



Universidad Austral de Chile

Escuela de Ingeniería en Alimentos

Utilización de Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), para la predicción del contenido de almidón en 18 variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum* – *ssp. tuberosum*)

Memoria presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Alimentos

Marcos Andrés Delgado Salazar

Valdivia – Chile
2009

PROFESOR PATROCINANTE:

Prof. Fernando E. Figuerola Rivas
Ingeniero Agrónomo, M.S. Food Science
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

.....

PROFESORES INFORMANTES:

Prof. Daniel Alomar C.
Ingeniero Agrónomo Mg.Sc.
Instituto de Producción Animal
Facultad de Ciencias Agrarias

.....

Prof. Ociel Muñoz Fariña
Bioquímico, Dr. en Ciencias Químicas
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

.....

*A MIS PADRES
Y HERMANAS.*

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Almidón	3
2.2	Contenido de materia seca, almidón y azúcares en papa	4
2.2.1	Composición química del almidón de papa.	5
2.3	Importancia comercial del almidón de papa	6
2.4	Espectroscopia	7
2.4.1	Espectro electromagnético	7
2.5	Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)	7
2.5.1	Historia de la técnica NIRS	8
2.5.2	Fundamentos básicos de la técnica NIRS	9
2.5.3	Aplicaciones de la técnica NIRS en la industria	12
2.5.4	Calibraciones NIRS	13
2.5.4.1	Presentación de la muestra y colección de espectros	13
2.5.4.2	Tratamiento de los espectros	13
2.5.4.2.1	Tratamientos matemáticos	14
2.5.4.2.2	Muestras aberrantes u outliers	14
2.5.5	Criterios estadísticos para calibraciones NIRS	15
2.5.5.1	Métodos de regresión lineal	15
2.5.5.2	Criterios estadísticos de selección de ecuaciones	16
2.5.5.2.1	Validación de ecuaciones	16
2.5.5.2.2	Validación cruzada	17
2.6	Aplicaciones de la técnica NIRS para evaluar parámetros de calidad en papas	18

3	MATERIAL Y MÉTODO	20
3.1	Realización de los análisis	20
3.2	Caracterización de las muestras	20
3.2.1	Preparación de las muestras	20
3.3	Metodología de referencia	21
3.4	Modalidad de los análisis	21
3.5	Colección de los espectros	23
3.6	Métodos de referencia	23
3.6.1	Método del ácido 3-5 Dinitrosalicílico (DNS)	23
3.6.1.1	Equipamiento DNS	24
3.6.1.2	Material	24
3.6.1.3	Reactivos	24
3.6.1.4	Preparación curva estándar de glucosa	25
3.6.2	Método de materia seca en estufa al vacío.	26
3.6.3	Método de contenido de almidón en base seca	27
3.7	Análisis estadístico de los datos experimentales	27
3.8	Desarrollo de las calibraciones	27
3.8.1	Tratamientos matemáticos	27
3.8.2	Métodos de regresión	28
3.8.3	Corrección de dispersión	28
3.8.4	Muestras aberrantes u Outliers	28
3.8.5	Validación y selección de ecuaciones	28
3.9	Validación de la metodología de referencia (DNS)	29
3.9.1	Límite de detección	29
3.9.1.1	Límite de detección instrumental	29
3.9.1.2	Límite de detección de la metodología	30
3.9.2	Análisis de precisión	30
3.9.3	Análisis de exactitud	31

4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
4.1	Caracterización de las muestras	33
4.1.1	Valores obtenidos para cada parámetro a calibrar	33
4.1.2	Análisis estadísticos, mediante ANOVA (análisis de varianza) para contenido de almidón en base fresca.	35
4.2	Caracterización de los espectros recolectados mediante NIRS	39
4.3	Desarrollo de calibraciones	41
4.3.1	Contenido de almidón en base fresca	41
4.3.2	Contenido de materia seca	43
4.3.3	Contenido de almidón en base seca	45
5	CONCLUSIONES	47
6	RESUMEN-SUMMARY	49
7	BIBLIOGRAFÍA	51
	ANEXOS	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Propiedades fisicoquímicas de la amilosa y amilopectina en papa	4
2	Componentes de la materia seca del tubérculo de papa	5
3	Contenido del granulo de almidón	6
4	Bandas de absorción de enlaces químicos en la región NIRS	12
5	Análisis de referencia utilizados para calibrar	21
6	Tratamientos matemáticos usados en la calibración	28
7	Resultados de la validación del método DNS	32
8	Promedios y desviaciones estándar para cada una de las variables a considerar	34
9	Homogeneidad entre las variedades de papa en relación al contenido de almidón en base fresca.	37
10	Caracterización de las cinco mejores ecuaciones de calibración e indicadores estadísticos para contenido de materia fresca	41
11	Caracterización de las cinco mejores ecuaciones de calibración e indicadores estadísticos para contenido de materia seca	44
12	Caracterización de las cinco mejores ecuaciones de calibración e indicadores estadísticos para contenido de almidón en base seca.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Espectro electromagnético	7
2	Tipos de interacción entre la radiación y la materia	10
3	Representación esquemática de los análisis	22
4	Conversión de los azúcares reductores mediante DNS	24
5	Histograma de distribución de las muestras para almidón en base fresca	34
6	Grafica de Tukey. Diferencias significativas entre los contenidos de almidón entre las diferentes variedades	36
7	Histograma de distribución de las muestras para materia seca	38
8	Histograma de distribución de las muestras para almidón en base seca	38
9	Agrupación de espectros para las 90 muestras del set de calibración	39
10	Agrupación de espectros con una primera derivada	40
11	Agrupación de espectros con una segunda derivada	40
12	Relación entre contenido de almidón en base fresca (%) y su predicción por NIRS	43
13	Relación entre contenido de materia seca (%) y su predicción por NIRS	45
14	Relación entre contenido de almidón en base seca (%) y su predicción por NIRS	46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS		Página
1	Codificación de las 18 variedades de papa junto con la caracterización de color de estas.	56
2	Forma de presentación de la muestra fresca en el equipo.	57
3	Curva de calibración de glucosa para la interpolación de los datos para la determinación de azúcares.	58
4	Valores obtenidos para contenido de almidón en base humedad con sus cinco repeticiones, promedio y desviación estándar para cada una de las 18 variedades.	59
5	Valores obtenidos para contenido de materias seca con sus cinco repeticiones, promedio y desviación estándar para cada una de las 18 variedades.	60
6	Valores obtenidos para contenido de almidón en base seca con sus cinco repeticiones, promedio y desviación estándar para cada una de las 18 variedades.	61
7	Tratamientos matemáticos de corrección y diferenciación espectral utilizados en la determinación de ecuaciones para contenido de almidón en base fresca (%).	62
8	Tratamientos matemáticos de corrección y diferenciación espectral utilizados en la determinación de ecuaciones para contenido de materia seca (%).	63
9	Tratamientos matemáticos de corrección y diferenciación espectral utilizados en la determinación de ecuaciones para contenido de almidón en base seca (%).	64
10	Análisis de Varianza (ANOVA), mediante Test de Fisher, para el contenido de almidón en base fresca para las 18 variedades de papas.	65

1. INTRODUCCIÓN

El almidón es un hidrato de carbono complejo $(C_6H_{10}O_5)_n$, inodoro e insípido, en forma de grano o polvo. El almidón es el principal carbohidrato de reserva en la mayoría de las plantas. En las hojas el almidón se acumula en los cloroplastos, donde es un producto directo de la fotosíntesis. En los órganos de almacenamiento, se acumula en los amiloplastos, en los cuales se forma después de la translocación de sacarosa u otro carbohidrato proveniente de las hojas. Es también un componente de gran cantidad de alimentos, la fuente más importante de carbohidratos de la alimentación humana. Además, los almidones y sus derivados tienen gran significación en diferentes ramas de la industria, tales como la alimentaria, textil y papelera, siendo el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial, después de la celulosa.

Los carbohidratos son las moléculas biológicas más abundantes en la naturaleza, se encuentran en todas las formas de vida y se presentan en la forma de azúcares, almidones y fibras. Se han usado por generaciones en la industria alimentaria como espesantes, gelificantes crioprotectores, emulsificantes, humectantes, edulcorantes, estabilizantes, sustitutos de grasa en alimentos bajos en calorías, y pueden conferir sabor, textura y aroma a los alimentos haciendo que la comida sea más variada y agradable.

Es por todas estas razones la importancia de lograr determinar el contenido de almidón presente en variedades de papa para lograr establecer cual sería la mejor variedad a explotar para obtener el máximo rendimiento.

Una de las técnicas alternativas de análisis es la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), que presenta la característica de ser una técnica no destructiva, rápida, múltiple (varias determinaciones simultáneas), de gran precisión y exactitud si los procedimientos de generación de las ecuaciones de predicción son los adecuados.

Hipótesis

- Mediante ecuaciones de calibración NIRS, es posible predecir el contenido de almidón directamente a una muestra fresca de papas.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el potencial de la técnica de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como herramienta para determinar el contenido de almidón presente en una muestra fresca de papa.

Objetivos Específicos

- Desarrollar y evaluar ecuaciones de calibración para predecir el contenido de almidón.
- Estimar el efecto de diferentes tratamientos matemáticos de los datos espectrales, sobre el grado de ajuste de las ecuaciones de predicción desarrolladas, en términos de su coeficiente de determinación y error estándar para lograr establecer el método NIRS como una herramienta confiable para la determinación de almidón.
- Mediante análisis estadístico lograr establecer si existen diferencias significativas entre las 18 variedades de papa nativa en cuanto al contenido de almidón en base fresca.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Almidón

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas, y proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del almidón constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual (FENNEMA, 2000).

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina; Alrededor del 70 % del material que compone el almidón corresponde al polímero ramificado amilopectina. El 30% restante lo compone un polímero no ramificado o ligeramente ramificado, la amilosa (SMITH *et al*, 2001).

La amilosa es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos α (1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades, es decir, la amilosa es una α -D-(1,4)-glucana, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (BADUI, 1999).

Por su parte, la amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa (BADUI, 1999).

En el CUADRO 1 se muestran las propiedades fisicoquímicas que presentan estos polisacáridos:

CUADRO 1 Propiedades fisicoquímicas de la amilosa y amilopectina en papa.

Propiedad	Amilosa	Amilopectina
Estructura molecular	Lineal α (1-4)	Ramificada α (1-4), α (1-6)
Dilución en solución	Inestable	Estable
Geles	Firme e irreversible	Suave y reversible
Formación de complejos	Favorable	Desfavorable
Susceptibilidad a la retrogradación	Grande	Pequeña
Masa molecular	$1-2 \times 10^5$	$> 2 \times 10^7$
Longitud de onda de absorción máxima del complejo de yodo	644 nm	554 nm
Afinidad por el yodo	20.1 g	1.1 g
Grado de polimerización	2660	7000

FUENTE: Adaptado de WHITE 1994.

2.2 Contenido de materia seca, almidón y azúcares en papa

La materia seca de los tubérculos de papa esta formada por varias sustancias solubles e insolubles en agua. En el CUADRO 2 se muestra el contenido promedio de estos componentes básicos presentes en la materia seca del tubérculo (SCHREIBER, 1961 citado por LISINSKA y LESZCZYNSKI, 1989 citado por CACERES, 1991).

CUADRO 2 Componentes de la materia seca del tubérculo de papa.

Componente	Contenido Promedio (%)
Almidón	75,30
Azúcares	2,10
Fibra cruda	2,32
Proteína bruta	7,94
Lípidos	0,5
Cenizas	4,41

FUENTE: SCHREIBER, 1961 citado por LISINSKA y LESZCZYNSKI, 1989 citado por CACERES, 1991.

Según LISINSKA y LESZCZYNSKI (1989), el almidón es el principal componente del tubérculo de papa, alcanzando un 75% del contenido de materia seca de la papa. Durante el desarrollo del tubérculo, el almidón se acumula en las células del tubérculo formando gránulos simples y/o complejos de un tamaño de 5 a 110 μm . El gránulo de almidón contiene un 13 a 21% de agua, 0,05 a 0,08% de proteína cruda, 0,02 a 0,04% de lípidos y un 0,2 – 0,37% de ceniza.

De acuerdo a los mismos autores, el contenido de azúcares en los tubérculos de papa es altamente variable ya que depende de varios factores tales como el cultivar, madurez y estado fisiológico de las papas. En los tubérculos de papa se han encontrado en forma libre los siguientes azúcares: monosacáridos D-glucosa (0,5 – 1,5%) y D-fructosa (0,15 -1,5%), los cuales son azúcares reductores y el disacárido sacarosa el cual es un azúcar no reductor (0,4 – 6,6%).

2.2.1 Composición química del almidón de papa. El almidón es un polisacárido de reserva de las plantas, es un alfa-glucano, el cual se encuentra en forma natural como partículas insolubles, o gránulos. (GRENWOOD, 1966, citado por BARRIENTOS, 1992).

En el CUADRO 3 se indica el contenido de los gránulos de almidón.

CUADRO 3 Contenido del granulo de almidón.

Componente	Contenido (%)
Agua	10,000 – 21,000
Proteína Cruda	0,050 – 0,08
Lípidos	0,020 – 0,04
Ceniza	0,200 – 0,37
Fósforo	0,060 – 0,09
Calcio	0,058
Potasio	0,018
Sodio	0,008
Silicona	0,069

FUENTE: LISINSKA Y LESZCZINSKI, 1989.

2.3 Importancia comercial del almidón de papa. El contenido de almidón en los tubérculos de papa es uno de los parámetros de calidad y productividad más importantes en el uso de la papa como materia prima para la elaboración de múltiples productos en la industria alimentaria y para muchas aplicaciones industriales por su versatilidad, bajo costo y la facilidad con que se alteran las propiedades físico químicas, ya sea mediante modificaciones químicas, enzimáticas o tratamientos físicos (JOBILING, 2004).

En tanto que BADUI (1999), lo define como el segundo carbohidrato más importante y abundante después de la celulosa, desde el punto de vista comercial, teniendo un amplio uso en la industria alimentaria como agente gelificante, estabilizante, emulsificante, humectante, entre otros.

2.4 Espectroscopia

La palabra espectroscopia deriva de la raíz latina “*spectrum*” (apariencia, imagen) y de la raíz griega “*skopia*”. Consiste en la medición e interpretación de fenómenos de absorción selectiva de la luz que entra en la muestra o por la emisión de ciertas formas de luz, como resultado de la muestra que pierde algo de su energía interna. En términos generales, la espectroscopia involucra transferencia de energía entre la luz y la materia (MILLER, 2001).

2.4.1 Espectro electromagnético. La FIGURA 1 muestra el espectro electromagnético, donde se aprecia claramente los rangos en los cuales se subdividen los tipos de ondas.

