

USO DE LA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS) EN EL ANALISIS DE ALIMENTOS PARA ANIMALES

Cozzolino, D¹.

Recibido: 15/03/02 Aceptado: 18/09/02

RESUMEN

La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) es utilizada como un método rápido y exacto para evaluar la composición química de cereales y forrajes. El presente trabajo tuvo como objetivos el de evaluar el potencial del NIRS para el análisis de alimentos para animales y para identificar la presencia de harinas de origen animal en harinas de origen vegetal. 400 muestras de alimentos para animales (raciones, suplementos animales y vegetales) que comprende un amplio rango de características físicas – químicas fueron leídas en un equipo monocromador NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring, USA) en el rango de longitudes de onda de 400 a 2500 nm, en reflectancia. Los coeficientes de determinación en calibración (R^2) y el error estándar de la validación cruzada (SECV) son 0,90 (SECV: 0,82%), 0,98 (SECV: 1,3%), 0,93 (SECV: 1,4%), 0,80 (SECV: 5,3%) y 0,92 (SECV: 1,03%) para materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra ácida (FDA), fibra neutra (FDN) y cenizas en base seca. Los resultados demuestran el potencial del NIRS para el análisis de rutina de PC, ceniza y FDA. Para el segundo objetivo, buenas predicciones se lograron para la determinación de contaminación en harinas de origen vegetal con harinas de origen animal.

PALABRAS CLAVE: NIRS, contaminación, alimentos animales, calidad.

SUMMARY

USE OF NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY (NIRS) TO ANALYSE ANIMAL FEEDS

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) was used to predict both chemical composition of animal feed samples and the contamination of meals of vegetal origin with meals of animal origin. Four hundred (n: 400) animal feed samples of wide range on chemical characteristics and origin were scanned in an instrument NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring, MD, USA) over the wavelength range between 400 – 2500 nm, in reflectance mode. Calibration coefficients of determination (R^2) and standard error in cross validation (SECV) were 0.90 (SECV: 0.82%), 0.98 (SECV: 1.3%), 0.93 (SECV: 1.4%), 0.80 (SECV: 5.3%) and 0.92 (SECV: 1.03%) for dry matter (DM), crude protein (CP), acid detergent fibre (ADF), neutral detergent fibre (NDF) and ash, respectively, dry weight basis. The results showed that NIRS could be used as routine method to determine CP, ADF and ash in animal feed samples. In relation with the second objective, good predictions were obtained for determine contamination in soy bean meal with either fish meal or meat and bone meal.

KEY WORDS: NIRS, contamination, animal feeds, quality.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela. Ruta 50 – Km 11. Colonia – Uruguay.
E-mail:cozzolino@inia.org.uy.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos y productos agrícolas son nuestro más íntimo contacto con el medio ambiente. La preocupación por parte del consumidor en aspectos de sanidad, nutrición y seguridad, necesita de adecuados mecanismos de control de calidad de todos los alimentos producidos y elaborados con productos agrícolas y/o derivados del sector primario industrial. Recientes eventos en USA y Reino Unido, como por ejemplo la *Encefalopatía Espongiforme Bovina* (BSE), la infección por la bacteria *Escherichia coli* cepa 0157 y la aparición de organismos modificados genéticamente (GMO), han afectado la confianza del consumidor. La necesidad de conocer el origen y la calidad de los alimentos para uso humano y animal, es uno de los objetivos centrales en el mercadeo de productos agrícolas a nivel mundial. Los métodos cuantitativos y cualitativos tradicionales de análisis son dificultosos, demandan tiempo, mano de obra y son de un elevado costo (Murray, 1986; Osborne *et al.*, 1993; Cozzolino, 1998). Las propiedades ópticas de los alimentos y en particular la aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se emplea desde la década del 70 en la industria alimenticia, farmacéutica, petroquímica, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales (Norris *et al.*, 1976; Williams, 1987; Murray, 1986, Cozzolino *et al.*, 2000, Xiccato *et al.*, 1999). El NIRS es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante, de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración (Alomar, 1998, Givens y Deaville, 1999). En los últimos años se han desarrollado numerosas aplicaciones NIRS para evaluar la composición, el procesamiento y certificación de la calidad de alimentos tanto para la alimentación humana como para la alimentación animal (Alomar, 1998, Xiccato, *et al.*, 1999, Givens y Deaville, 1999, Deaville y Flinn, 2001). El método utiliza la región del infrarrojo cercano de longitudes de onda entre los 700 y 2500 nanómetros (nm) del espectro electromagnético (Alomar, 1998; Murray, 1996; Deaville y Flinn, 2001). Este método se basa en que, cuando la luz (energía) incide sobre una muestra, una parte de los fotones se transmite a través de la misma, siendo el resto absorbida. La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces entre Carbono e Hidrógeno (C-H), Oxígeno e Hidrógeno (O-H) y Nitrógeno e Hidrógeno (N-H); principales constituyentes de la estructura básica de las sustancias orgánicas; vibren en distintas formas (Givens y Deaville, 1999). La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el ca-

