

ECUACIONES NIRS DESARROLLADAS PARA LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA Y ALMIDÓN EN GRANO DE MAÍZ

NIRS EQUATIONS DEVELOPED FOR THE ESTIMATION OF CRUDE PROTEIN AND STARCH CONTENT IN MAIZE GRAIN

L. CAMPO, Y J. MORENO-GONZÁLEZ

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Instituto Galego de Calidade Alimentaria (INGACAL). Apartado 10, 15080, A Coruña, España. Tfno +34981647902, Fax +34981673656, laura.campo.ramirez@xunta.es.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) a fin de predecir el contenido de proteína bruta (PB) y de almidón (ALM) en grano de maíz. 297 muestras en forma de grano intacto (grano) y de grano molido (harina), fueron escaneadas con un espectrofotómetro de reflectancia NIRSystem 6500 en un rango de longitud de onda comprendido entre 400-2500 nm. Se seleccionaron 96 muestras para la calibración y 28 para la validación externa. La incertidumbre de las ecuaciones de predicción fue evaluada utilizando el error estándar de validación cruzada (SECV) y el de predicción (SEP), así como el índice RPD (relación entre la desviación típica de los datos de referencia y SECV o SEP). Las mejores ecuaciones de predicción se consiguieron con la harina donde los valores de SECV y RPD en la calibración fueron de 0,41% materia seca (MS) y 3,8 para PB y de 0,79%MS y 2,7 para ALM, respectivamente. El SEP y RPD en la validación externa fueron de 0,47%MS y 3,3 para PB y de 0,74%MS y 2,7 para ALM, respectivamente. En las ecuaciones de grano los valores RPD tanto en validación cruzada (2 para PB y 2,2 para ALM), como en la validación externa (1,7 para PB y 1,8 para ALM), fueron inferiores. Se concluye que la técnica NIRS puede utilizarse para estimar el contenido de PB y ALM con exactitud en harina y sólo permitiría realizar estimaciones aproximadas en grano.

Palabras claves: espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano, harina, , valor nutritivo.

SUMMARY

The aim of this work was to study the potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the content of crude protein (CP) and starch (STAR) in maize grain. Samples in the form of intact grain (Grain) and milled grain (Flour) were scanned with a reflectance spectrophotometer NIRSystem 6500. Ninety-six samples were selected for the calibration and twenty for the external validation. The uncertainty of the prediction equations was evaluated using the standard error of cross validation (SECV) and the prediction ones (SEP), and the ratio of performance to desviation (RPD). The best prediction equations were achieved with flour where the SECV and RPD values of the calibration set for maize flour were 0.41% dry matter (DM) and 3.8 for CP and 0.79%DM and 2.7 for STAR, respectively. The SEP and RPD in external validation was 0.47%DM and 3.3 for CP and 0.74%DM and 2.7 for STAR, respectively. It is possible to conclude that the NIRS technology can be used to estimate the CP and STAR content with good accuracy in maize flour.

Key words: near infrared reflectance spectroscopy, flour, nutritive value.

INTRODUCCIÓN

El maíz, tanto en forma de mazorca como de grano es utilizado como alimento por muchas especies animales de granja (Filya 2004; Jensen *et al.*, 2005), así como para consumo humano (Revilla *et al.*, 2008; Vaz Patto *et al.*, 2009).

En las Islas Canarias, el maíz se utiliza principalmente para el consumo de la mazorca en fresco en ciertos platos tradicionales y como grano para la elaboración del gofio, alimento elaborado con harina tostada y sal, alimento con un alto valor nutritivo, muy rico en minerales, sobre todo hierro, zinc y magnesio (Suárez *et al.*, 1990). En el País Vasco, la harina de maíz es utilizada para la elaboración de talo y, en Galicia y Portugal, para la elaboración de pan, empanadas y bollas (Revilla *et al.*, 2008; Vaz Patto *et al.*, 2009).