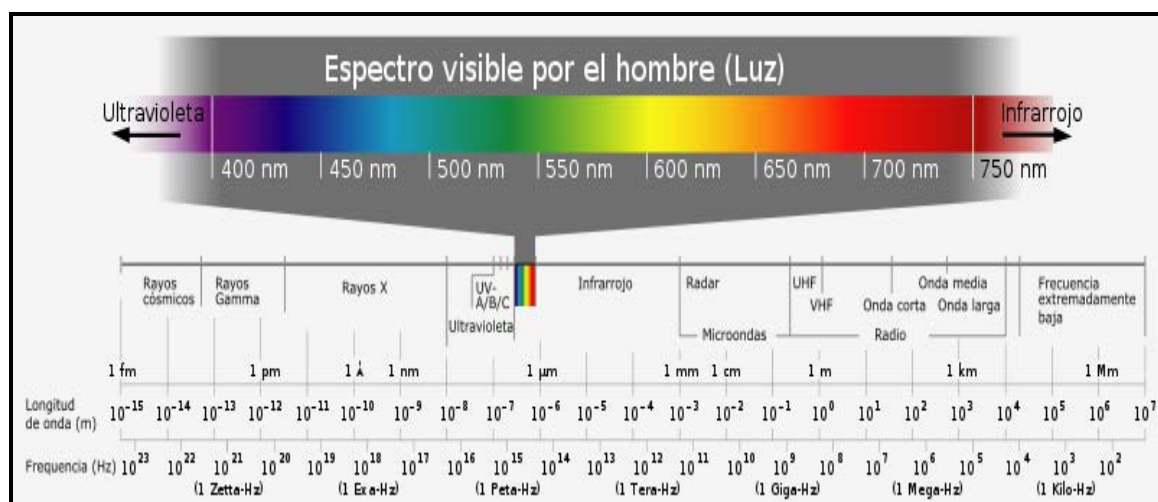


FIGURA 1: Espectro electromagnético.

Según DAVIES y GRANT (1987). La región del infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético (800-2500 nm) se encuentra entre el final de la luz visible y el inicio del infrarrojo medio.

2.5 Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

Según la definición de NORRIS (1989), la espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) es un método de análisis instrumental que permite medir rápidamente la composición química de muestras con una mínima o nula preparación. Se fundamenta principalmente en que cada uno de los constituyentes

químicos mayores como lo son las proteínas, carbohidratos estructurales y no estructurales y el agua de un alimento presentan algún tipo de absorción en el infrarrojo.

DAVIES Y GRANT (1987), señalan a la técnica NIRS como un método para analizar la calidad de alimentos intactos y productos agrícolas por la luz que ellos reflejan. Esta técnica permite predecir la composición nutricional de una muestra en base a la relación matemática, previamente establecida a través de un computador, entre las características de reflexión o transmisión de la luz infrarroja, y los parámetros que se quieren analizar.

La espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) ha tenido un gran desarrollo en los últimos 40 años, contribuyendo de gran manera a la determinación de calidad y usos potenciales de diversas fuentes alimenticias ya que es una técnica que posee múltiples ventajas por ser rápida, de alta precisión y segura. (MURRAY, 1993 y SHENK y WESTERHAUS, 1997). Las muestras en estudio requieren de muy poca o nula preparación (GIVENS *et al.*, 1997).

Contrariamente ALOMAR Y FUCHSLOCHER (1998), señalan que la principal desventaja presentada por la técnica es la de requerir de instrumentos para espectroscopia de alta precisión y valor comercial. Otra desventaja señalada por SHENK y WESTERHAUS (1997), se refiere a la relativa complejidad del proceso de calibración del instrumento, que una calibración generalmente solo es válida para el tipo de muestras utilizadas en su desarrollo, que la sensibilidad del espectro para detectar componentes menores es baja y que permanece aun como un método secundario, calibrado a partir de uno primario (análisis químicos convencionales).

Si se siguen todos los protocolos adecuados para una correcta calibración la técnica NIRS es una herramienta eficaz y de grandes beneficios (SHENK y WESTERHAUS, 1997).

2.5.1 Historia de la técnica NIRS. Según consta en los registros, la primera práctica con espectros NIRS datan del año 1800 cuando William Herschel realizó mediciones de energía solar más allá de la fracción roja del espectro visible. Debido

a estos descubrimientos Herschel recibe el reconocimiento de denominar el infrarrojo de Herschel a la zona comprendida entre los 780 y 1100 nm (OSBORNE *et al.*, 1993).

El mayor desarrollo de la técnica NIRS ha tomado lugar en los Estados Unidos donde a partir de la década de los años 50, se comenzaron a fabricar instrumentos espectrofotométricos con los cuales el departamento de agricultura (USDA), de este país comienza a estudiar materiales biológicos (HINDLE, 1999).

Durante la década de los 60 se hicieron diversos descubrimientos, tales como que entre la zona de los 800 y 2500 nm, diversos productos agrícolas exhibían bandas de absorción las cuales podían ser utilizadas con fines analíticos (MURRAY, 1993. Citado por BEYER, 1997).

2.5.2 Fundamentos básicos de la técnica NIRS. La fundamentación básica de la técnica dice relación a la interacción de la radiación electromagnética y la materia a ser analizada (REEVES, 2000). Según señalan ALOMAR Y FUCHSLOCHER (1998). el funcionamiento de la técnica busca la absorción de energía por parte de las moléculas constituyentes de la materia y su posterior reacción vibratoria, de extensión o doblamiento, de los enlaces covalentes que las conforman.

Cuando la luz incide sobre una muestra (L_i), una parte de los fotones puede transmitirse a través de la muestra (L_t) y el resto es reflejado (L_r), o absorbido (L_a) por algunos enlaces covalentes que actúan como resortes oscilantes que se acoplan con la frecuencia (cm^{-1}) o longitud de onda (nm) exacta de la radiación lumínica. Al absorber energía, los enlaces de las moléculas vibran en dos formas fundamentales: se extienden, aumentando la distancia interatómica a lo largo del eje entre dos átomos (lo que ocurre a frecuencias más altas o menor longitud de onda); o se doblan (a frecuencias más bajas o mayor longitud de onda), cambiando el ángulo de enlace entre dos átomos. Las vibraciones de extensión pueden ser simétricas o asimétricas y aquellas que producen pliegues, los pueden ocasionar dentro del plano, como movimiento de tijera y oscilaciones; o fuera de éste, en forma de coleteos y torcedoras. La vibración resultante se disipa, provocando un mero calentamiento de la muestra. La absorción es selectiva y depende de los

grupos moleculares involucrados. Así, la absorción de luz se estima por diferencia entre la luz incidente y la reflejada o transmitida. Cuando se trabaja en el modo de reflexión, se utiliza una muestra lo suficientemente opaca para que la transmisión (**Lt**) sea igual a cero (ALOMAR Y FUCHSLOCHER, 1998). En la FIGURA 2, se muestra la forma de interacción entre la radiación y la muestra.

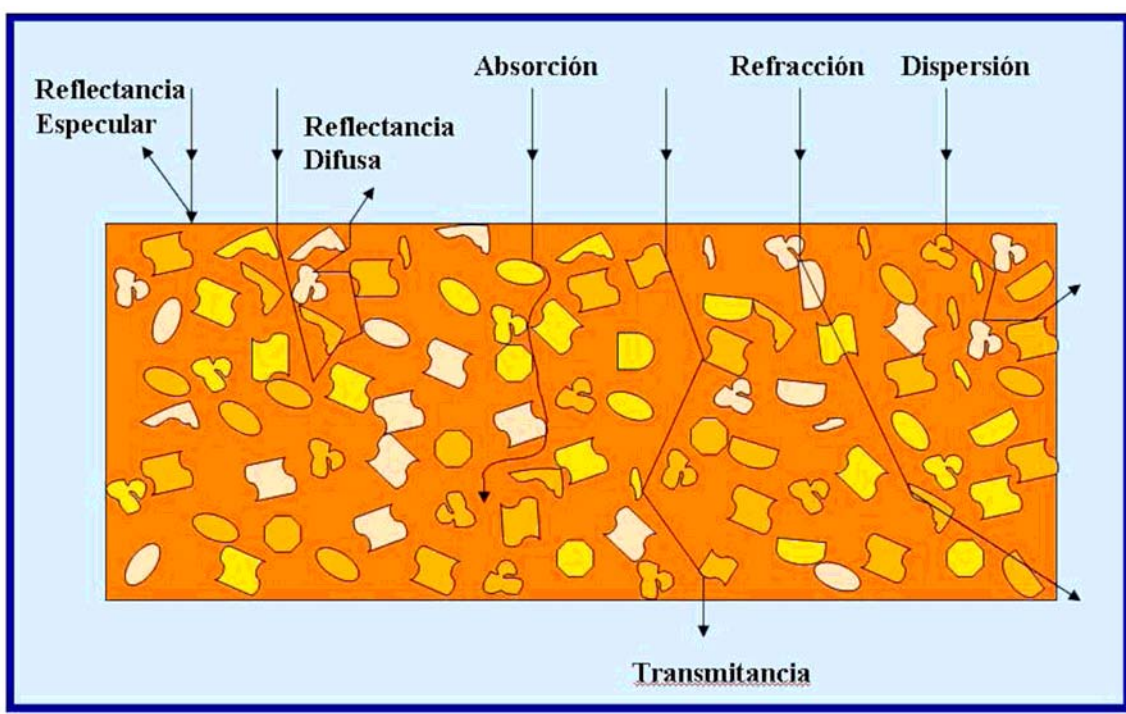


FIGURA 2: Tipos de interacción entre la radiación y la materia.

En el modo de transmisión, se define absorbancia (A), como $\log 1/T$, en tanto que en el modo de reflexión, (A) corresponde al $\log 1/R$. Se asume que ambos casos obedecen 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 camino recorrido por la radiación (MURRAY, 1993 citado por ALOMAR Y FUCHSLOCHER, 1998).

Cada molécula orgánica tiene un espectro propio y único, similar a una huella digital. El principio fundamental de esta tecnología es el uso de curvas características (espectros) de los materiales analizados, los cuales muestran picos situados en longitudes de onda correspondientes a bandas de absorción originadas a partir de

diferentes componentes orgánicos presentes en las muestras. NIRS es una técnica de reflectancia difusa, que permite determinar la composición de las muestras a través de mediciones de cambios espectrales causados por movimientos de distensión, rotación y vibratorios de los enlaces de hidrógeno presentes en los constituyentes moleculares. El espectro de una muestra obtenido con radiación infrarroja cercana es el resultado de la absorción de energía (luz) por parte de moléculas orgánicas, especialmente por las que tienen grandes cantidades de uniones del tipo C-H, N-H y O-H (REEVES, 1988; BROWN *et al.*, 1990 y APPEL, 1996, citados por DE PABLO, 2002).

Las bandas de absorción en la región infrarrojo cercano del espectro electromagnético (800-2.500 nm), están relacionadas a las de la región infrarroja (2.500-25.000 nm), donde se producen las bandas de absorción fundamentales por la vibración de los átomos en las moléculas constituyentes. Las bandas de absorción en la región del infrarrojo cercano corresponden a "ecos" o "rebotes" de esas absorciones fundamentales, consistentes en sobretonos armónicos 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 (COLEMAN y MURRAY, 1993, citados por DE PABLO, 2002).

Según señala OSBORNE *et al.*, (1993). Las uniones moleculares pueden presentar más de una banda de absorción, ya que para el enlace más importante en las moléculas orgánicas, C-H, se han reportado hasta cinco bandas de absorción para un mismo compuesto, en el CUADRO 4 se presentan algunas bandas de absorción con las respectivas longitudes de onda en las cuales se presentan.

CUADRO 4 Bandas de absorción de enlaces químicos en la región NIRS.

Longitud de onda (nm)	Constituyente	Enlace asignado
1152	CH ₃	C-H
1170	HC=CH	C-H
1200	Lípidos, CH ₂	C-H
1440	Agua, almidón, sacarosa	O-H
1730	Lípidos	C-H
1780	Lípidos, celulosa	C-H
1940	Agua	O-H
1980	Proteínas	N-H
2080	Almidón, sacarosa	O-H
2180	Proteína, CH ₂	C=O, N-H
2320	Lípidos	C-H
2350	Lípidos, celulosa	C-H

FUENTE: Adaptado de DAVIES Y GRANT, 1987.

2.5.3 Aplicaciones de la técnica NIRS en la industria. La técnica NIRS posee una muy diversa gama de aplicaciones en la industria, ALOMAR Y FUCHSLOCHER, 1998, señalan algunos usos en análisis de cerveza, leche, carnes y productos derivados, forrajes y productos de confitería. En la actualidad esta técnica se ha ido diversificando y cada vez más se van agregando productos que pueden ser analizados mediante esta técnica. Algunos de ellos son:

- Aceite de oliva, donde pueden ser analizados tanto la aceituna como el aceite, con parámetros como acidez, humedad, rendimiento graso, etc.
- Cerealista-Harinero, donde los análisis están referidos a humedad, proteínas, cenizas, etc.
- Sector verduras y hortalizas, donde principalmente pueden ser controlados parámetros principalmente referentes a los platos preparados que generan.

(<http://www.nirsoluciones.com/productos.htm>)

2.5.4 Calibraciones NIRS. Según DEAVILLE y FLINN (2000). Las calibraciones se definen como el procedimiento matemático mediante el cual se relacionan los datos ópticos del NIRS con un constituyente o propiedad física deseado de analizar en una materia definida. Como primer paso, la calibración involucra la colección de un grupo de muestras, las cuales deben representar a la población que será analizada con el instrumento, a las cuales se les debe coleccionar su espectro y analizar mediante el método de referencia (GARRIDO *et al.*, 1996). La segunda fase del procedimiento consiste en encontrar un modelo matemático óptimo que relacione la información de referencia y los datos espectrales. Luego, las ecuaciones desarrolladas deben ser validadas contra un grupo de muestras que, perteneciendo a la misma población, no formen parte del grupo usado en la calibración.

2.5.4.1 Presentación de la muestra y colección de espectros. Existen dos formas comúnmente utilizadas para coleccionar los espectros o presentar las muestras al instrumento: las celdas circulares con ventana de cuarzo, que son apropiadas para muestras secas y relativamente homogéneas; y las cubetas rectangulares de mayor superficie para muestras frescas, generalmente más fibrosas y heterogéneas. Estas celdas o cubetas se insertan en un módulo específico que va adosado al instrumento, lo que permite irradiar la muestra dentro de la celda (MURRAY, 1993).

INFRAISOFT INTERNATIONAL (1995), señala que los equipos mayormente utilizados para presentar la muestra al equipo, en reflectancia, consisten en una cubierta circular de cuarzo, diámetro de 3,5 cm, sujeta a un cilindro plástico o aluminio de un centímetro de profundidad. Estas pueden ser utilizadas en el análisis de materiales molidos o enteros. Para el caso de modelos de transmitancia existen modelos de capsulas con doble ventana de cuarzo para permitir el paso de la radiación entre ellas.