mino recorrido por la radiación (Alomar 1998; Cozzolino, 1998).

Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano sea una combinación de bandas de absorciones parciales sobrepuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro (Alomar, 1998; Deaville y Flinn, 2001). Al desarrollar una calibración NIRS, se relaciona mediante un algoritmo la información espectral (óptica) con la información de la composición físico-química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos como son la regresión múltiple, los componentes principales y los cuadrados mínimos parciales. El objetivo principal de este trabajo fue explorar el uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis cuantitativo y cualitativo de alimentos para animales. Los objetivos específicos fueron 1) desarrollar y evaluar ecuaciones de calibración NIRS para los parámetros de calidad en alimentos para animales (proteína, materia seca, ceniza, fibra ácida y neutra) y 2) evaluar el uso del NIRS para la identificación de la presencia de harinas de origen animal (harina de pescado y de carne y hueso) en harinas de origen vegetal (harina de soja).

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis cuantitativo – caracterización química

Cuatrocientas muestras de alimentos para animales constituidas por raciones (n: 150), suplementos proteicos animales (n: 60), suplementos proteicos vegetales (n: 50), suplementos energéticos (n: 40) y granos (n: 100) fueron utilizadas (Cuadro 1). Las muestras fueron molidas al ingresar al laboratorio con malla de 4 - 6 mm y posteriormente con malla de 1 mm con un molino tipo Wiley (Arthur H. Thomas, USA) y analizadas químicamente en el laboratorio de Nutrición Animal de INIA La Estanzuela (Colonia - Uruguay).

Las muestras fueron cuantificadas para materia seca (MS) (estufa a 105^o C x 16 horas), ceniza (incineración de muestra a 500^o C x 6 horas) y proteína cruda (PC) utilizando el método Kjeldhal, con sulfato de cobre y selenio como catalizadores, según procedimientos convencionales establecidos (AOAC, 1990). Fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) fueron analizadas según técnica de Goering y Van Soest (1970). Para el caso de FDN, se procedió con modificaciones con el agregado de una enzima amilolítica (alfa - amilasa) (Catálogo SIGMA N^o A

Cuadro 1. Número de muestras (N) de cada uno de los alimentos utilizados en la construcción de las calibraciones.

| Alimento | N |
|---|----|
| Maíz, grano | 25 |
| Trigo, grano | 25 |
| Cebada, grano | 25 |
| Sorgo, grano | 25 |
| Ración ganado de leche* | 80 |
| Ración ganado de carne [†] | 30 |
| Premezclas | 40 |
| Harina de soja | 6 |
| A frechillo de trigo | 20 |
| A frechillo de arroz | 20 |
| Harina de carne y hueso (40/45; 45/50) | 25 |
| Harina de pescado | 25 |
| Harina de sangre | 10 |
| Gluten meal | 26 |
| Gluten feed | 4 |
| Semitín de trigo | 10 |

* incluye distintas vacas en ordeño, lactancia temprana, etc.

[†] incluye raciones de engorde, destete, terneros.