Con el fin de obtener información rápida sobre el valor nutritivo de los genotipos regenerados cada año del Banco de Germoplasma, se planteó estimar la composición química del grano de maíz. Esta información puede ser de gran utilidad para los fitomejoradores a la hora de seleccionar y mejorar las variedades locales y las líneas puras de maíz de forma eficiente y en más cortos periodos de tiempo. En este trabajo se propuso aplicar la tecnología NIRS para estimar los parámetros de valor nutritivo ya que este instrumento aporta una gran cantidad de in-

formación nutricional en poco tiempo, con bajos costes y además es una técnica reconocida internacionalmente. El objetivo final de este trabajo fue desarrollar ecuaciones de predicción NIRS a fin de estimar el contenido de proteína bruta (PB) y almidón (ALM) en el grano de maíz. Para ello se desarrollaron ecuaciones de calibración para grano intacto de maíz (Grano) y grano molido (Harina).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Entre los años 2010 y 2012 se recogieron muestras de grano de maíz procedentes de las multiplicaciones de líneas puras (71) y variedades locales (106) del Banco de Germoplasma de maíz del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). También se recopilaron las muestras de maíz procedentes de los ensayos de regeneración en múltiples ambientes en el año 2012 (120 muestras, proyecto INIA RFP2010-0004-C04). En total, se obtuvieron 297 muestras de grano de maíz.

Análisis NIRS

Las muestras de grano fueron escaneadas mediante un espectrofotómetro modelo NIRSystem 6500 (Foss NIRSystem, Suecia) por triplicado utilizando cápsulas rectangulares. Posteriormente las muestras fueron molidas mediante un molino ultracentrífugo

Retsch ZM 200 (Resch, Germany) utilizando un tamiz de 2 mm. Las muestras de harina de maíz fueron escaneadas por duplicado en el módulo spinning y con el mismo espectrofotómetro. En ambos casos se utilizó el espectro medio en las calibraciones. Se utilizó la región espectral comprendida entre 400 y 2500 nm. El programa informático utilizado para la obtención y registro de espectros, calibración, validación y análisis de los resultados fue el WinISI II, 1.5 (InfraSoft International, Port Matilda, PA16780, USA, 2000).

Análisis de referencia

Los parámetros de valor nutritivo evaluados por vía húmeda fueron la proteína bruta (PB) y el almidón (ALM). En el primer caso el método utilizado fue Kjeldahl (AOAC, 2000) y en el segundo el método polarimétrico de EWERS (FEDNA, 2000).

Análisis estadísticos

Los datos de absorbancia fueron corregidos para los efectos de dispersión de la luz mediante el tratamiento SNV (Standar normal variate) y De-trend (Barnes *et al.*, 1989). Se empleó la opción de un paso de eliminación de outliers que incorpora el programa WinISI II, 1.5. Las muestras con un $T > 2,5$ y un H (distancia de Mahalanobis) > 3 , fueron consideradas outliers. Se seleccionaron 96 muestras que constituyeron el grupo de calibración. Esta selección de muestras se realizó mediante los algoritmos CENTER y

SELECT del software WinISI II, 1.5. Otras 28 muestras fueron seleccionadas aleatoriamente y empleadas como colectivo de validación externa. Las ecuaciones de calibración se obtuvieron mediante regresión entre los datos espectrales y los resultados de los análisis de referencia, manejando dos procedimientos estadísticos PLS (mínimos cuadrados principales) y MPLS (mínimos cuadrados principales modificados). Se probaron dos tratamientos matemáticos de los espectros, la primera (1,4,4,1) y la segunda derivada (2,8,4,1) (Tabla 2).

Las mejores ecuaciones de calibración se seleccionaron atendiendo a los valores más altos de los coeficientes de determinación en la calibración (R^2) y de RPD, que es la relación entre la desviación típica de los datos de referencia de las muestras de calibración y el error estándar de validación cruzada (Williams, 2007), así como el menor error estándar de calibración (SEC). Valores de RPD por encima de 2,5 indican que las predicciones NIRS son aceptables y valores mayores de 3 que las predicciones son excelentes (Saeys *et al.*, 2005).

