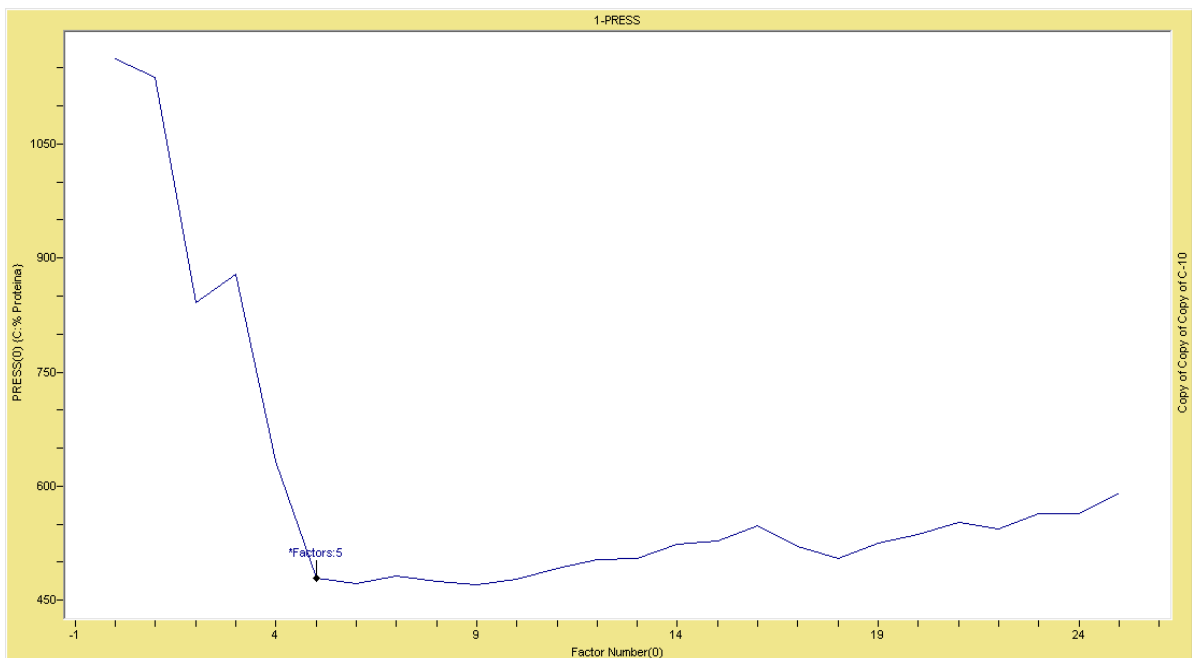
Factores	PRESS	SECV	R <sup>2</sup>
1	1137.574	3.920794	0.03325557
2	841.3098	3.371802	0.2776532
3	879.375	3.447237	0.2489285
4	632.8253	2.924328	0.4571265
5	479.3074	2.54502	0.5877677
6	472.1059	2.525829	0.5942588
7	482.1898	2.552661	0.5860914
8	474.3419	2.531803	0.5929884
9	469.7081	2.519406	0.5974243
10	476.8376	2.538454	0.5919265
11	491.1944	2.576385	0.580852
12	502.7516	2.606519	0.572118
13	504.7343	2.611654	0.5712038
14	523.8513	2.660652	0.5568711
15	527.9015	2.670918	0.5541149
16	548.1218	2.72159	0.5400231
17	520.8965	2.653138	0.5609722
18	504.2133	2.610305	0.5744874
19	525.3204	2.664381	0.5595505
20	535.7748	2.690762	0.552916
21	551.5192	2.730011	0.5424339
22	544.2802	2.712036	0.5480389
23	563.8937	2.760468	0.5338116
24	563.5038	2.759514	0.5358267
25	591.6578	2.82761	0.5193509