5426) (Mertens, 1992), dado la presencia de alimentos con alto contenido de almidón. Los análisis químicos fueron expresados en base materia seca. Las muestras al ingresar al laboratorio fueron identificadas y colocadas en recipientes de plástico con tapa, para su posterior procesamiento. Los recipientes utilizados no impiden el ingreso de humedad a la muestra durante el procesamiento y posterior análisis (química, NIRS). Las muestras de raciones y suplementos fueron analizadas (secas y molidas) en el rango de longitud de onda de 400 - 2500 nm en un instrumento

monocromador NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring, MD, USA) en una cubeta circular de 50 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Los datos de reflectancia se guardaron como el logaritmo (1/R) (donde R = reflectancia) a 2 nm de intervalo (1050 datos por muestra). La luz difusa reflejada (R) por la muestra es registrada, en detectores de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada en log 1/R (donde R= reflectancia) y enviada a una computadora para su almacenamiento y procesamiento. En forma paralela a la señal digital de luz reflejada, la computadora recibe una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que cada valor de reflectancia almacenada, le corresponde una longitud de onda. El conjunto de valores de diferentes longitudes de onda para una muestra, constituye su espectro que representa la “huella dactilar” o “espectro” típico o representativo de la muestra. Se desarrollaron las ecuaciones de calibración y predicción usando el método estadístico de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1993). La expresión matemática de las ecuaciones de regresión se detalla a continuación:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \dots\dots\dots b_n x_n$$

Donde:

Y representa el parámetro químico o característica (proteína cruda, fibra ácida); b_0 es la ordenada en el origen, b_1 a b_n los coeficientes de regresión, x_1 a x_n las longitudes de onda. La validación cruzada fue utilizada para evitar el sobre ajuste de los modelos (NIRS 2, 1995) y se aplicó corrección de los espectros mediante el procedimiento de SNV (normal estándar) (Barnes *et al.*, 1989). El programa utilizado (ISI 3.01) realiza la construcción de los modelos de calibración con el 66 por ciento de las muestras, siendo el 33 por ciento restante, utilizado para validar el modelo. Este proceso se repite cuatro veces. El tratamiento matemático aplicado a los espectros fue (1,4,4); donde el primer número indica el orden de la primera derivada (uno es la primera derivada del logaritmo 1/R), el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer; el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado. Las estadísticas de la calibración calculadas incluyen el error estándar de la calibración (SEC), el coeficiente de determinación en la calibración (R^2), el error estándar de la validación cruzada (SECV) y el coeficiente de determinación en la validación cruzada (R_{val}) (Shenk y Westerhaus, 1993). Las ecuaciones de calibración fueron seleccionadas sobre la base de minimizar el error estándar de la validación cruzada (SECV) y/o el error estándar de la calibración (SEC). El programa utilizado para la colección de los espectros, manipulación de la información y construcción de las

ecuaciones es el Infracsoft International (ISI 3.01) (Shenk y Westerhaus, 1993). El error estándar de la calibración (SEC) y el de la validación cruzada (SECV) son calculados por el programa (ISI 3,01) mediante la fórmula:

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

Donde:

Quim es el valor del método de referencia; NIRS: valor de predicción NIRS; n: número de muestras en la calibración, t: número de términos del modelo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1993). SEC: error estándar de la calibración; SECV: error estándar de la calibración cruzada.

Análisis cualitativo

Muestras de harina de carne (HC) (n: 40), harina de pescado (HP) (n. 25) y harina de soja (HS) (n: 25), provenientes de establecimientos comerciales fueron utilizadas. Mezclas binarias entre harina de carne y harina de pescado; harina de carne y harina de soja y harina de pescado y harina de soja (e.g. HC + HP) respectivamente, fueron creadas artificialmente mezclando en base peso/peso 100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50% de cada harina (e.g. 10% harina de carne + 90% harina de pescado; 20% harina de carne + 80% harina de pescado). Aproximadamente 5 a 10 g de muestra fueron analizadas en un instrumento NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring, USA) en reflectancia en el rango 400 – 2500 nm visible (VIS) e infrarrojo cercano (NIR)) en una cubeta circular de 50 mm de diámetro y 2 mm de profundidad (NIRS2, 1995). La información fue procesada

y analizada usando el programa ISI 3.01 (Infracsoft International, USA). El desarrollo de las ecuaciones y tratamiento de espectros fueron similares a los utilizados en la sección de análisis cuantitativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cuantitativo