2.5.4.2 Tratamiento de los espectros. Una vez almacenados los datos espectrales de la forma Absorbancia ($\log 1/R$), se debe someter la información espectral a tratamientos matemáticos para posteriormente mediante análisis estadísticos determinar las ecuaciones más satisfactorias (ALOMAR Y FUCHSLOCHER, 1998).

2.5.4.2.1 Tratamientos matemáticos. Los tratamientos matemáticos tienen por finalidad reducir interferencias por factores como tamaño de partículas de la muestra, destacar rasgos del espectro y facilitar análisis estadísticos de regresión (ALOMAR Y FUCHSLOCHER, 1998).

MURRAY (1988), señala que el tratamiento más comúnmente utilizado es el de diferenciaciones o derivadas el cual puede ser utilizado en conjunto con otros tratamientos.

Sobre la base de tratamientos de derivadas, es posible mejorar considerablemente la resolución de las bandas de absorción mediante descomposición de la compleja combinación de picos que conforman un espectro (DAVIES Y GRANT, 1987).

INFRAISOFT INTERNATIONAL (1995); DEAVILLE y FLINN (2000), señalan que los tratamientos matemáticos más utilizados y con mejores resultados son los siguientes:

- Transformación de Fourier.
- Corrección de variación normal estándar (SNV).
- Corrección de dispersión multiplicativa (MSC).
- Detrend.

El más ampliamente recomendado sería la combinación “SNV y Detrend”, el cual corresponde a un tratamiento de corrección combinado que permite eliminar la interferencia multiplicativa o dispersión, reduciendo el efecto del tamaño de partícula mediante el ajuste cada espectro para así obtener una desviación estándar igual a 1. En base a Detrend, eliminar la tendencia lineal y cuadrática presente en el espectro de reflectancia (INFRAISOFT INTERNATIONAL, 1995).

2.5.4.2.2 Muestras aberrantes u outliers. Dentro del proceso de calibración un punto a tener en cuenta es manejar los límites para detección y eliminación de muestras aberrantes (WESTERHAUS, 1989. Citado por BEYER 1997).

Existen dos criterios para clasificar una muestra como outliers: por los valores de referencia o información proporcionada por los análisis químicos, valor denominado “T”; o aberrante de acuerdo a sus datos espectrales, denominado “H”, donde el

primero representa la relación existente entre el valor predicho y el de referencia para cada muestra y el segundo relaciona cada espectro con el resto de las muestras que forman el grupo de calibración (MURRAY 1988; INFRASOFT INTERNATIONAL, 1992. Citados por CUEVAS 2005).

2.5.5 Criterios estadísticos para calibraciones NIRS. INFRASOFT INTERNATIONAL (1995), señala que el método estadístico más utilizado para calibraciones NIRS es el análisis de regresión. Existen múltiples métodos multivariantes de calibración, todas ellas tienen igual forma la cual se presenta en la ecuación 2.1.

$$Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n \quad (2.1)$$

Donde:

Y: variable a ser medida

a: intercepto o constante de regresión de la ecuación

b1 a bn: son los coeficientes de regresión

X1 a Xn: términos de valores espectrales.

2.5.5.1 Métodos de regresión lineal. Los métodos más utilizados son los siguientes:

- Regresión múltiple.
- Regresión múltiple paso a paso.
- componentes principales (PCR).
- Cuadrados mínimos parciales (PLS).
- Cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS)

Según señalan ALOMAR Y FUCHSLOCHER (1998), el método que posee mayor estabilidad y exactitud es el MPLS.

2.5.5.2 Criterios estadísticos de selección de ecuaciones. La selección de las mejores ecuaciones de calibración está dado por la relación existente entre los coeficientes de determinación (R^2) más altos y los errores estándar de calibración (SEC) más bajos (ALOMAR Y FUCHSLOCHER, 1998. Citado por CUEVAS, 2005). Esto debe ir aparejado ya que según lo señalado por WESTERHAUS (1989), el R^2 varía inversamente con el SEC.

Según DAVIES Y GRANT (1987); WESTERHAUS (1989) y REEVES *et al.*, (1991), citados por BEYER (1997), Al momento de seleccionar una ecuación es necesario considerar ambos indicadores, R^2 y SEC como discriminadores de ecuaciones, las formulas generales se presentan a continuación, siendo la 2.2 para el primero y la 2.3 para el segundo respectivamente.

$$R^2 = 1 - \frac{SEC^2}{SD^2} \quad (2.2)$$

Donde:

SD: representa la desviación estándar de los valores de referencia.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum (y-x)^2}{(N-1c-1)}} \quad (2.3)$$

Donde:

y: valor de referencia;

x: valor predicho por NIRS

N: número de muestras en el grupo de calibración

Tc: número de términos en la ecuación de regresión.

2.5.5.2.1 Validación de ecuaciones. La validación de las ecuaciones es el paso final en la calibración de la técnica NIRS, INFRASOFT INTERNATIONAL (1995), señala que la ecuación seleccionada debe ser sometida a una validación

independiente, basada en muestras distintas a las utilizadas en la determinación de la ecuación predicha y con las cuales se deben comparar los resultados con métodos de referencia tradicionales, constituyendo así una validación externa.

Una vez realizada la validación externa se deben calcular los indicadores que permiten discriminar entre una ecuación y otra. ALOMAR y FUCHSLOCHER (1998), señalan que se calcula un R^2 (ecuación 2.2) y un error estándar de (SEP) el que se determina con las desviaciones de los valores predichos respecto de los valores de referencia. La formula del SEP se presenta en la ecuación 2.4.

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum (y - x)^2}{(n_v - 1)}} \quad (2.4)$$

Donde:

y: valor de referencia

x: valor predicho por NIRS

nv: número de muestras en el grupo de calibración.

Según lo señalado por MURRAY (1993) Y WESTERHAUS (1989), citados por BEYER, (1997), el SEP constituye un indicador seguro de la potencialidad de una ecuación, ya que contrario al SEC, que mejora (disminuye) a medida que a la ecuación se le incorporan nuevos términos, el SEP solo disminuye hasta que la ecuación comienza a ser sobreajustada. De acuerdo a esto el SEP será siempre mayor al SEC, sin embargo no debiesen existir grandes diferencias entre ellos. DAVIES Y GRANT (1987), consideran aceptable un SEP menor a un tercio de la desviación estándar de los datos de referencia.

2.5.5.2.2 Validación cruzada. Esta validación consiste en remover una o mas muestras del conjunto de calibración y usarlas como un conjunto de predicción de las muestras que quedan; posteriormente estas muestras vuelven a integrar el conjunto de calibración y otras muestras son sacadas para el conjunto de predicción, este proceso se repite hasta que la totalidad de las muestras sean parte

del conjunto de predicción (INFRASOFT INTERNATIONAL, 1992. citado por ACUÑA 2005).

SHENK Y WESTERHAUS (1994), señalan a esta validación como la más adecuada por los siguientes factores:

- Uso eficiente de las muestras, tanto para calibrar como para validar.
- Una buena estimación del error de predicción al entregar el promedio de varios grupos en lugar de uno solo.

Los resultados obtenidos de la validación cruzada son expresados como un coeficiente de determinación (1-VR) y un error estándar de validación cruzada (SECV). El SECV posee la misma forma general del SEP y corresponde al desvío de los valores predichos respecto de los valores de referencia y a medida que se le incorporan nuevos términos, va disminuyendo, pero sólo hasta que la ecuación comienza a ser sobreajustada. El SECV, además, es un excelente indicador de la exactitud de predicción, ya que el cálculo se hace en base al promedio de varios grupos, considerándose aceptable un SECV menor o igual a un tercio de la desviación estándar de los valores de referencia (SHENK y WESTERHAUS, 1993; KENNEDY *et al.*, 1995, citados por BEYER, 1997).

2.6 Aplicaciones de la técnica NIRS para evaluar parámetros de calidad en papas

En la actualidad existen algunos estudios que muestran resultados acerca de calibraciones NIRS para evaluar ciertas características en papas. Un estudio realizado por SCANLON *et al.*, (1999), establece que dos de los parámetros mas importantes utilizados para evaluar la calidad de los productos hortícolas son la materia seca (o contenido de sólidos) y el contenido de azúcares reductores.

La materia seca y el azúcar contenido en los tubérculos son muy importantes para la calidad del procesamiento industrial de papa. A mayor materia seca contenida en el tubérculo es usualmente asociada con una mejor calidad en la textura. Así como

el aumento de los rendimientos productivos (SMITH y DAVIS, 1977 citados por SCANLON *et al.*, 1999).

El contenido de azúcares reductores es otro parámetro importante, ya que a menor contenido de azúcares existe una menor reacción de estos azúcares con los compuestos aminos (MARQUEZ, 1986).

El objetivo principal seguido por SCANLON *et al.*, (1999), fue establecer si las calibraciones NIRS podrían desarrollarse para materia seca y azúcares reductores en cosechas diferentes (años) y como variaban estas características en las diferentes cosechas.

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Realización de los análisis

La colección de los espectros y calibración propiamente tal se realizó en dependencias del Instituto de Producción Animal, los Análisis Químicos correspondientes al método de referencia para la realización de la calibración se hicieron en el instituto de ciencia y Tecnología de los Alimentos, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, campus Isla Teja en la ciudad de Valdivia.

3.2 Caracterización de las muestras

Las muestras de papa correspondieron a 18 variedades de origen chilote, papa nativa (*Solanum tuberosum* - *Solanaceae*), las cuales fueron cosechadas en la temporada 2007-2008 y almacenadas en un lugar apto para su óptima conservación hasta los análisis, los cuales fueron realizados entre los meses de septiembre y diciembre del año 2008.

3.2.1 Preparación de las muestras. Las muestras fueron clasificadas y codificadas por variedad, en el ANEXO 1, se muestra la codificación de las 18 variedades. Se eligieron cinco papas por cada variedad para hacer los respectivos análisis, siendo lavadas y almacenadas para el posterior análisis, las muestras fueron cortadas con un aparato que permite obtener rodajas de 0,9 mm app. de espesor y posteriormente, con un sacabocado se obtiene una muestra circular de 35 mm de diámetro aproximadamente, esta muestra permite que encaje perfectamente en la celdilla circular (de las mismas dimensiones), con las cuales se presenta la muestra al equipo, en el ANEXO 2, se muestra la forma en que estas muestras son presentadas al equipo.

3.3 Metodología de referencia

En el CUADRO 5 se muestran los análisis de referencia junto a los parámetros que miden cada uno de ellos:

CUADRO 5 Análisis de referencia utilizados para calibrar.

Parámetro	Unidad	Método
Contenido de almidón	g/100 g (%)	DNS*
Materia seca	g/100 g (%)	Secado en estufa al vacío
Almidón en base seca	g/100 g (%)	Transformación matemática

* Método del Acido 3-5 Dinitrosalicílico.

3.4 Modalidad de los análisis

Una vez cortadas las rodajas en estado fresco (dos por cada papa) fueron insertadas en la capsula y presentada al equipo, guardándose las dos repeticiones (de cada papa) en un archivo, cada mitad de cada rodaja fue puesta en bolsa plástica adicionándosele 80 ml de agua destilada, con el objeto de evitar el pardeamiento e inmediatamente analizada por el método de referencia denominado DNS, el cual se detalla mas adelante. Las otras dos mitades de cada rodaja fueron puestas en bolsas plásticas selladas y congeladas inmediatamente para el posterior análisis de materia seca.

En la FIGURA 3 se representa esquemáticamente la modalidad de los análisis, con la totalidad de las muestras analizadas.

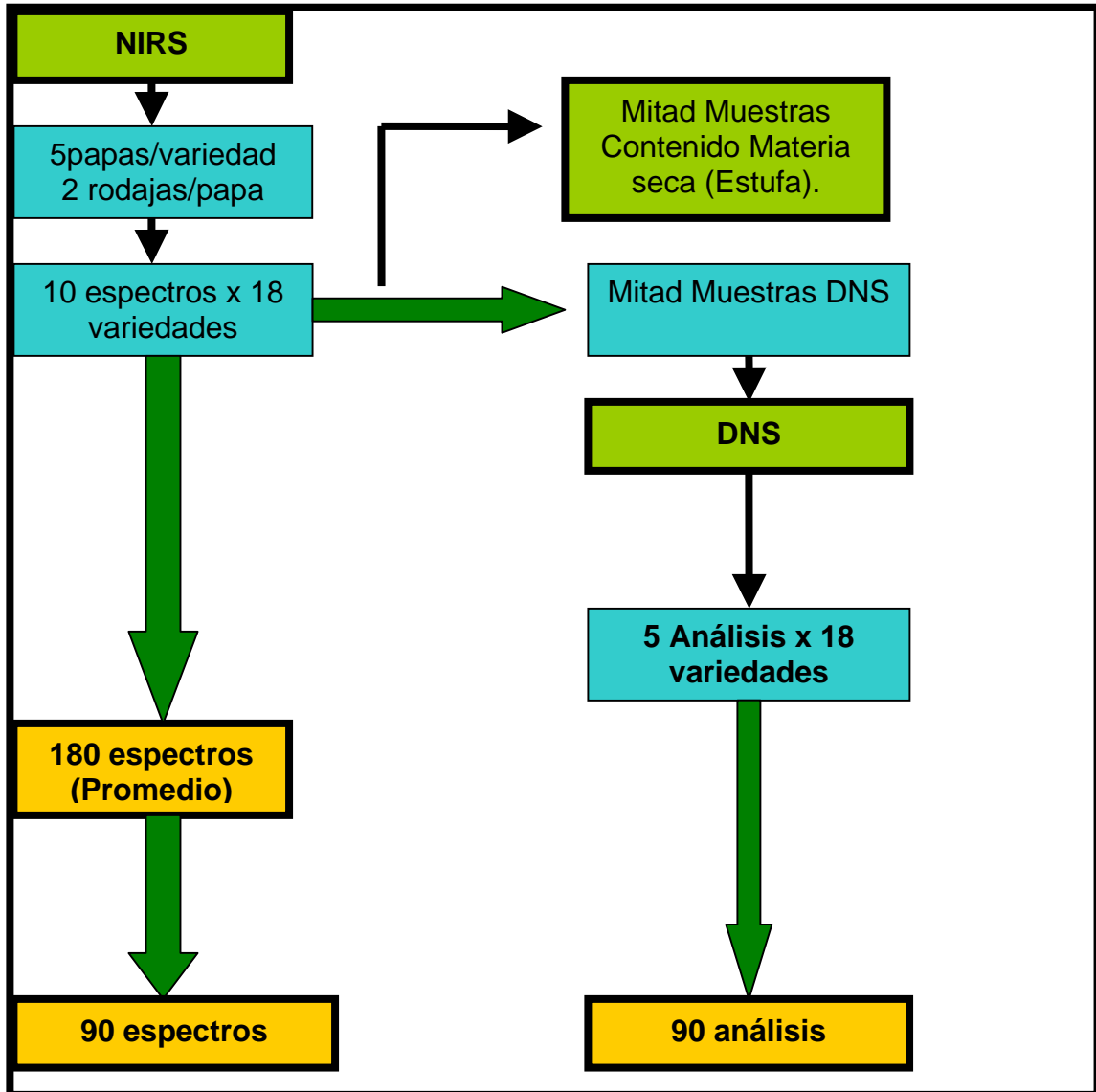


FIGURA 3: Representación esquemática de los análisis.