En la validación externa se calcularon el coeficiente de determinación (r^2) y el error estándar de predicción (SEP). La utilidad práctica de los modelos de predicción se evaluó mediante el valor SEP y el índice RPD, que es la relación entre la desviación estándar

dar del conjunto de muestras de validación y el SEP (Saeys *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Ecuaciones de predicción

En la Tabla 1 se muestra el rango de variación, la media y la desviación estándar (SD) de los parámetros PB y ALM en grano y harina de maíz tanto para el grupo de muestras de calibración como de validación externa. La variabilidad encontrada en la composición química de los parámetros de valor nutritivo analizados se encuentran dentro de los rangos observados en otros trabajos (Has *et al.*, 2009 y Pinto *et al.*, 2009) para PB y fue inferior a la reflejada por Vásquez *et al.* (2004) y Pinto *et al.* (2009) para ALM. Los rangos de variación en el conjunto de muestras de validación están dentro del rango de variación del conjunto de muestras de cali-

bración para ambos parámetros evaluados, tanto en grano como harina. El rango de variación es suficientemente amplio como para poder desarrollar ecuaciones de calibración NIRS.

En la Tabla 2 se muestran los mejores estadísticos de calibración y validación cruzada para PB y ALM, tanto en grano como en harina. Las mejores predicciones se consiguieron con el procedimiento estadístico MPLS y la primera derivada para ambos parámetros en las ecuaciones de harina y para PB en las ecuaciones de grano; y MPLS y la segunda derivada para ALM en las ecuaciones de grano.

Los coeficientes de determinación en la calibración (R^2) para muestras de harina mostraron valores satisfactorios de 0,96 para PB y 0,94 para ALM. Los SECV, 0,41%MS para PB y 0,79%MS para ALM fueron similares

Tabla 1: Datos de referencia de las muestras de grano y harina de maíz

Parámetro (%MS)	Calibración					Validación externa				
	N	Mínimo	Máximo	Media	SD	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
<i>Harina</i>										
PB	96	7,02	16,45	11,73	1,57	28	8,65	15,37	10,93	1,55
ALM	96	62,28	74,86	68,57	2,10	28	63,8	73,3	68,27	2,00
<i>Grano</i>										
PB	81	7,21	16,95	12,08	1,62	32	8,65	13,84	10,67	1,31
ALM	81	61,54	74,92	68,23	2,23	32	63,8	73	68,25	2,09

N: n° de muestras después de eliminación de outliers; SD: desviación estándar; PB: proteína bruta; ALM: almidón

Tabla 2: Estadísticos de calibración y validación cruzada obtenidos por regresión para la estimación del contenido de proteína (PB) y almidón (ALM) en grano y harina de maíz.

Parámetro	Modelo de ajuste		Calibración		Validación cruzada	
	PE	TM (a,b,c,d)	SEC	R ²	SECV	RPD
<i>Harina</i>						
PB	MPLS	1,4,4,1	0,30	0,96	0,41	3,8
ALM	MPLS	1,4,4,1	0,52	0,94	0,79	2,7
<i>Grano</i>						
PB	MPLS	1,4,4,1	0,53	0,89	0,82	2,0
ALM	MPLS	2,8,8,1	0,64	0,92	1,01	2,2

PE: procedimiento estadístico; MPLS: mínimos cuadrados principales modificados; TM: tratamiento matemático (a: derivada, b: segmento o número de puntos de longitudes de onda para calcular la derivada, c y d: tamaño de los intervalos (nm) empleados para el cálculo de la suavización de la derivada (Shenk y Westergaard, 1995b) (WinISI 1.5, 2000); SEC: error estándar de calibración; R²: coeficiente de determinación en calibración; SECV: error típico de validación cruzada; RPD: SD/SECV.