El Cuadro 2 presenta los resultados obtenidos para las calibraciones NIRS de las muestras de alimentos analizadas. De mayor a menor los coeficientes de determinación en calibración R^2 se ubican en 0,98 para PC, 0,93 para FDA, 0,92 para C, 0,90 para MS y 0,80 para FDN. Los resultados son similares con los reportados por otros autores De Boever *et al.* (1995), Aufreere *et al.* (1996), Xiccato *et al.* (1999). Si bien las ecuaciones muestran aceptables R^2 de calibración (mayor a 0,80) en todos los parámetros, las predicciones NIRS son consideradas buenas para PC, FDA y C. Las calibraciones para MS son consideradas bajas. El contenido de humedad residual de la muestra varía considerablemente con el tiempo de conservación en el laboratorio (envase utilizado), tiempo transcurrido entre el análisis y la lectura NIRS, que pueden explicar los bajos R^2 en calibración y altos SECV. Del mismo modo, el método de análisis utilizado (estufa 105°C) no es recomendado por la bibliografía internacional existente, para la determinación de humedad de la muestra, cuando se utiliza como método de referencia para la construcción de ecuaciones de calibración NIRS. La humedad de la muestra es la principal

Cuadro 2. Calibraciones NIRS para los parámetros químicos en muestras de alimentos en porcentaje materia seca.

| | n | Media | SD | R^2 | SECV | SECV/SD | T |
|-----|-----|-------|-----|-------|------|---------|----|
| MS | 385 | 89,6 | 2,1 | 0,90 | 0,82 | 0,39 | 7 |
| PC | 375 | 18,7 | 8,5 | 0,98 | 1,3 | 0,15 | 12 |
| FDA | 290 | 11,6 | 4,7 | 0,93 | 1,4 | 0,29 | 7 |
| FDN | 215 | 33,1 | 9,5 | 0,80 | 5,3 | 0,55 | 4 |
| C | 310 | 6,7 | 3,0 | 0,92 | 1,03 | 0,34 | 9 |

MS: materia seca, PC: proteína cruda, FDA, fibra detergente ácido, FDN, fibra detergente neutro, C: cenizas, SECV: error estándar en la calibración cruzada, T: Número de PLS términos usados para construir las ecuaciones de calibración, n: Número de muestras en la ecuación de calibración.

fuente de error cuando se realiza la colección de los espectros. Distintos autores comprobaron que la liofilización o titulación (método químico Karl Fischer) son mejores para ser usados como método de referencia en la determinación de humedad con la técnica NIRS (Shenk y Westerhaus, 1993; Murray 1993). El poder de predicción de NIRS decrece con el aumento de la complejidad del parámetro analizado o estructuras químicas de naturaleza no orgánica, como es el caso de la FDN y cenizas. En la región del infrarrojo es difícil determinar complejas entidades como son la FDN, ya que el método se basa en la lectura de los enlaces que se asocian con estructuras químicas o entidades arbitrarias como es la fracción fibra.

Los datos espectrales obtenidos por el NIRS representan con mayor exactitud la estructura química (enlaces C-H, H-O, C=O, H-O-H) real de la muestra, que a estructuras definidas por la química húmeda como la fracción fibra, que no corresponden a entidades moleculares definidas (Abrams *et al.*, 1987) sino a determinaciones empíricas que por tanto no permiten definir los reales grupos químicos involucrados (Barnes y Marten, 1979; Alomar, 1998). Para el caso de las cenizas, es de destacar que las sustancias inorgánicas y los minerales no poseen absorción en la región del infrarrojo. Sin embargo, los minerales y otros elementos inorgánicos pueden estar asociar a la estructura orgánica bajo la forma de óxidos, quelatos u otros complejos, que indirectamente pueden ser estimados por el NIRS. La relación entre la predicción NIRS y los datos obtenidos por química húmeda para PC y FDA se presentan en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Una forma de evaluar las ecuaciones NIRS con relación a su precisión y exactitud es a través de la relación entre el desvío estándar del aná-

lisis químico y el error estándar de la validación cruzada (SECV/SD). Si esta relación es mayor a 0,33 las ecuaciones resultan en un bajo poder de predicción (Murray, 1993). En este trabajo la relación (SECV/SD) para los parámetros analizados fue 0,15 para PC, 0,29 para FDA, 0,33 para C, 0,38 para MS y 0,55 para FDN. Se observa que PC y FDA poseen un alto poder de predicción de los valores de la química húmeda.

Análisis cualitativo

La Figura 3 presenta el promedio de los espectros de las muestras analizadas en el rango del espectro visible (VIS) e infrarrojo (NIR) para harina de soja (a); harina de carne (b) y harina de pescado (c). En la región del espectro visible no se observan absorciones para las muestras de harina de pescado y de carne. En el caso de las muestras de soja aparecen absorciones a 500 y 660 nm, que corresponden a la absorción de pigmentos vegetales como la clorofila *a* y *b* (Strayer, 1995).