De la FIGURA 3 se desprende que de un total de 180 espectros estos se promedian quedando finalmente 90 para la calibración, por lo tanto, cada uno de estos espectros debe ser aparejado con su respectiva información de análisis de referencia, vale decir, a la misma muestra que se le tomó el espectro se le debe realizar el análisis de referencia, en este caso tanto DNS como materia seca.

3.5 Colección de los espectros

Los espectros fueron colectados con un equipo monocromador de barrido *NIRSystems^{MR}*, modelo 6500, manejado por un computador personal, el cual cuenta con un software de manejo de calibraciones, denominado WinISI II Project Manager V1.04. Las muestras fueron ubicadas en las capsulas de aluminio con ventana de cuarzo, e insertadas en un modulo de rotación en el equipo para la lectura.

Todos los espectros se colectaron entre los 400 y 2500 nm de longitud de onda y fueron almacenados en un archivo computacional.

Se debió poner especial cuidado en la limpieza de las celdas antes de ser utilizadas en la colección de los espectros. Partículas, impurezas o jugos en la ventana de cuarzo pueden alterar significativamente el análisis, por lo cual se utilizaron cepillos especiales y papel absorbente humedecido que permiten la limpieza sin dañar la ventana.

3.6 Métodos de referencia

Para la calibración del equipo se deben establecer métodos de referencia completamente confiables y que aseguren que los resultados obtenidos sean fidedignos y que se ajusten a la realidad, a continuación se detallan los métodos de referencia utilizados para la calibración de los diferentes parámetros requeridos.

3.6.1 Método del ácido 3-5 Dinitrosalicílico (DNS).

Para la determinación del contenido de almidón se determinara como el contenido de azúcares reductores, para lo cual a la muestra se le debe realizar una extensión de la hidrólisis enzimática de sacarosa (azúcar no reductor) en glucosa más fructosa (azúcares reductores). El método se basa principalmente en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-600 nm (MILLER, 1959). En la FIGURA 4 se muestra la reacción de oxido-reducción, antes descrita.

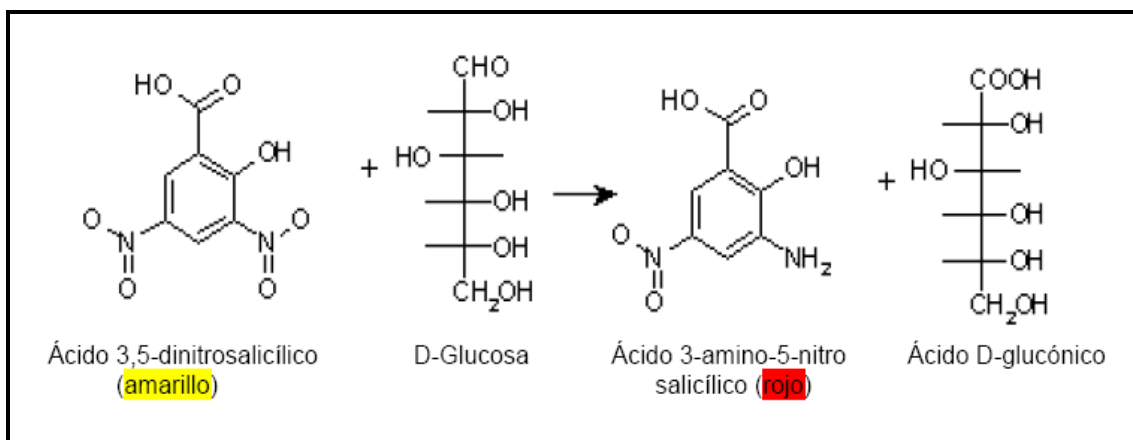


FIGURA 4: Conversión de los azúcares reductores mediante DNS.

Con el objeto de obtener una curva de calibración se debe aplicar el método DNS a una serie de soluciones patrón de glucosa, la cual, posteriormente, se utilizará directamente mediante una interpolación, para determinar los equivalentes de glucosa formados en el medio de reacción del DNS, en el ANEXO 3 se presenta la curva patrón de glucosa con la cual se realizaron los análisis y la obtención de los resultados.

3.6.1.1 Equipamiento DNS

- Espectrofotómetro marca Spectronic, modelo Genesis 5.
- Baño con agua hirviendo.
- Agitador de tubos.

3.6.1.2 Material

- Tubos de ensayo de vidrio (1,5 x 16,0 cm) y gradilla.
- Pipetas automáticas (0,1 y 1,0 ml).
- Pipetas de vidrio (10 ml).
- Propipeta.

3.6.1.3 Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico.
- Solución de hidróxido de sodio.
- Reactivo 3'-5'-dinitrosalicílico (3'-5'-DNS).

- Agua destilada.

3.6.1.4 Preparación curva estándar glucosa

La curva estándar de glucosa se preparó de acuerdo al siguiente protocolo:

- A partir de una solución estándar de glucosa 10 mM se prepararon las diluciones necesarias para obtener los siguientes puntos; 0.5 mM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM y 5mM.
- Se tomaron 2 ml de cada solución y se le agregaron 3 ml de reactivo DNS y 4 ml de agua destilada.
- Se Incuban los tubos por 10 minutos en baño de agua a 100 °C y se enfrían rápidamente en agua fría.
- Se le lee absorbancia a 600 nm en espectrofotometro Genesys 5.
- Se realiza una curva de calibración absorbancia v/s concentración de glucosa.

Las muestras provenientes de la toma de espectros en NIRS, las cuales vienen sumergidas en 80 ml de agua app fueron utilizadas de la siguiente forma:

- Se molieron junto con el agua en una licuadora en nivel 2, durante 30 segundos para permitir una completa homogeneidad de la muestra.
- Se tomó una alícuota de 2 ml de la solución en seis tubos de ensayo, tres corresponden a los análisis antes de la hidrólisis y los otros tres para realizar la hidrólisis ácida, así quedaron confeccionados los triplicados para antes y después de la hidrólisis, donde posteriormente se realizó la resta entre ellos quedando como resultado el contenido de azúcares presentes en la muestra.
- A los tres primeros tubos se agregaron 2 ml de reactivo DNS, se calentó durante 5 minutos en agua a 100 °C, se enfrió y se midió inmediatamente en espectrofotómetro a 600 nm.
- A los otros tres tubos se le efectuó una hidrólisis ácida; se agregó 1 ml de HCL, se calentó a 100 °C durante 5 minutos, se sacó del baño y se agregaron 1 ml de NaOH para neutralizar la hidrólisis y llevar la solución

a pH alcalino, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Finalmente se agregaran 2 ml de reactivo DNS y se calentó nuevamente a 100 °C durante 5 minutos, se enfrió con agua fría y se midió en espectrofotómetro a 600 nm.

3.6.2 Método de materia seca en estufa al vacío.

La eliminación del agua de una muestra requiere que la presión parcial de agua en la fase de vapor sea inferior a la que alcanza en la muestra; de ahí que sea necesario cierto movimiento del aire; en una estufa de aire se logra abriendo parcialmente la ventilación y en las estufas de vacío dando entrada a una lenta corriente de aire seco.

Los alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores deben, por ello, desecarse con precaución, de preferencia de una estufa de vacío a 70 °C.

La materia seca fue determinada mediante el método de secado en estufa al vacío a 70 °C durante 2,5 hr, el análisis se efectuó de acuerdo al siguiente protocolo:

Como se mencionó anteriormente, las muestras (para materia seca) luego de haber sido utilizadas para la toma de espectros fueron congeladas hasta su análisis.

- Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente durante una hora, se molieron con un mortero en forma manual hasta lograr que quede completamente homogéneo.
- Las capsulas previamente calentadas a 70 °C se pesaron en balanza analítica.
- Se taró la capsula, adicionándosele 2 gr. de muestra app.
- Se introdujeron las capsulas en la estufa, haciendo el vacío correspondiente, durante dos horas.
- Pasadas la dos horas se sacaron las capsulas de la estufa, fueron pesadas y puestas nuevamente en la estufa.
- Luego de media hora en la estufa, son sacadas nuevamente y pesadas, para registrar si el peso se mantiene constante.

- Se registran los datos obtenidos como humedad de la muestra.

3.6.3 Método de contenido de almidón en base seca.

Para lograr obtener los datos de contenido de almidón en base seca se tomaron los datos obtenidos para almidón en base fresca (DNS) y los datos de materia seca y mediante una fórmula matemática se obtuvieron los datos requeridos, en la ecuación 3.1 se presenta la fórmula utilizada.

$$Abs = \frac{Abf * 100}{MS} \quad (3.1)$$

Donde:

Abs: Contenido de almidón en base seca (gr/100gr).

Abf: Contenido de almidón en base fresca (DNS) (gr/100gr).

MS: Contenido de materia seca (gr/100gr).

3.7 Análisis estadístico de los datos experimentales

Con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre las 18 variedades de papa se realizó el análisis estadístico mediante el uso del programa estadístico StatGraphics 5.1, utilizando ANOVA Simple, siendo corroborada con un análisis de rango múltiple, que comprende Test de Tuckey, con un nivel de confianza de 95%.

3.8 Desarrollo de las calibraciones

Los espectros colectados fueron almacenados en archivo de la forma Log 1/R, el archivo posee la extensión*.NIR. Al ingresar los valores de referencia este archivo se transforma en *.CAL con el cual se puede realizar la calibración

3.8.1 Tratamientos matemáticos. Los tratamientos matemáticos están representados por cuatro dígitos, el primero de ellos corresponde al orden de diferenciación o sustracción, el segundo al intervalo de sustracción, el tercero al

segmento de una primera suavización y el cuarto a una segunda suavización, en el cual se recomienda usar el valor 1. Los tratamientos matemáticos utilizados para la calibración en muestras de papa fresca se describen en el CUADRO 6.

CUADRO 6 Tratamientos matemáticos usados en la calibración.

Sin derivación	1° derivada	2° derivada
0-4-4-1	1-5-5-1	2-5-5-1
0-0-5-1	1-12-12-1	2-10-20-1
0-20-20-1	1-8-8-1	2-10-10-1

3.8.2 Métodos de regresión. Para elaborar las ecuaciones se utilizó el método de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), ya que el riesgo de sobreajuste es mínimo.

3.8.3 Corrección de dispersión. Se aplicaron dos opciones de pretratamiento espectral disponibles para lograr una mejor calibración.

- *Ninguno* (“NONE”)
- *SNV* y “*Detrend*” (*SNV* y *D*)

3.8.4 Muestras aberrantes u Outliers. Para determinar las muestras aberrantes de tipo espectral (H) se definió un valor de 10, en tanto que para los aberrantes por su discrepancia entre valores predichos y de referencia (T), se definió un valor de 2,5. Además se hicieron 2 pases de eliminación de outliers, estos valores bajo la recomendación del software utilizado.

3.8.5 Validación y selección de ecuaciones. Para evaluar cada calibración se desarrollo una validación cruzada donde los criterios de discriminación de ecuaciones utilizados para cada componente en la selección de las ecuaciones generadas fueron, el coeficiente de determinación (1-VR) y el error estándar de validación cruzada (SECV). Se consideró además, como principal criterio discriminador entre ecuaciones, la relación entre el SECV y SD que aconseja que el primero no sea superior a un tercio de la desviación estándar (SD) de los valores de

referencia. Valores de la SD superiores a 3.0 veces el SECV son indicativos de ecuaciones con un alto valor predictivo.

3.9 Validación de la metodología de referencia (DNS)

Con el objeto de determinar si los datos obtenidos mediante el método de referencia DNS son de una confiabilidad aceptable se determinó el *límite* en el cual el equipo podría leer la cantidad mínima (límite de detección), determinar la exactitud mediante el *porcentaje de recuperación* que tiene la técnica, (se espera que se recupere sobre un 90%), y por último se determina la precisión por medio del *coeficiente de variación*, que representa el grado de concordancia entre las lecturas que realiza el equipo en las distintas muestras. En el CUADRO 7 se muestran los parámetros analíticos obtenidos para esta técnica.

3.9.1 Límite de detección. El límite de detección se determinó midiendo seis blancos, los cuales se prepararon siguiendo la misma metodología antes descrita (DNS) pero reemplazando la muestra por agua destilada, luego de preparar los blancos inmediatamente se realiza la lectura en el espectrofotómetro. Una vez que el equipo entregó los datos se procedió a obtener las medidas de las concentraciones, posteriormente se determinó la desviación estándar de los contenidos de los blancos.

3.9.1.1 Límite de detección instrumental

$$LOD_{Instrumental} = DesvSt * 3 \quad (3.2)$$

Donde:

- $LOD_{instrumental}$: Límite de detección instrumental.
- $DesvS_t$: Desviación estándar del límite de detección del equipo.

- 3: Factor que permite asegurar el 95% de confianza, que la señal es significativamente diferente a la línea base de la señal del equipo.

3.9.1.2 Límite de detección de la metodología

$$LOD_{Metodología} = \frac{LOD_{Instrumental} * VF}{PM} \quad (3.3)$$

Donde:

- $LOD_{metodología}$: Límite de detección de la metodología.
- $LOD_{instrumental}$: Límite de detección instrumental.
- VF: Volumen final de dilución.
- PM: Peso de la muestra

La precisión y exactitud se determinaron por medio de adición de estándar de glucosa. Esto consistió en seleccionar seis réplicas, a tres de ellas se les adicionó una cantidad determinada de estándar de glucosa que se quiere cuantificar, sobre los gramos de muestra utilizados. Luego se realizó todo el procedimiento analítico correspondiente y se cuantificaron las concentraciones de glucosa, comparándose finalmente los resultados obtenidos entre las réplicas con y sin adición de estándar, calculándose así el porcentaje de recuperación (exactitud). Las ecuaciones para estos cálculos se detallan en los siguientes puntos a continuación:

3.9.2 Análisis de precisión. La precisión indica la reproducibilidad de las mediciones, es decir, que tan cercanos están los resultados que se han obtenido exactamente de la misma manera. En este caso se utilizó el método de coeficiente de variación el cual es una estimación en porcentaje de la variación de los resultados y se expresa de la siguiente manera (formula 3.4):

$$\% CV = \frac{DesvSt}{X} * 100 \quad (3.4)$$

Donde:

- %CV: Coeficiente de variación.
- DesvSt: Desviación estándar de las muestras con adición.
- X: Media de las muestras con adición.