a los de calibración, con SEC de 0,3%MS para PB y 0,52%MS para ALM. Vásquez et al. (2004), encontraron menores valores de SEC para PB (0,31%MS) y mayores para ALM (3,3%MS), con valores R² similares (0,93 y 0,91 para PB y ALM, respectivamente). En las calibraciones realizadas sobre grano los valores R² fueron más bajos (0,89 en el caso de PB y 0,92 para ALM), mientras que SEC en la calibración (0,53 y 0,64%MS para PB y ALM respectivamente) y los valores SECV en la validación cruzada (0,82%MS para PB y 1,01%MS para ALM) fueron superiores a los encontrados en las ecuaciones realizadas en muestras de harina de maíz.

Los valores de RPD fueron más bajos en las estimaciones de grano que en las realizadas sobre harina: 3,8 y 2,7 para los pará-

metros de PB y ALM en harina, respectivamente, frente a 2 y 2,2 para PB y ALM en grano, respectivamente. La mayoría de los autores indican que valores RPD por encima de 2,5 son necesarios para que las predicciones NIRS puedan ser utilizadas (Saeys et al., 2005; Mouzen et al., 2005). Por lo tanto, las ecuaciones de grano sólo podrían ser utilizadas para realizar predicciones aproximadas, mientras que las ecuaciones realizadas sobre harina permitirían realizar predicciones exactas. Berardo et al. (2009) desarrollaron mejores ecuaciones NIRS a partir de muestras de 1245 variedades locales procedentes de varios países y, entre ellos, España. Estos autores realizaron las ecuaciones a partir de granos enteros y de harina de maíz y obtuvieron unos valores de RPD de 3,31 y 2,77 para PB y ALM en grano, respectivamente, y de 2,88

(PB) y 1,71(ALM) en harina de maíz. Las ecuaciones desarrolladas para ambos parámetros en harina presentaron $R^2 > 0,90$, lo cual evidencia una correlación alta y bajos errores estándar de calibración.

Validación externa

Los estadísticos de validación obtenidos en la validación externa (Tabla 3), corroboraron los resultados obtenidos en la calibración y la validación cruzada. Los estadísticos de validación no fueron aceptables para las ecuaciones de grano pero sí para las ecuaciones de predicción de harina. Los valores r^2 y SEP en las ecuaciones de grano fueron de 0,66 y 0,76%MS para el parámetro PB y de 0,67 y 1,19%MS para ALM, respectivamente, mientras que en la validación externa de las ecuaciones de harina los valores de r^2 y SEP fueron de 0,91 y 0,47%MS para PB y de 0,87 y 0,74%MS para ALM, respectivamente. La precisión de la validación externa en harina fue más exacta para el parámetro PB, ya

que, como criterio general, se puede confirmar una ecuación de calibración como buena cuando el valor SEP es menor a un tercio de la desviación estándar (SD) de los datos de referencia (Kennedy *et al*, 1996). Los valores RPD en la validación externa para harina fueron de 3,3 (PB) y 2,7 (ALM) y, por lo tanto, estos valores confirman como aceptables las predicciones de las ecuaciones de calibración para PB y ALM en harina de maíz. Los valores de RPD fueron de 1,7 y 1,8 para PB y ALM, respectivamente, en grano y, por lo tanto, las estimaciones realizadas con estas ecuaciones sólo permitirían distinguir entre valores altos y bajos.

CONCLUSIONES

Se han desarrollado ecuaciones NIRS válidas para realizar estimaciones aceptables del contenido de almidón y excelentes del contenido de proteína bruta en harina de maíz. Las ecuaciones obtenidas para predecir el contenido de proteína bruta y almidón en

Tabla 3: Estadísticos de validación externa obtenidos por regresión para la estimación del contenido de proteína bruta (PB) y almidón (ALM) en grano y harina de maíz.