Los espectros muestran prominentes absorciones a 1200 nm, 1400 nm y 1940 nm que corresponden con la absorción de grupos OH (asociado con el contenido de humedad de la muestra) (Murray, 1986; Cozzolino, 1998). La absorción en la zona de los 1730 a 1750 nm corresponde con la absorción de los enlaces CH, asociados a lípidos y ácidos grasos (Murray, 1986, Cozzolino, 1998). Absorciones entre 2100 y 2400 nm corresponden a la absorción de los enlaces CH y combinaciones (Murray, 1986). Las absorciones a longitudes de onda de 1730 a 1750 nm permiten diferenciar entre las harinas de carne y pescado, dado la diferente absorción de los ácidos grasos saturados e insaturados en la región del infrarrojo, característicos de cada harina. El Cua-

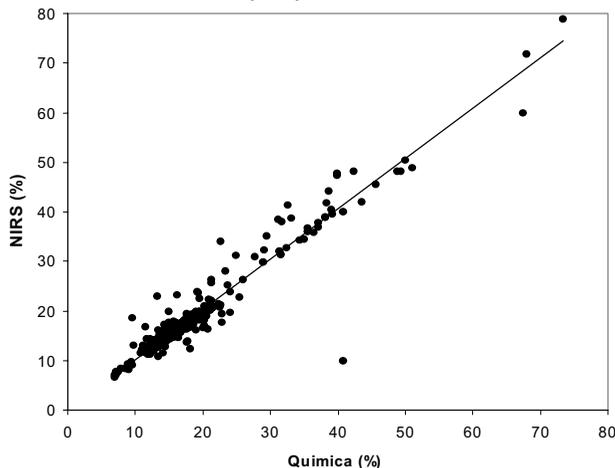


Figura 1. Relación entre la predicción NIRS y los análisis de química húmeda para proteína cruda.

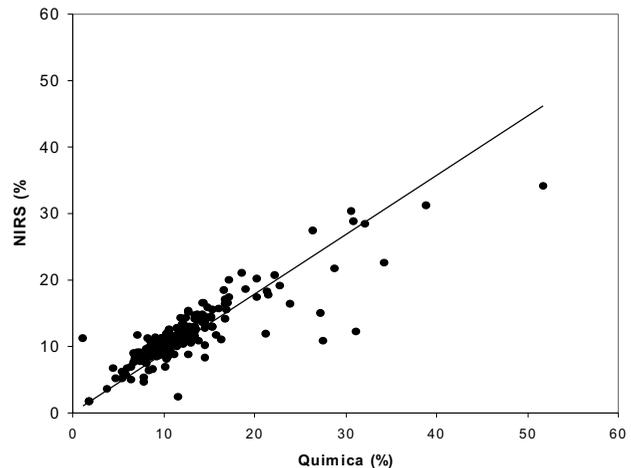


Figura 2. Relación entre la predicción NIRS y los análisis de química húmeda para fibra detergente ácido.