3.9.3 Análisis de exactitud. La exactitud indica que tan cercana está una medición de su valor verdadero. Para ello la exactitud se estableció mediante la determinación del porcentaje de recuperación, es decir cuánto de una cantidad conocida del analito se puede recuperar después de realizar todo el procedimiento analítico. Los resultados se obtienen de la siguiente manera.

$$\% R = \left[\frac{Ma - Ms}{a} \right] * 100 \quad (3.5)$$

Donde:

- %R: Porcentaje de recuperación.
- Ma: Media de la muestra con adición.
- Ms: Media de la muestra sin adición.
- a: Cantidad de la muestra adicionada.

CUADRO 7 Resultados de la validación del método DNS.

LOD_{Instrumental}	LOD_{Metodología}	Precisión	Exactitud
0,0955mg/ml	0,2867mg/ml	8,7 %	93,8 %

El límite instrumental, “LOD_{Instrumental}”, equivale al límite de detección del equipo utilizado (espectrofotómetro), que corresponde a 0,0955 mg/ml. Por otra parte el “LOD_{Metodología}” representa el contenido mínimo del analito en la muestra que se puede cuantificar por el método, que corresponde a 0,2867 mg/ml.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos tanto para las caracterizaciones químicas espectrales como para las calibraciones desarrolladas para los parámetros que se determinaron. Además se analiza si existen diferencias significativas de contenido de almidón (en base fresca) entre las 18 variedades de papa nativa.

4.1 Caracterización de las muestras

A continuación se presenta el resumen de los resultados obtenidos mediante los análisis químico de referencia para la calibración considerando el rango, promedio y desviación estándar entre ellas.

4.1.1 Valores obtenidos para cada parámetro a calibrar. En el CUADRO 8 se presentan los resultados obtenidos para contenido de almidón en base fresca, materia seca y contenido de almidón en base seca junto con el promedio y desviación estándar de las cinco repeticiones para cada variedad, los resultados están expresados en (g de almidón por 100 g de muestra) o porcentaje (%), en los ANEXOS 4, 5 y 6 se presentan los resultados obtenidos para cada variable con sus cinco repeticiones respectivas para cada variedad.

CUADRO 8 Promedios y desviaciones estándar para cada una de las variables a considerar.

VARIEDADES	Almidón en base fresca (%)		Materia seca (%)		Almidón en base seca (%)	
	PROMEDIO	SD	PROMEDIO	SD	PROMEDIO	SD
1	19,54	1,08	24,97	2,81	73,94	2,70
2	19,57	0,69	25,73	1,27	75,44	0,78
3	20,88	0,45	27,93	1,17	72,57	1,29
4	20,97	1,37	27,73	0,99	74,41	3,50
5	18,81	2,15	26,84	1,20	73,32	0,64
6	20,60	0,88	27,42	0,95	76,38	4,46
7	19,41	0,72	26,74	1,10	74,07	1,39
8	19,99	1,54	26,22	3,04	76,70	5,96
9	21,15	1,60	28,16	1,64	72,10	0,62
10	20,44	0,19	27,47	0,36	73,32	1,11
11	18,88	1,30	25,61	2,10	73,97	3,33
12	19,52	1,89	27,54	2,76	70,19	6,40
13	20,87	0,87	28,72	1,26	69,90	3,93
14	21,51	0,54	29,58	1,09	69,99	1,91
15	19,52	0,54	26,62	1,55	73,50	2,26
16	21,00	2,49	28,73	1,75	70,70	2,22
17	20,15	0,92	27,33	1,26	72,69	2,85
18	20,56	1,64	28,87	1,45	70,47	3,57

En la FIGURA 5 se presentan los resultados de variabilidad composicional obtenidos para el parámetro contenido de almidón en base fresca.

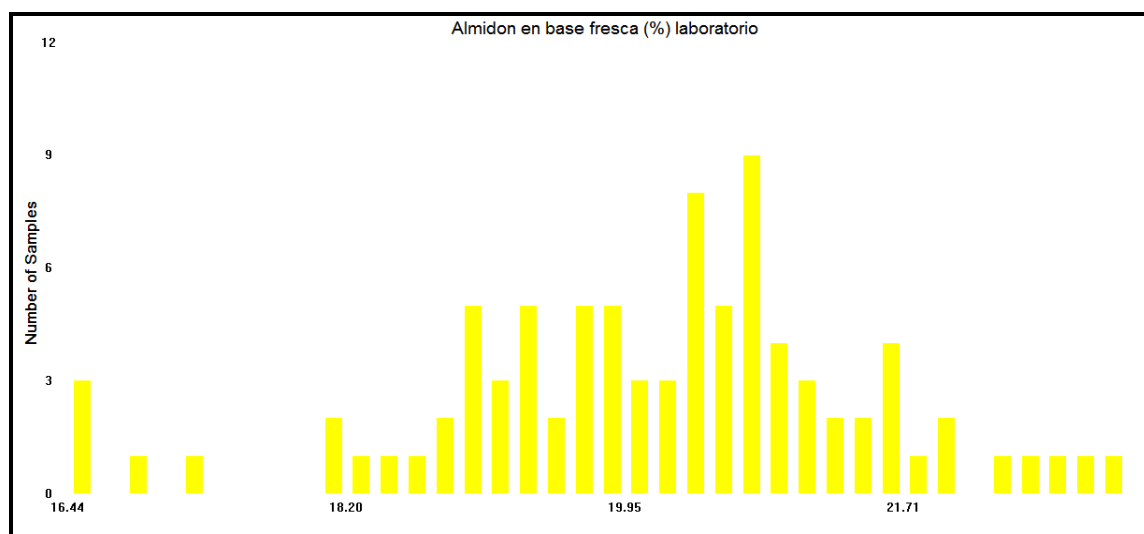


FIGURA 5 Histograma de distribución de las muestras para almidón en base Fresca.

En la FIGURA 5 se aprecia claramente uniformidad entre los valores obtenidos destacándose que la mayor parte de las muestras poseen valores entre los 19 y 21 % de contenido de almidón en base fresca.

4.1.2 Análisis estadísticos, mediante ANDEVA (análisis de varianza) para contenido de almidón en base fresca.

Un análisis de varianza permite comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjunto de datos. Típicamente, se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

Con el objeto de determinar si existen diferencias entre las 18 variedades de papas, se utilizó el test de Fisher de Andeva, el cual detecta cualquier diferencia significativa entre las medias de cada grupo o en este caso variedad. Por lo tanto, si el valor de p es menor a 0,05 este indica con un nivel de confianza del 95% que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable analizada. En caso contrario con un valor de p mayor a 0,05 indica que no existe diferencia significativa entre las medias de la variable analizada.

Para realizar los análisis estadísticos, es necesario que los datos a analizar estén dentro de una distribución normal, como ocurre en este caso en donde los datos se encuentran bajo una distribución normal ya que al realizar un análisis de Kurtosis y Skewness, cuyo rango está comprendido entre 2 y -2 lo que indica que se trata de una distribución normal.

De acuerdo al análisis estadístico de ANDEVA para la variante contenido de almidón en base fresca, se obtuvo un valor de p menor a 0,05, pudiendo asegurarse con un nivel de confianza del 95%, que la variable, proveniente de los diversos grupos presentan diferencias significativas, en la figura 6 se aprecia claramente esta situación, demostrándose las variedades que poseen diferencias significativas con respecto a las otras. En el ANEXO 10 se aprecia el análisis de varianza correspondiente.

En la FIGURA 6 se presenta la grafica en la cual se aprecia claramente que existen algunas variedades que no presentan solapamiento con respecto a las otras, es el caso de las variedades 5 y 11 con respecto a la 14.

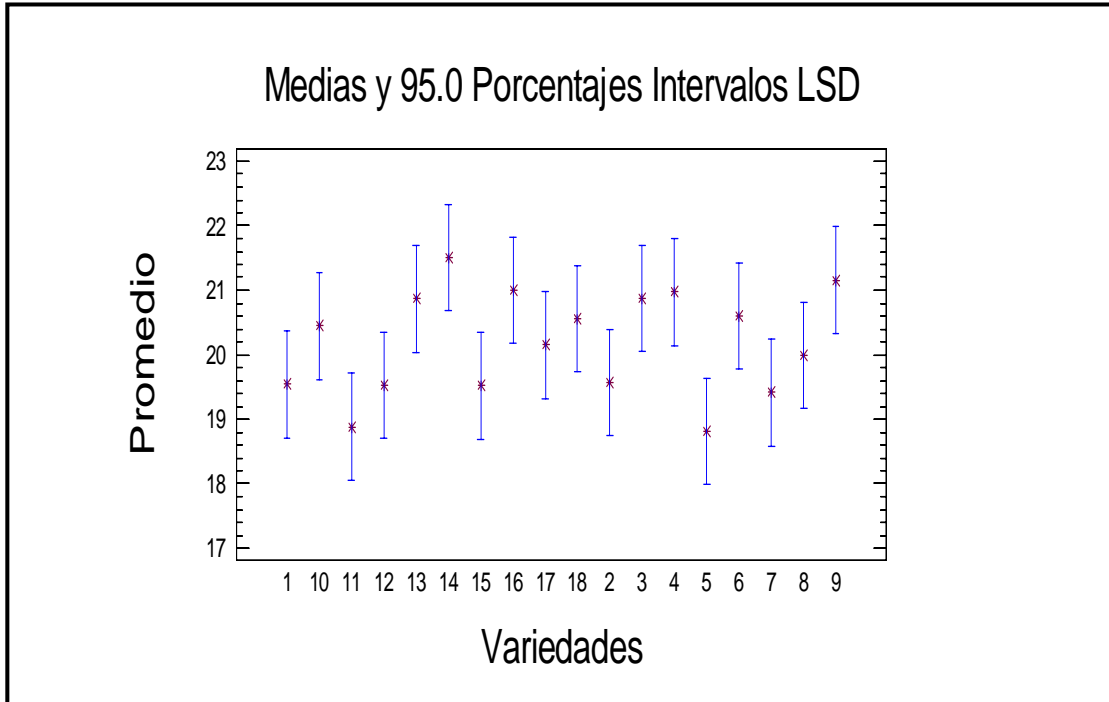


FIGURA 6 Grafica de Tukey. Diferencias significativas entre los contenidos de almidón entre las diferentes variedades.

Con el objeto de hacer mucho más claras estas diferencias en lo que respecta a los contenidos de almidón, se realizó un test de rangos múltiples, en el que se puede observar que las diferencias significativas encontradas entre las variedades. En el CUADRO 9 se presentan los resultados de este test.

**CUADRO 9 Homogeneidad entre las variedades de papa en relación al
Contenido de almidón en base fresca.**

Contraste Múltiple de Rango para promedio según variedades

Método: 95.0 porcentaje HSD de Tukey			
Variedades	Frec.	Media	Grupos homogéneos

VARIEDAD 5	5	18.81	X
VARIEDAD 11	5	18.884	X
VARIEDAD 7	5	19.414	XX
VARIEDAD 15	5	19.516	XXX
VARIEDAD 12	5	19.524	XXX
VARIEDAD 1	5	19.538	XXX
VARIEDAD 2	5	19.566	XXX
VARIEDAD 8	5	19.994	XXXX
VARIEDAD 17	5	20.15	XXXX
VARIEDAD 10	5	20.444	XXXX
VARIEDAD 18	5	20.558	XXX
VARIEDAD 6	5	20.596	XXX
VARIEDAD 13	5	20.866	XXX
VARIEDAD 3	5	20.878	XXX
VARIEDAD 4	5	20.97	XXX
VARIEDAD 16	5	21.002	XXX
VARIEDAD 9	5	21.154	XX
VARIEDAD 14	5	21.51	X

En el CUADRO 9, se puede apreciar que las variedades 5y 11 tienen diferencias significativas con respecto a la 14, también se aprecia claramente la homogeneidad existente entre las variedades de papa, donde se identifican cuatro grupos homogéneos según la alineación del signo X en las columnas. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5.0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

En las FIGURAS 7 y 8 se presentan los resultados de variabilidad composicional obtenidos para los parámetros materia seca y contenido de almidón en base seca respectivamente.

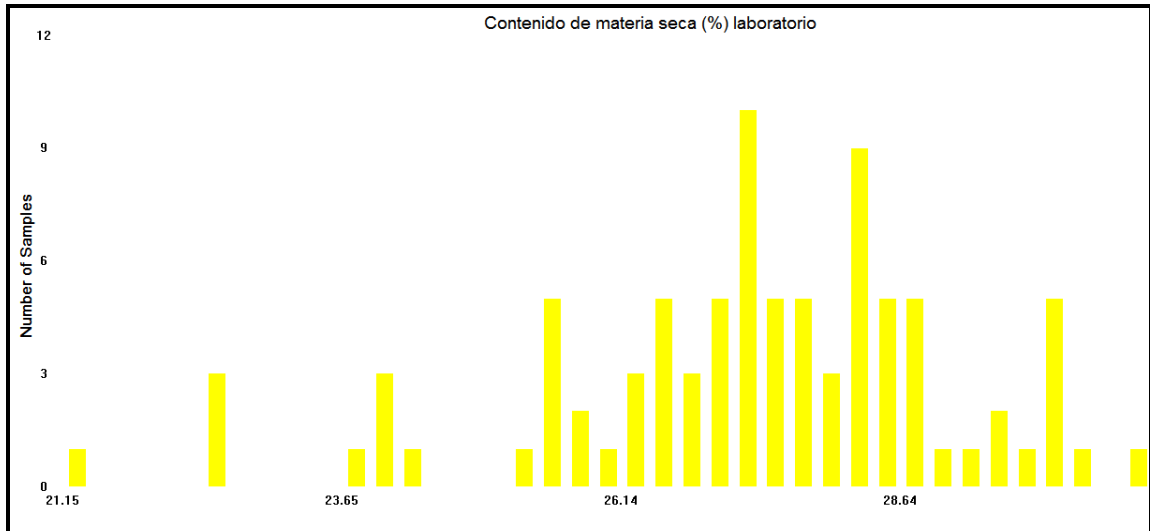


FIGURA 7 Histograma de distribución de las muestras para materia seca.

La figura 7 muestra que la mayoría de las muestras presentan valores que se encuentran agrupados principalmente entre 26 y 28 % de materia seca.