Nota. Adaptado del programa Grams IQ

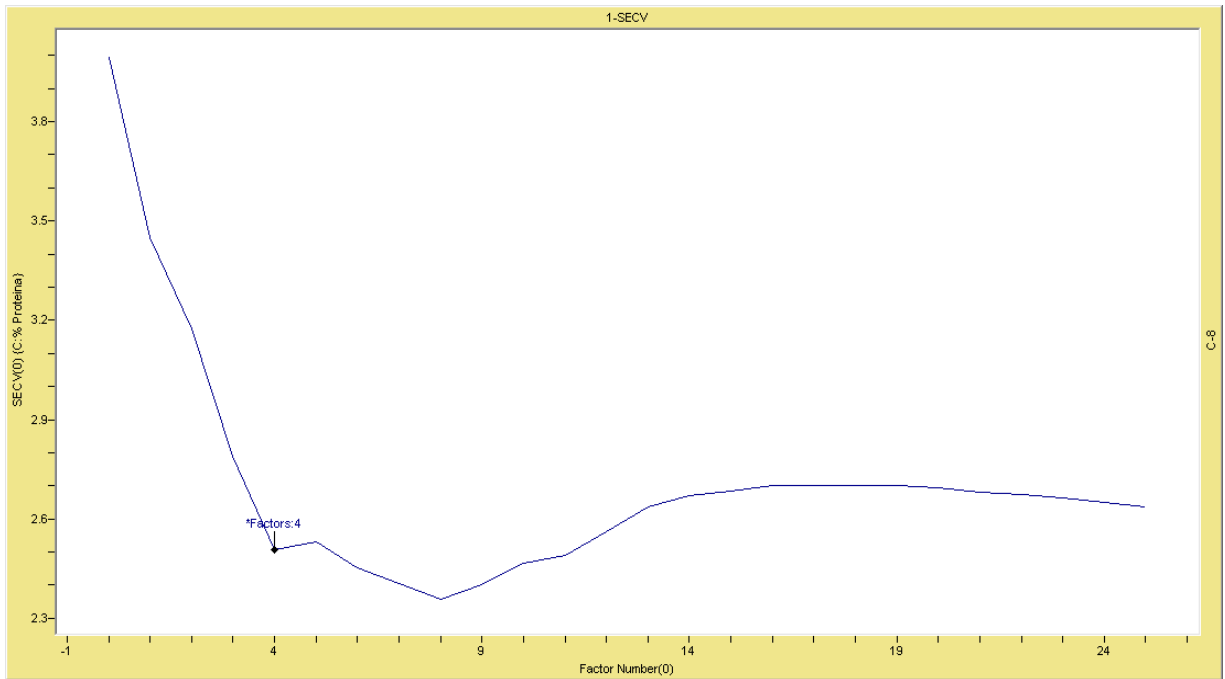
## ANEXO 9: Gráficas de PRESS y SECV de los modelos PLS – 1 y PCR



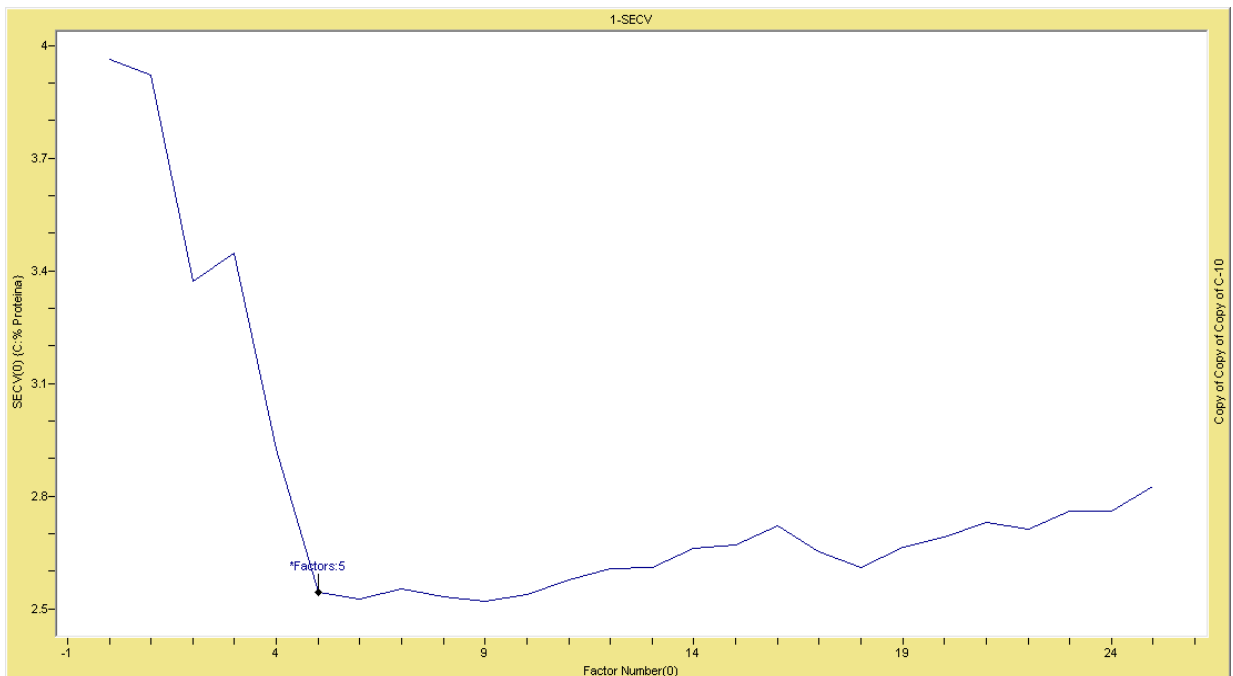
Gráfica de los valores de PRESS del modelo PLS – 1 de las ecuaciones correspondientes a cada número de factores usados. Tomado del programa Grams IQ.