Parámetro	SEP	r^2	RPD
<i>Harina</i>			
PB	0,47	0,91	3,3
ALM	0,74	0,87	2,7
<i>Grano</i>			
PB	0,76	0,66	1,7
ALM	1,19	0,67	1,8

SEP: Error estándar de predicción (%MS); r^2 : coeficiente de determinación en validación externa; RPD: SD/SEP.

grano sólo permitirían realizar estimaciones aproximadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado gracias al Plan Nacional de I+D+i INIA (proyectos RF2010-00004-C04 y RFP2011-00005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (2000) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists 17th Edition. Gaithersburg, USA.

BARNES R.J., DHANOA M.S. Y LISTER S.J. (1989) Standard Normal Variate and De-trending of near diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectroscopy*, 43, pp 772-777.

BERARDO N., MAZZINELLI G., VALOTI P., LAGANA P. Y REDAELLI R. (2009) Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. *J. Agric. Food Chem.*, 57, pp.2378-2384.

FEDNA (2000) Almidón. Método polarimétrico (EWERS). España

FILYA I. (2004) Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116, pp. 141-150.

HAS V., HAS I., PAMFIL D., COPANDEAN A. Y CAMPEAN S. (2009) Evaluation of "Turda" maize germoplasm for phe-

notypic variability in grain chemical composition. *Maydica*, 54, pp. 313-320.

JENSEN C., WEISBJERG M.R., NØRGAARD P. Y HVELPLUND T. (2005) Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118, pp. 279-294.

KENNEDY C.A., SHELFORD J.A. Y WILLIAMS P.C. (1996) Near infrared spectroscopy analysis of intact grass silage and fresh grass for dry matter, crude protein and acid detergent fiber. En: A.M.C. Davies y P. Williams (Eds), *Near Infrared Spectroscopy*, Montreal, Canada. NIR Publications, Chichester, UK, pp 524-530.

MOUAZEN A.M., SAEYS W., XING J., DE BAERDEMAEKER J., Y RAMON, H. (2005) Near infrared spectroscopy for agricultural materials: an instrument comparison. *J. Near Infrared Spectrosc.* 13, pp. 87-97.

PINTO A.T.B., PEREIRA J., ROSELENA DE OLIVEIRA T., PRESTES R.A., MATTIELO R.R. Y DEMIATE I.M. (2009) Characterization of corn landraces planted grown in the Campos Gerais Region (Paraná, Brazil) for industrial utilization. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52, pp. 17-28.

REVILLA P., LANDA A., RODRÍGUEZ V. M., ROMAY M. C., ORDÁS A. Y MALVAR R. A. (2008) Maize for bread under organic agriculture. *SJAR* 6, pp. 241-



247.

SAEYS W., MOUAZEN A. M., Y RAMON H. (2005) Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Biosystems Eng.* 91, pp. 393–402.

SENK J.S. Y WESTERHAUS M.O. (1995b) Routine operation, calibration, development and network system management manual. NIRSystems Inc., Silver Spring, M.D., USA.

SUÁREZ M.A., ÁLVAREZ R., HARDISSON A. Y SIERRA. A. (1990) Valor nutritivo del gofio. *Nutrición clínica*, 4 (10), pp. 31-44.

VÁSQUEZ D.R., ABADIA B. Y ARREAZA L.C. (2004). Aplicación de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto de guinea y del grano de maíz. *Revista Corpoica*, 5(1), pp 49-55.

VAZ PATTO M.C., ALVES M.L., ALMEIDA N.F., SANTOS C., MENDES MOREIRA P., SATOVIC Z. Y BRITES C. (2009) Is the bread making technological ability of portuguese traditional maize landraces associated with their genetic diversity?. *Maydica* 54, pp. 297-311

WILLIAMS P.C. (2007) Near-infrared technology - Getting the best out of light. Edition 5.1, PDK Projects, Inc., Nanaimo

B.C., Canada.

WinISI 1.5, (2000) ISI WINDOWS Near-Infrared Software, The Complete Software Solution for Routine Analysis, Robust Calibration and Networking, ISI (Infrasoft International), LLC, Port Matilda, PA, USA.