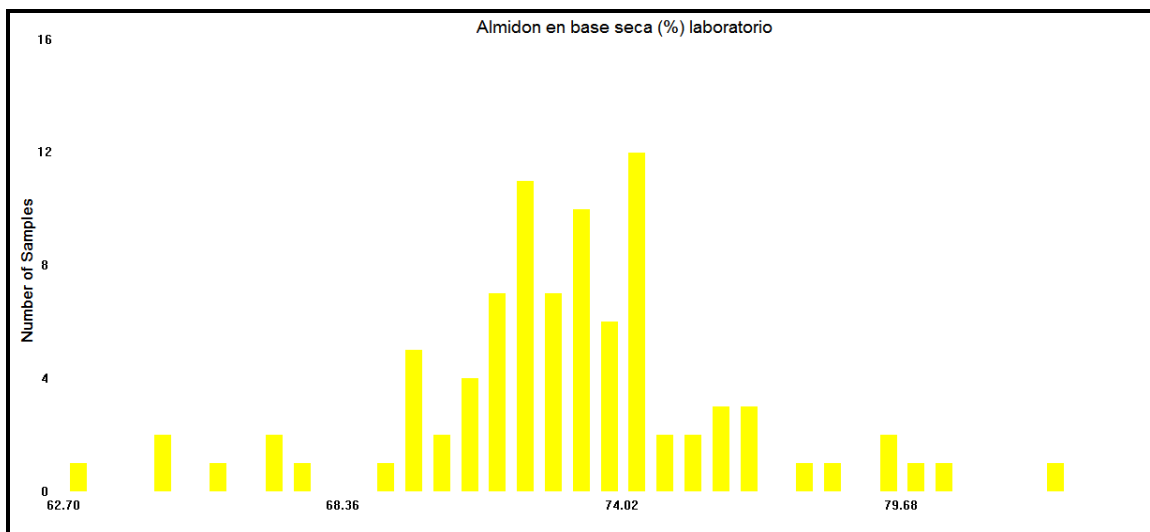


FIGURA 8 Histograma de distribución de las muestras para almidón en base Seca.

Para el caso de del contenido de almidón en base seca se aprecia que principalmente esta se encuentra agrupada entre los 70 y 74 % según consta en la FIGURA 8.

4.2 Caracterización de los espectros recolectados mediante NIRS

En la figura 9 se observa la totalidad de los espectros colectados para las 90 muestras analizadas (set de calibración). Estos espectros comprenden tanto en el rango visible como el infrarrojo cercano los cuales abarcan desde los 400 nm hasta los 2500nm.

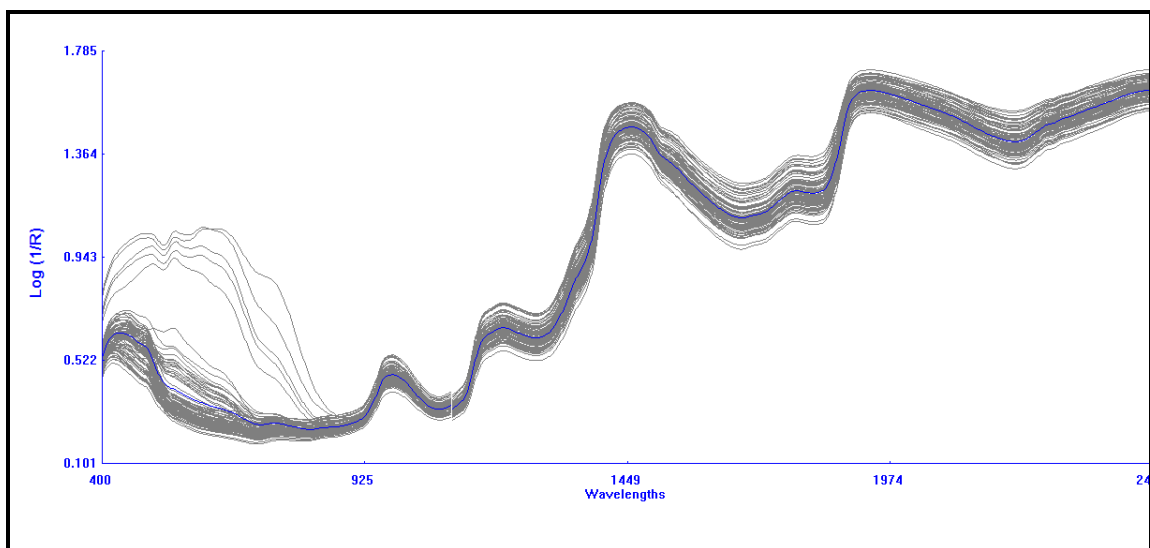


FIGURA 9 Agrupación de espectros para las 90 muestras del set de calibración.

En la FIGURA 9 se aprecia claramente que en la zona visible (400-800 nm) existen algunos espectros con una marcada diferencia a los otros. Esto se debe principalmente a que las variedades de papa a las cuales pertenecen estos espectros son papas de colores, como se muestra en el ANEXO 1.

Con el objeto de optimizar la extracción de la información obtenida se realiza una derivación o diferenciación que permite que los espectros sean removidos y reordenados centrándose alrededor de la línea cero, esto con el objeto de reducir el “ruido” de los espectros, en la FIGURA 10 y 11 se presentan los espectros con una primera y segunda derivada respectivamente.

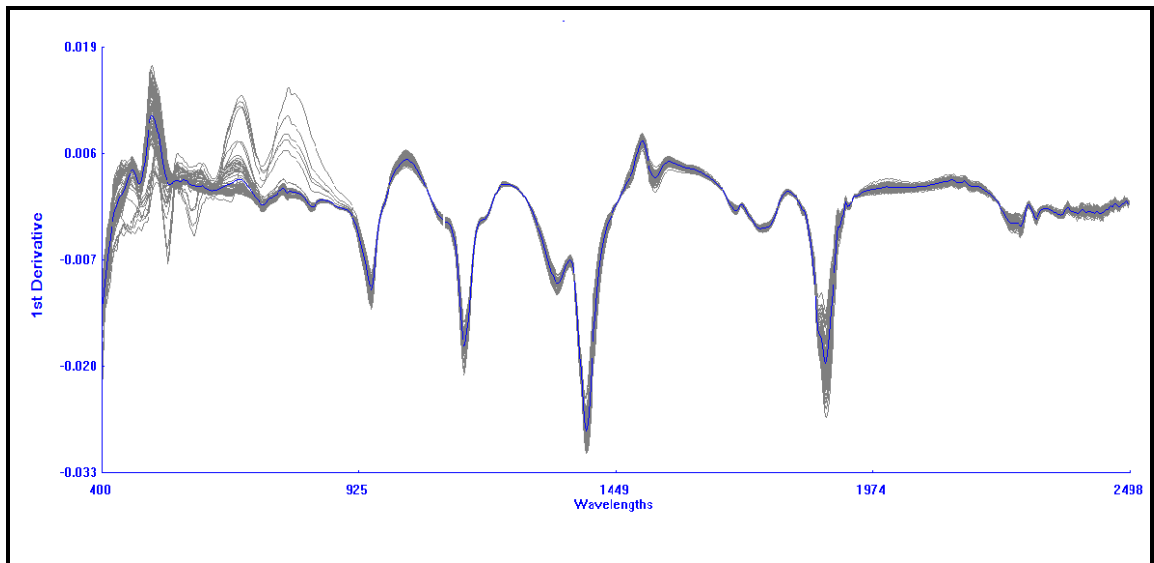


FIGURA 10 Agrupación de espectros con una primera derivada.

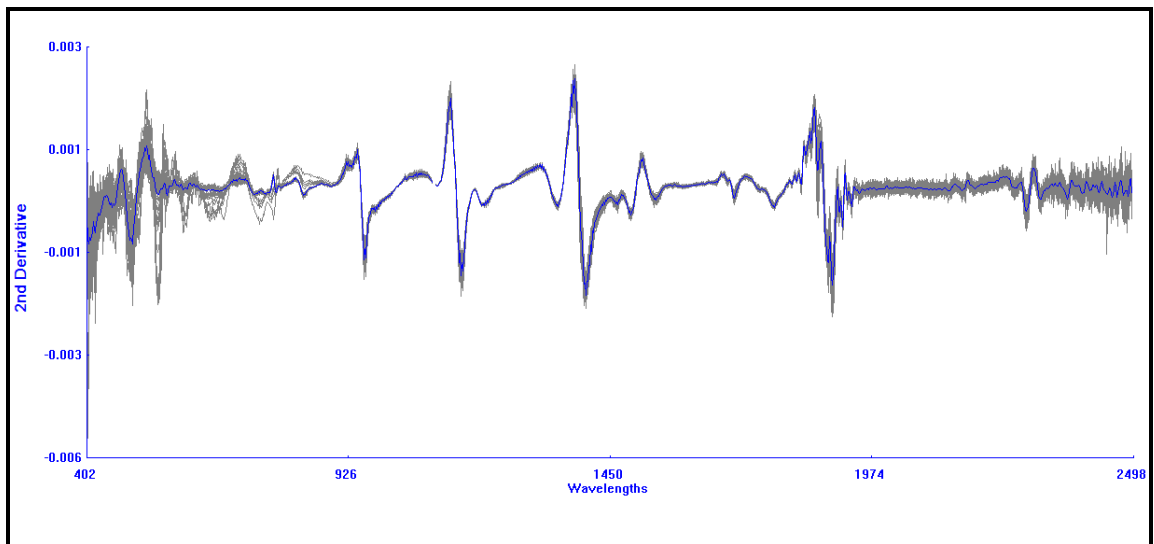


FIGURA 11 Agrupación de espectros con una segunda derivada.

En la FIGURA 10 y 11 con los tratamientos especificados se han destacado las bandas de absorción de los constituyentes de las muestras, apreciándose en los picos mas altos de los espectros, ósea, se ha hecho una “limpieza” de datos espectrales, destacándose claramente que con una segunda derivada esta “limpieza” surte un mayor efecto.

Con el objeto de realizar una mejor calibración se suprimió el espectro visible por poseer estos espectros una marcada diferencia con el resto, es decir, con el objeto

de obtener mejores ecuaciones de calibración se trabajó con los espectros que se encuentran entre los 1100 nm hasta los 2500 nm, ya que al realizar las calibraciones incluyendo el rango visible, estas presentaron mayores deficiencias en comparación al hacerlas solo con el rango con el cual se trabajó.

4.3 Desarrollo de calibraciones

Una vez aplicados los tratamientos de diferenciación, corrección matemática y análisis estadístico de regresión (MPLS), se presentan a continuación las cinco mejores ecuaciones de calibración para cada componente a calibrar, los cuales presentaron los mejores índices de predicción de la composición deseada, también se expone en forma grafica la mejor ecuación obtenida comparando los valores predichos por NIRS contra los obtenidos por laboratorio para cada parámetro a analizar. La discusión en los siguientes puntos estará centrada en los tratamientos matemáticos y los indicadores estadísticos generados para cada ecuación. En los ANEXOS 7, 8 y 9 se presenta la totalidad de los tratamientos utilizados (23) junto a los resultados de cada uno de ellos.

4.3.1 Contenido de almidón en base fresca. En el CUADRO 10 se presentan los resultados de las mejores cinco ecuaciones encontradas indicando, como se aprecia, el tratamiento matemático (TM), numero de muestras (NM), coeficientes de determinación de la calibración (R^2) y validación cruzada (1-VR), además los respectivos errores estándares SEC y SECV y finalmente la relación entre SD y SECV.

CUADRO 10 Caracterización de las cinco mejores ecuaciones de calibración e indicadores estadísticos para contenido de almidón en base fresca.

	TM	NºM	R^2	SEC	1-VR	SECV	SD	SD/SECV
2-10-20-1	SNV Y D	87	0,493	0,941	0,453	1,012	1,321	1,30
2-8-8-1	SNV Y D	87	0,496	0,938	0,453	1,013	1,321	1,30
2-5-5-1	SNV Y D	87	0,497	0,937	0,454	1,012	1,321	1,30
2-12-12-1	SNV Y D	87	0,496	0,938	0,455	1,011	1,321	1,30
2-10-10-1	NONE	87	0,488	0,945	0,470	0,969	1,321	1,36

Como se menciono anteriormente el principal criterio discriminador de ecuaciones e indicador de la eficiencia de esta, corresponde principalmente a la relación SD/SECV. KENNEDY, *et al.*, (1995), señalan que una ecuación de calibración apropiada es aquella donde el SECV sea inferior o igual a un tercio de SD, vale decir, donde el valor SD/SECV sea superior o igual a 3. Como se aprecia en el CUADRO 10 ninguno de estos valores cumple con lo establecido por KENNEDY ya que en la mejor relación SD/SECV llega a 1,36. También, se pueden apreciar los coeficiente de determinación de la calibración (R^2) y el de validación cruzada (1-VR), los cuales presentan valores de 48 % y 47 % respectivamente en la mejor ecuación obtenida, lo cual indica que los valores obtenidos no poseen un grado de ajuste con una buena predicción, considerándose una calibración “pobre” desde el punto de vista de ecuaciones de predicción. Estos valores comparados con el trabajo realizado por HAASE (2006). quien trabajó determinando almidón en base fresca, pero con la diferencia que lo hacia con la muestra de papa molida, demuestran que sus ecuaciones fueron de mayor valor predictivo ya que obtuvo un valor de validación (1-VR) de 90 % en el mejor de los casos lo cual dista mucho del valor 47 % obtenido en el presente trabajo, sin embargo, existen algunas diferencias claras entre los dos trabajos tales como el método de referencia utilizado y las muestras utilizadas los cuales pueden haber influido en las determinaciones de las mejores ecuaciones de calibración. En el trabajo presentado por el autor antes señalado no se mencionan los tratamientos matemáticos utilizados para obtener los valores publicados.

En la FIGURA 12 se presenta un esquema que explica de mejor manera la situación antes descrita ya que se aprecia claramente que los valores predichos por NIRS no se ajustan a cabalidad con los valores obtenidos por el método químico de referencia.

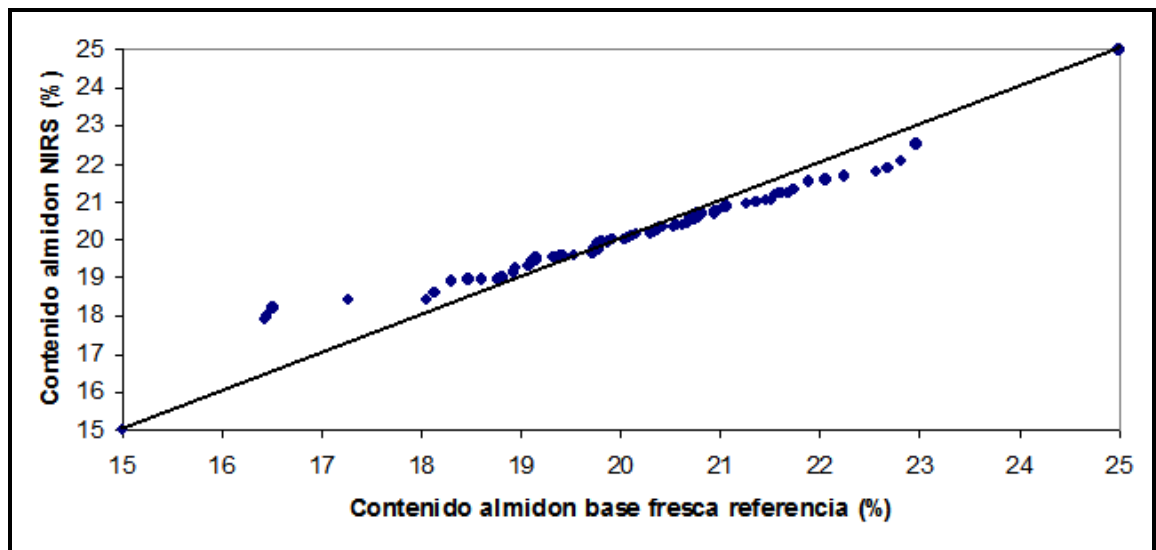


FIGURA 12 Relación entre contenido de almidón en base fresca (%) y su Predicción por NIRS.