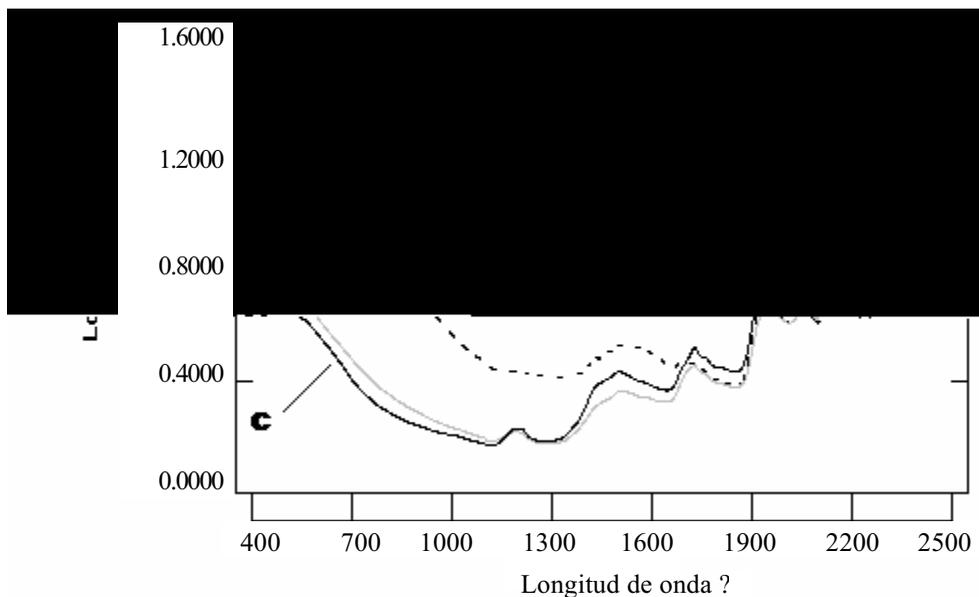


Figura 3. Espectros visible y NIRS de muestras de a) harina de soja; b) harina de carne y c) harina de pescado.

dro 3 presenta los resultados de las calibraciones NIRS para la predicción de presencia de contaminación en las distintas mezclas. Los coeficientes de determinación en calibración R^2 y los SECV son 0,99 (1,8), 0,99 (0,2) y 0,99 (2,3) para harina de carne, harina de pescado y harina de soja, respectivamente. Figuras 4 y 5 presentan la relación entre los datos de predicción NIRS y los datos reales de las mezclas. Resultados similares fueron reportados por

Murray *et al.*, (2001), donde utilizaron mezclas de harinas de pescado y harina de carne. El uso del NIRS se proyecta al análisis cualitativo, que permite diferenciar sustancias parecidas pero con diferentes grupos funcionales a través del análisis de discriminantes (Downey, 1994). Esto permite analizar rápidamente muestras por una o más caracterís-

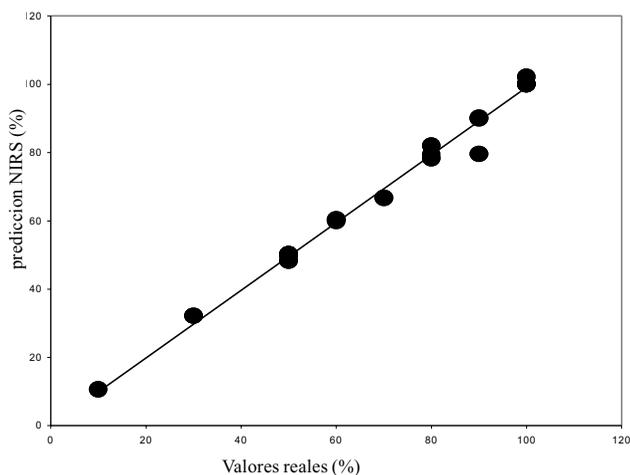


Figura 4. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para mezclas binarias de harina de carne y harina de soja.

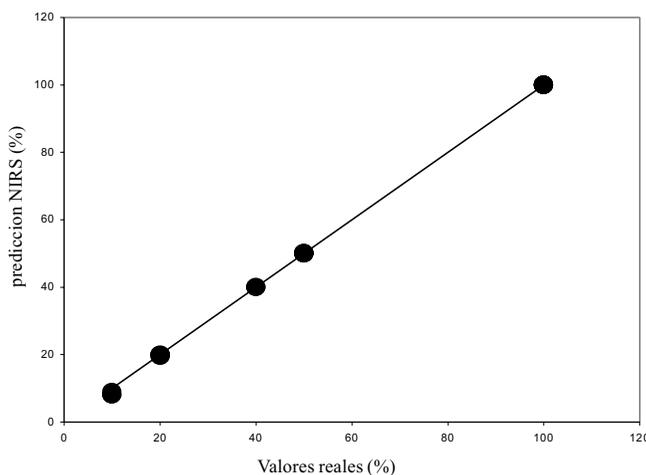


Figura 5. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para mezclas binarias de harina de pescado y harina de carne.

ticas y poder verificar los positivos o negativos mediante la utilización de métodos o técnicas específicas.

CONCLUSIONES

La aplicación del NIRS permite a la industria y a los laboratorios de evaluación de alimentos analizar en pocos segundos distintos parámetros de calidad de alimentos para animales. En el presente trabajo buenas calibraciones se obtuvieron para PC, FDA y cenizas.