Gráfica de los valores de PRESS del modelo PCR de las ecuaciones correspondientes a cada número de factores usados. Tomado del programa Grams IQ.



Gráfica de valores de SECV de las ecuaciones PLS – 1 correspondientes al número de factores usados. Tomado del programa Grams IQ.



Gráfica de valores de SECV de las ecuaciones PCR correspondientes al número de factores usados. Tomado del programa Grams IQ.

**ANEXO 10: Resultados de Validación usando el modelo PLS – 1**

% Proteína Estimada	% Proteína Laboratorio	Distancia Mahalanobis
8.0	5.1	0.5
3.5	5.1	1.0
10.2	6.1	1.0
7.8	9.7	0.9
5.2	9.7	0.8
8.7	8.1	0.4
10.4	11.3	0.7
11.8	10.8	0.5
8.9	10.9	1.2
13.6	14.1	0.7
12.4	13.3	0.3
15.0	14.2	0.6
12.2	13.5	0.7
14.9	12.5	0.6
10.2	13.0	0.5
7.9	13.3	0.5
14.4	13.1	1.0
11.4	17.1	0.6
9.6	13.6	0.7
13.1	15.0	0.5
8.9	14.4	0.6
12.3	12.0	0.7
8.2	11.9	0.8
8.9	12.4	0.4
5.8	7.6	1.0
8.9	6.8	0.8
7.6	6.7	0.8
3.2	4.9	1.5
7.5	4.7	0.7

**ANEXO 11: Resultados de Validación usando el modelo PCR**

% Proteína Estimada	% Proteína Laboratorio	Distancia Mahalanobis
7.9	5.1	0.9
8.6	5.1	0.9
6.7	6.1	0.8
8.3	9.7	0.9
5.9	9.7	1.5
7.3	8.1	0.6
11.3	11.3	0.8
7.2	10.8	0.9
7.2	10.9	0.4
10.8	14.1	0.3
15.1	13.3	0.9
14.8	14.2	0.7
13.9	13.5	0.9
10.9	12.5	0.7
8.9	13.0	0.7
11.1	13.3	0.6
13.5	13.1	1.1
11.9	17.1	0.6
11.7	13.6	0.5
15.6	15.0	0.8
11.5	14.4	0.7
13.6	12.0	0.6
10.6	11.9	0.7
9.0	12.4	0.7
12.9	7.6	0.8
8.3	6.8	1.1
8.8	6.7	0.9
8.1	4.9	1.1
5.9	4.7	1.3

**ANEXO 12: Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados parciales para un solo factor para la validación del modelo de calibración PLS – 1**

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.68161143
Coefficiente de determinación $R^2$	0.46459414
$R^2$ ajustado	0.44476429
Error típico	2.33169207
Observaciones	29

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	Suma cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor crítico de F
Regresión	1	127.378685	127.378685	23.4290333	4.6776E-05
Residuos	27	146.793273	5.4367879		
Total	28	274.171958			

**ANEXO 13: Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados parciales para un solo factor para la validación del modelo PCR**

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.67391223
Coefficiente de determinación $R^2$	0.4541577
$R^2$ ajustado	0.43394131
Error típico	2.14553486
Observaciones	29

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	Suma cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor crítico de F
Regresión	1	103.412824	103.412824	22.4648359	6.1308E-05
Residuos	27	124.289635	4.60331982		
Total	28	227.702459			