La FIGURA 12 presenta la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión formada por la relación entre los valores estimados mediante el método de laboratorio versus su valor predicho por NIRS. En general se observa una clara tendencia a sobrestimar valores bajos y subestimar valores altos.

De acuerdo a los datos obtenidos para esta variable a calibrar se puede señalar que el presente modelo predictivo no podría ser utilizado como un método de predicción del contenido de almidón en muestras frescas de papas ya que los valores distan mucho de los requeridos para tal efecto.

4.3.2 Contenido de materia seca. En el CUADRO 11 se presentan las cinco mejores ecuaciones obtenidas (en orden decreciente) para la calibración de la predicción de materia seca en papas, los datos son presentados junto con los resultados obtenidos para cada una de las ecuaciones a analizar.

CUADRO 11 Caracterización de las cinco mejores ecuaciones de calibración e Indicadores estadísticos para contenido de materia seca.

TM	NºM	R ²	SEC	1-VR	SECV	SD	SD/SECV	
0-0-5-1	SNV Y D	87	0,803	0,854	0,762	0,960	1,925	2,00
0-20-20-1	NONE	87	0,812	0,851	0,757	0,970	1,962	2,02
1-5-5-1	SNV Y D	85	0,834	0,770	0,776	0,924	1,913	2,07
0-0-5-1	NONE	87	0,815	0,844	0,787	0,912	1,962	2,15
0-4-4-1	NONE	87	0,815	0,844	0,787	0,912	1,962	2,15

En el CUADRO 11 se aprecia que la relación SD/SECV para la mejor ecuación (0-4-4-1) no sobrepasa el valor 3 recomendado por KENNEDY *et al.* (1995). Sin embargo la información entregada por los coeficiente de determinación de la calibración (R²) y el de validación cruzada (1-VR), que son de 81,5 % y 78 % respectivamente, señalan que la ecuación de calibración para este componente es poco confiable. Que el valor de el R² (calibración) sea superior al de 1- VR (validación) indican un grado de ajuste de los datos predichos respecto a los reales y una moderada predicción de las ecuaciones desarrolladas. De acuerdo a los datos obtenidos para esta variable a calibrar se puede señalar que el presente modelo predictivo podría ser utilizado como un método de análisis discriminante (análisis cuantitativo), vale decir, para la determinación de muestras con un alto, medio o bajo contenido de materia seca.

Según la investigación realizada por SCANLON *et al.*, (1999), en la cual se desarrollaron ecuaciones de calibración para contenido de materia seca en papas, las cuales presentaron valores de 81 % para el R² y de 77 % para 1-VR, se ajustan bastante a los obtenidos en el presente trabajo considerándose que las ecuaciones obtenidas son casi las mismas por la cercanía de los valores obtenidos.

De acuerdo a los parámetros obtenidos se puede decir que las ecuaciones de predicción para materia seca son moderadamente buenos y que los resultados se ajustan a la predicción, esto se ve reflejado en la FIGURA 13 donde se presenta una grafica con los valores de referencia versus los obtenidos mediante la calibración NIRS.

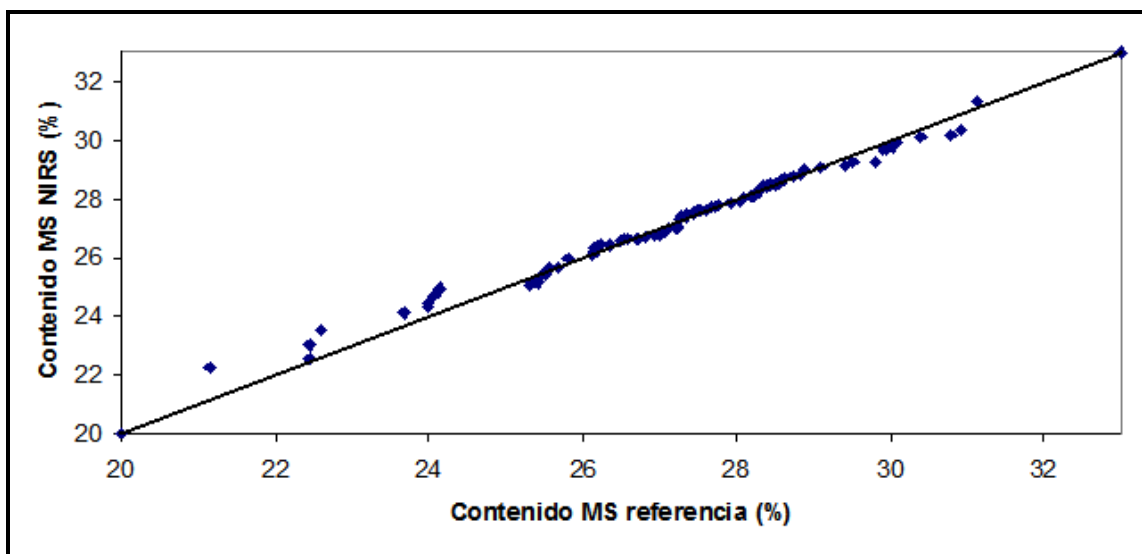


FIGURA 13 Relación entre contenido de materia seca (%) y su predicción por NIRS.

En la FIGURA 13 se presentan los valores predichos para el tratamiento 0-4-4-1 apreciándose el muy buen ajuste alcanzado ya que presentan una muy buena exactitud, mostrando un mucho mejor ajuste que los obtenidos para contenido de almidón en base fresca.

4.3.3 Contenido de almidón en base seca. En el CUADRO 12 se presentan los resultados de las mejores ecuaciones para la calibración en la predicción del almidón en base seca, no se encontraron trabajos publicados acerca de calibraciones, por lo tanto, la discusión se basará en los datos obtenidos tomando como parámetros los resultados obtenidos.

CUADRO 12 Caracterización de las cinco mejores ecuaciones de calibración e indicadores estadísticos para contenido de almidón en base seca.

TM	NºM	R ²	SEC	1-VR	SECV	SD	SD/SECV	
1-12-12-1	SNV Y D	81	0,794	1,118	0,741	1,308	2,462	1,88
0-4-4-1	NONE	82	0,766	1,206	0,739	1,313	2,492	1,89
2-5-5-1	NONE	81	0,810	1,072	0,747	1,292	2,462	1,90
1-12-12-1	NONE	83	0,764	1,246	0,753	1,277	2,562	2,00
1-5-5-1	NONE	82	0,792	1,167	0,756	1,267	2,560	2,02

En el CUADRO 12 se presentan las cinco mejores ecuaciones de calibración para el parámetro de contenido de almidón en base seca, como se aprecia ninguno de las ecuaciones cumple con el requisito estipulado por KENNEDY, *et al.* (1995) ya que los valores se encuentran por debajo de 3, sin embargo, los datos de los coeficientes de determinación de la calibración (R^2) y el de validación cruzada (1-VR) (en la ecuación 1-5-5-1) los cuales son de 79 % y 75 % respectivamente, estos datos aunque se encuentran por debajo de los obtenidos para materia seca, entregan información importante y se puede decir que los valores se ajustan para poder predecir medianamente bien el contenido de almidón para una muestra de papa fresca.

Contrariamente al caso del contenido de almidón en base fresca, se puede señalar que este modelo predictivo podría ser utilizado como un método de análisis discriminante (análisis cuantitativo), vale decir, para la determinación de muestras con un alto, medio o bajo contenido de almidón en base seca, al igual que el parámetro de contenido de materia seca, aunque con un menor nivel de predicción.

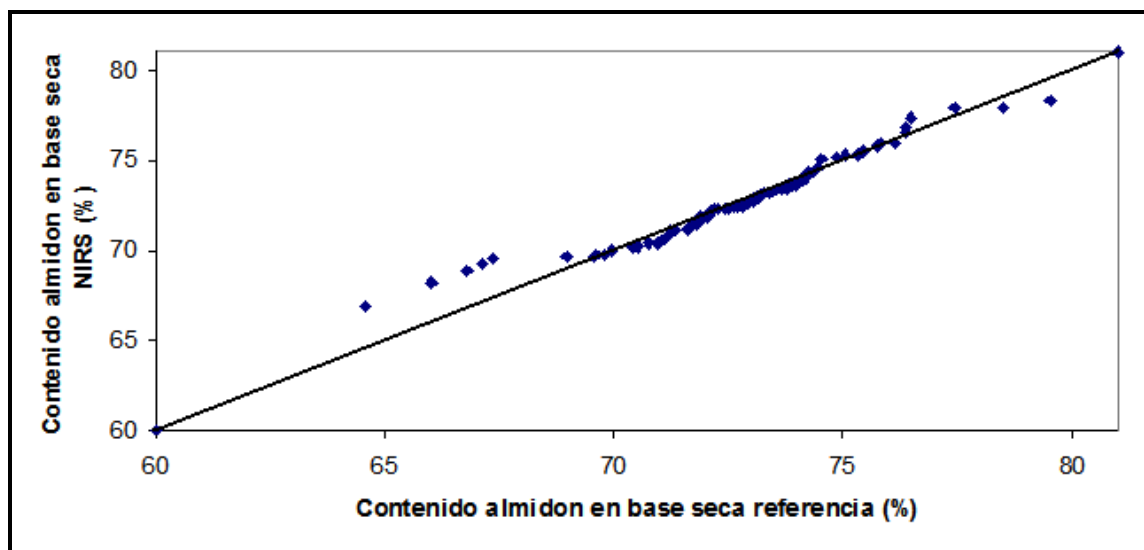


FIGURA 14 Relación entre contenido de almidón en base seca (%) y su Predicción por NIRS.

En la FIGURA 14 se aprecia la dispersión de las muestras, donde los datos espectrales y de referencia se distribuyen con aceptable exactitud, pero se aprecia un menor ajuste de predicción que en los obtenidos para materia seca.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y bajo las condiciones experimentales de este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- Se logro obtener una alta eficiencia en la predicción del contenido de materia seca en una muestra fresca de papa ya que fue el parámetro que mostró los mejores índices estadísticos para la calibración.
- Para el caso de la predicción de los contenidos de almidón en base fresca se comprobó que la técnica NIRS no puede ser utilizada como una herramienta confiable para la determinación de este parámetro, de acuerdo a los indicadores estadísticos arrojados.
- Para la predicción de contenido de almidón en base seca, de acuerdo a las mejores ecuaciones de predicción obtenidas, se observa una buena precisión, por lo tanto, la técnica podría ser utilizada como análisis de rutina, para la predicción de niveles altos, medios o bajos de almidón expresados en base seca.
- Se comprobó mediante pruebas de ensayo y error que los diferentes tratamientos matemáticos utilizados son capaces de discriminar entre las mejores calibraciones, obteniéndose así las mejores ecuaciones para cada parámetro a predecir.
- Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) se comprobó que existen diferencias significativas entre las variedades de papa.

Se puede concluir finalmente que es posible obtener ecuaciones de calibración con cierto nivel de confiabilidad mediante la técnica NIRS para la determinación de contenido de materia seca en una muestra fresca de papa, pero no tan confiable para la determinación del contenido de almidón en base seca, demostrándose también que para la predicción de almidón en base fresca los resultados fueron insatisfactorios. Por lo tanto, los resultados obtenidos soportan parcialmente la

hipótesis general, ya que la tecnología NIRS puede ser usada como una herramienta en la determinación de contenidos de almidón (a través de la predicción de materia seca) en muestras frescas de papas.

6. RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el uso potencial de la técnica de espectrofotometría en el infrarrojo cercano, NIRS, para la determinación del contenido de almidón en papa, en este caso papas nativas de Chiloé, Chile. Para la calibración correspondiente se utilizaron 18 variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum*), las cuales fueron tratadas y almacenadas de una manera adecuada para los posteriores análisis. Para cada variedad se usaron cinco papas, de las cuales se tomaron 5 rodajas y se recolectaron los espectros NIRS. A las mismas cinco papas se les realizó como análisis de referencia el método del DNS de medición de almidón por azúcares reductores. Además se les midió materia seca. Los parámetros a calibrar fueron: contenido de almidón en base fresca, contenido de materia seca y contenido de almidón en materia seca.

Para la calibración se utilizaron 90 muestras de papas sometidas a un monocromador de barrido NIRSystems^{MR} modelo 6500, dotado del software denominado WinISI II Project Manager V1.04, con el cual se obtuvieron los espectros y posteriormente fueron analizadas en laboratorio para obtener los datos referenciales.

Las ecuaciones de calibración fueron desarrolladas con diferentes tratamientos matemáticos de los datos espectrales y se utilizó un tratamiento de corrección de dispersión (**SNV y D**). El método de regresión utilizado fue el de los mínimos cuadrados parciales modificados (**MPLS**). Se realizó una validación cruzada para evaluar las calibraciones de acuerdo al coeficiente de determinación (**1-VR**) y el error estándar de validación cruzada (**SECV**), además de la relación **SD/SECV**.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica NIRS puede resultar una herramienta útil en la determinación de los parámetros antes descritos, siendo de mayor efectividad para predecir el contenido de materia seca que para la predicción de contenido de almidón en base a materia húmeda o seca.

SUMMARY

The main objective of this study was to evaluate the potential use of near infrared spectrophotometry, NIRS, for determination of potato Starch content, in this case native potato from Chiloé, Chile. For calibration, 18 native potato varieties (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum*) were used, treated and stored, in an appropriate place for later analysis. For each variety five tubers were used from which 5 slices were cut and the NIRS spectra were taken. To the same five potato tubers analysis was carried out to measure starch by the DNS method for reducing sugar. Besides, dry matter, was measured. Parameters calibrated were: starch content on wet basis, dry matter and starch content on dry basis.

For calibration 90 potato samples were measured by a scanning monochromator NIRSystems^{MR} model 6500, equipped with the WINISI Project Manager V1.04 software and the spectra were obtained and subsequently the samples were analyzed in the lab to obtain the reference data.

Calibration equations were developed with different mathematical treatments of spectral data and a dispersion correction treatment was used (**SNV y D**). The regression method used was the modified partial least squares (**MPLS**). A crossed validation was used to evaluate the calibrations according to the determination coefficient (**1-VR**), also the standard error crossed validation (**SECV**) and the relations **SD/SECV** were carried out.