Este trabajo demuestra que la fácil colección de espectros a través del NIRS permite actuar como primera línea de defensa contra contaminantes de harinas de origen animal. Con la aplicación del NIRS se pueden realizar análisis cualitativos y cuantitativos en el mismo momento sobre la muestra. Esto permitiría a la industria alimenticia y laboratorios de control de alimentos realizar análisis más caros en muestras con mayor seguridad de estar contaminadas.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la colaboración de los técnicos del laboratorio de Forrajes y Concentrados de INIA La Estanzuela. El trabajo es financiado por INIA – Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS S.M., SHENK J.S., WESTERHAUS M.O. and BARTON, F.E. II. 1987. Determination of forage quality by near infrared reflectance spectroscopy: efficacy of broad - based calibration equations. *Journal of Dairy Science*, 70: 806 – 813.
- ALOMAR, D. 1998. Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur*, 26, 88 – 104.
- AOAC 1990. Association of Official Analytical Chemist. (15th Edition).
- AUFRERE, J., GRAVIOU, D., DEMARQUILLY, C., PEREZ, J.M., and ANDRIEU J. 1996. Near infrared reflectance spectroscopy to predict energy value of compound feeds for swine and ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 62: 77 - 90.
- BARNES.R.F and MARTEN, G.C. 1979. Recent developments in predicting forage quality. *J. Anim. Sci.* 48: 1554 – 1560.
- BARNES, R.J.; DHANOA, M.S., and LISTER, S.J. 1989. Standard Normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 43: 772 - 777.
- COZZOLINO, D. 1998 Aplicación de la tecnología del NIRS para el análisis de calidad de los productos agrícolas. Serie Técnica INIA 97.
- COZZOLINO, D., FASSIO, A., and GIMÉNEZ, A. 2000. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *J. Sci. Food and Agric.* 81: 142 – 146.
- DE BOEVER, J.L., COTTYN, B.G., VANACKER, J.M, and BOUCQUE, CH.V. 1995. The use of NIRS to predict the chemical composition and the energy value of compound feeds for cattle. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 51: 243 - 253.
- DEAVILLE, E.R., and FLINN., P.C. 2000. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. In: *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition* (Eds. D.I. Givens, E. Owen; R.F.E. Axford & H.M. Omedi), pp 301 – 320. *CABI Publishing, UK.*
- DOWNEY, G. 1994. Qualitative analysis in the near infrared region. *Analyst* 119. 2367 – 2375.
- GIVENS, D.I., and DEAVILLE E.R. 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 1131 - 1145.
- GOERING, H.K., and VAN SOEST, P.J. 1970. In: *Forage fiber analysis. Agriculture Handbook N° 379. US. Dep. Agric. Washington, DC.*
- MERTENS, D.R. 1992. Standardizing alpha-amylase analysis for NDF determination. In: *Section C. National Forage Testing Association. USDA Research Centres.* 1 – 6.
- MURRAY, I. 1986. Near Infrared analysis of forages. In: *Recent Advances in Animal Nutrition. Edited by W. Haresign and D.J.A. Cole. Studies in the Agricultural and Food Sciences. Butterworths.* 141 -156.
- MURRAY, I. 1993. Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: *Chapter 14. Sward Herbage Measurement Handbook. Edited by A. Davies; Baker, R.D.; Grant, S.A. and Laidlaw, A.S. British Grassland Society.* 285 - 312.
- MURRAY, I., AUCOTT, L.S., and PIKE, I.H. 2001 Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *J. Near Infrared Spectroscopy.* 9, 297 – 311.
- NIRS 2. 1995. Routine operation and calibration software for near infrared instruments. *Perstorp Analytical, Silver Spring, MD, ISI International.* 176 pp.
- NORRIS, K.H., BARNES, R.F., MOORE, J.E., and SHENK, J.S. 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci.* 43: 889 - 897.
- OSBORNE, B.G.; FEARN, T., and HINDLE, P.H. 1993. Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis. *Second Edition. Longman Scientific and Technical.* 227pp.

SHENK, J.S., and WESTERHAUS, M.O. 1993. Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Monograph. Infracsoft International. Port Matilda, P.A. USA.*

WILLIAMS, P. 1975. Application of near infrared reflectance spectroscopy to analyse cereal grains and oilseeds. *Cereal Chem.* 52: 561 – 576.

XICCATTO, G., TROCINO, A., CARAZZOLO, A., MEURENS, M., MAERTENS, L., and CARABAÑO, R. 1999. Nutritive value and ingredient prediction of compounds feeds for rabbits by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Anim Feed Sci. Tech.* 77: 201 – 212.