The results obtained show that the NIRS technique could be a useful tool to evaluate the described parameters, being more effective to predict the dry matter content than the starch content on wet basis or dry basis.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALOMAR, D. y FUCHSLOCHER, R. 1998. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur* 26 (1): 88-104.
- ARTACHO, M. 1975. Evaluación de métodos para determinación de almidón azúcares reductores y proteínas en papas. Memoria de título para optar al grado de licenciado en agronomía. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile.
- AYALA, A. 1995. Textura y reología de alimentos. Caracterización de las propiedades reológicas de harinas y almidones. Memorias del seminario de la Universidad del Valle. Cali, abril 21
- BADUI, S. 1999. Química de los alimentos. Editorial Alhambra Mexicana. México 648 p.
- BARRIENTOS, C. 1992. Evaluación del contenido y rendimiento de almidón en 22 líneas de papa (*solanum tuberosum spp. Tuberosum*) derivadas del germoplasma chileno. Memoria de título para optar al grado de licenciado en agronomía. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile.
- BEYER, E. 1997. Dinámica de degradación ruminal de la materia seca de ensilajes y su predicción por espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 118 p.
- BELITZ, H. y GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. Editorial Acribia Zaragoza. España. 1087 p.
- CACERES, P. 1991. Factores de rendimiento en la producción de almidón de papa. Memoria de título para optar al grado de licenciado en agronomía. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile.
- COLEMAN, S. y MURRAY. I. 1993. The use of near-infrared reflectance spectroscopy to define nutrient digestion of hay by cattle. *Animal feed Science and Technology* 44: 237-249.

- CUEVAS, J. 2005. Calibración de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para medición de la composición química de praderas (muestras secas) en la Décima Región. Memoria de título para optar al grado de licenciado en agronomía. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile.
- CHAPLIN, MF 1986. Monosaccharides. En Chaplin MF, Kennedy JF (eds.): "Carbohydrate Analysis: A Practical Approach". IRL Press (Oxford, England) .
- DAVIES, A. y GRANT, A. 1987. Review: Near infra-red analysis of food. In: Journal Food Science. Technology 22: 191-207.
- DEAVILLE, E. y FLINN, P. 2000. Near-infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. In: Givens, D., Owen, E., Axford, R. y Omed, H. (eds). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI. Wallingford, UK. pp: 301-320.
- DE PABLO, M. 2002. Efectos de los métodos de congelado y secado sobre características espectrales (NIRS) y composición nutricional de forrajes frescos. Memoria de título para optar al grado de licenciado en agronomía. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile.
- DONALD, A. M., PERRY, P. A. y WAIGH, T. A. 2001. The impact of internal granule structure on processing and properties. In: Starch Advances in Structure and Function. Editado por T. L. Barsby, A. M Donald y P. J. Frazier. England. pp 45-52.
- FAO, 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO. 163. 134 pp.
- FAO/FIDA, 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. Roma. 60 pp.
- FRENZEL, L. 2003. *Sistemas electrónicos de comunicaciones*, Tercera reimpresión, México D.F.: Alfaomega, 21 a 23 pp.
- FENNEMA, O. 2000. Química de los alimentos. Editorial Acribia Zaragoza. España. 1250 pp.

- GARRIDO, A; GOMEZ, A; GUERRERO, J.E; FERNÁNDEZ, V. 1996. NIRS: Una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. Departamento de Producción Animal. ETSIAM. Universidad de Córdoba. XII Curso de especialización FEDNA. Madrid, España. 27 p.
- HINDLE, P. 1999. The last millennium: a brief history of science leading to current infrared technology. In: Davies, A. y Giangiacomo, R. (eds). Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9th International Conference. Verona, Italia. p: 1-6.
- INFRAISOFT INTERNATIONAL. 1995. Routine operation, calibration development and network system management manual. Infracsoft International Inc. USA. 335 pp.
- JOBLING, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr Opin Plant Biol.* 7:210- 218.
- LINDEN, G. y LORIENT, D. 1996. Bioquímica Agroindustrial. Editorial Acribia Zaragoza. España. 428 pp.
- MARQUEZ, G. 1986. Influence of reducing sugars and amino acids in the color development of fried potatoes. In: Journal of the Science of Food and Agriculture. 51:157-160.
- MILLER, C. 2001. Chemical principles of near infrared technology. In: Nearinfrared technology in the agricultural and food industries. Editado por Phil Williams y Karl Norris. American Association of Cereal Chemists. St Paul, Minnesota. USA. 19-37 pp.
- MILLER, G. 1959. Use of DNS acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31 (3):426-428 pp.
- MURRAY, I. 1988. Aspects of the interpretation of near infra red spectra. *Food Science and Technology Today* 2(2): 135-140 pp.
- MURRAY, 1993. Forage analysis by near infra-red reflectance spectroscopy. In: Davies, A.; Baker, R.; Grant, S. y Laidlaw, L. (eds.) *Sward Measurement Handbook.* 2ª ed. British Grassland Soc. 57 p.

NIRSOLUCIONES.COM, 2009. La tecnología NIRS <http://www.nirsoluciones.com>. (Visitado el 25 de Diciembre de 2008).

NORRIS, K. 1996. History of NIR, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 4: 31-37.

OSBORNE, B.; FEARN, T. y HINDLE, P.H. 1993. *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. 2 th. Ed. Longmann Scientific and Technical. 227 pp.

REEVES, J.; BLOSSER, T.; BALDE, A.; GLENN, B. y VANDERSAL, J. 2000. Use of near infrared reflectance spectroscopy. In: D'Mello, J. (ed). *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CABI. Wallingford, UK. 185-207 pp.

SHENK, J. y WESTERHAUS, M. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: Fahey, G.C. (ed.) *Forage quality, evaluation, and utilization*. National Conference of Forages Quality. Lincoln, NE, USA. 406-449 pp.

SMITH, A. M., ZEEMAN, S. C. y DENYER, K. 2001. The synthesis of amylose. In: *Starch Advances in Structure and Function*. Editado por T. L. Barsby, A. M Donald y P. J. Frazier. England. 150-163 pp.

SCANLON, et al, 1999. Quality evaluation of processing potatoes by near infrared reflectance, In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:763-771.

WHITE, P. 1994. Property of corn starch. In: *Specialty corns*. Ed. By A. R. Hallauer. CRC Press, Boca Ratón, Fla, USA.

WESTERHAUS, M.O. 1989. Interpretation of regression statistics. En: *Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality*. Pp 39-40. G.C. Marten, J.S. Shenk, and F.E. Barton II, (eds.). USDA, Agric. Handbook N°643

ANEXOS

ANEXO 1

Codificación de las 18 variedades de papa junto con la caracterización de color de estas.

VARIEDAD	CODIFICACION	CARACTERISTICA COLOR
1	478_CON_1626	AMARILLO
2	230_UA_1065	AMARILLO
3	505_CON_991	AMARILLO
4	396_CON_906	AMARILLA CON PIGMENTOS MORADOS
5	358_UA_1193	CREMA
6	514_CON_974	AMARILLO
7	194_UA_1595	CREMA CON PIGMENTOS MORADOS
8	N_G_33	CREMA
9	N_G_15	MORADA CON PIGMENTOS CREMA
10	N_G_125_CON_1014	AMARILLO PALIDO
11	CHILCA	CREMA
12	N_G_82	AMARILLO PALIDO
13	202_UA_1634	MORADA CON PIGMENTOS AMARILLOS
14	93_COCHRANE_14_PIGMENTADO	AMARILLA CON PIGMENTOS MORADOS
15	N_G_139	AMARILLA CON PIGMENTOS MORADOS
16	136_CON_829	AMARILLO
17	N_G_19_PIGMENTADO	AMARILLA CON PIGMENTOS MORADOS
18	435_UA_1279_AMILA	AMARILLO

ANEXO 2

Forma de presentación de la muestra fresca en el equipo.



Equipo NIRS



Tajadas y sacabocado



Soporte para insertar la muestra

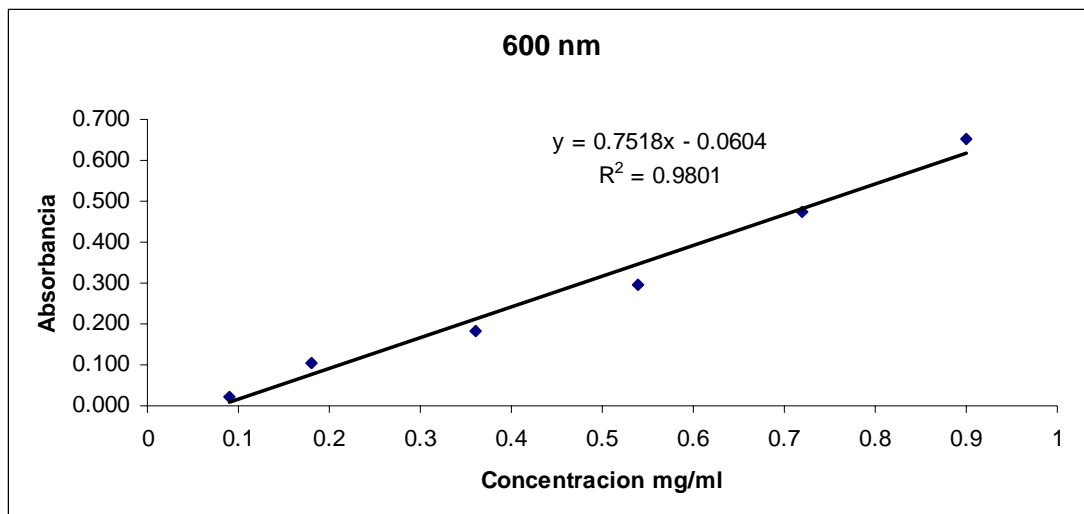


Muestra en la capsula e insertada al Equipo

ANEXO 3

Curva de calibración de glucosa para la interpolación de los datos para la determinación de azúcares.

<i>Concentración (mg/ml)</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>0.09</i>	<i>0.022</i>
<i>0.18</i>	<i>0.105</i>
<i>0.36</i>	<i>0.182</i>
<i>0.54</i>	<i>0.297</i>
<i>0.72</i>	<i>0.476</i>
<i>0.9</i>	<i>0.653</i>



ANEXO 4

Valores obtenidos para contenido de almidón en base humedad con sus cinco repeticiones, promedio y desviación estándar para cada una de las 18 variedades.

	Contenido de almidón en base fresca g almidón/100 g muestra (%)					Prom.	SD
	M1	M2	M3	M4	M5		
Variedad 1	20.95	18.30	19.15	20.34	18.95	19.54	1.08
Variedad 2	19.73	20.31	20.04	19.15	18.60	19.57	0.69
Variedad 3	20.30	20.82	20.77	21.54	20.96	20.88	0.45
Variedad 4	20.62	19.71	23.31	20.67	20.54	20.97	1.37
Variedad 5	16.50	20.33	20.08	20.70	16.44	18.81	2.15
Variedad 6	20.40	19.76	19.81	21.27	21.74	20.60	0.88
Variedad 7	18.92	18.94	19.77	18.92	20.52	19.41	0.72
Variedad 8	19.39	20.96	18.05	19.52	22.05	19.99	1.54
Variedad 9	19.91	22.82	22.96	19.78	20.30	21.15	1.60
Variedad 10	20.41	20.33	20.35	20.78	20.35	20.44	0.19
Variedad 11	18.81	18.14	19.52	17.27	20.68	18.88	1.30
Variedad 12	19.07	16.46	20.94	20.12	21.03	19.52	1.89
Variedad 13	21.06	21.62	21.45	20.78	19.42	20.87	0.87
Variedad 14	21.74	21.89	21.68	20.56	21.68	21.51	0.54
Variedad 15	19.32	19.40	18.78	20.16	19.92	19.52	0.54
Variedad 16	16.91	23.47	22.24	20.80	21.59	21.00	2.49
Variedad 17	21.51	19.11	20.55	19.72	19.86	20.15	0.92
Variedad 18	18.47	21.35	19.35	21.05	22.57	20.56	1.64

ANEXO 5

Valores obtenidos para contenido de materias seca con sus cinco repeticiones, promedio y desviación estándar para cada una de las 18 variedades.

	Contenido de materia seca g materia seca/100 g muestra (%)					Prom.	SD
	M1	M2	M3	M4	M5		
Variedad 1	27.67	24.01	22.46	28.25	22.46	24.97	2.81
Variedad 2	25.32	23.68	26.6	26.72	26.35	25.73	1.27
Variedad 3	26.56	27.02	28.28	28.27	29.52	27.93	1.17
Variedad 4	27.6	26.51	27.09	28.63	28.83	27.73	0.99
Variedad 5	25.7	27.53	27.26	28.22	25.47	26.84	1.20
Variedad 6	28.45	26.16	27.48	28.2	26.83	27.42	0.95
Variedad 7	25.81	27.46	26.94	28.05	25.42	26.74	1.10
Variedad 8	26.7	28.25	21.15	26.13	28.86	26.22	3.04
Variedad 9	27.02	27.26	28.39	27.2	30.92	28.16	1.64
Variedad 10	27.77	27.35	27.11	27.93	27.21	27.47	0.36
Variedad 11	24	27.72	24.15	24.08	28.1	25.61	2.10
Variedad 12	28.89	22.6	28.74	28.89	28.58	27.54	2.76
Variedad 13	28.57	27.73	27.28	29.92	30.08	28.72	1.26
Variedad 14	30.39	28.39	28.53	29.81	30.8	29.58	1.09
Variedad 15	25.53	26.24	29.28	25.53	26.51	26.62	1.55
Variedad 16	27.73	27.5	31.14	27.23	30.03	28.73	1.75
Variedad 17	29.11	27.24	27.36	25.56	27.36	27.33	1.26
Variedad 18	26.5	29.43	29.96	28.52	29.96	28.87	1.45

ANEXO 6

Valores obtenidos para contenido de almidón en base seca con sus cinco repeticiones, promedio y desviación estándar para cada una de las 18 variedades.

	Contenido de almidón en base seca					Prom.	SD
	g almidón/100 g muestra (%)						
	M1	M2	M3	M4	M5		
Variedad 1	72.20	78.51	73.96	71.77	73.26	73.94	2.70
Variedad 2	75.84	75.75	75.32	76.13	74.14	75.44	0.78
Variedad 3	74.03	72.04	70.77	73.56	72.45	72.57	1.29
Variedad 4	72.60	74.46	73.45	80.30	71.23	74.41	3.50
Variedad 5	74.19	72.99	72.94	72.68	73.78	73.32	0.64
Variedad 6	82.62	74.53	79.27	71.64	73.85	76.38	4.46
Variedad 7	74.37	73.39	73.06	73.14	76.37	74.07	1.39
Variedad 8	74.86	72.09	85.34	80.10	71.10	76.70	5.96
Variedad 9	73.04	72.16	71.87	72.12	71.33	72.10	0.62
Variedad 10	72.50	72.27	75.06	73.67	73.12	73.32	1.11
Variedad 11	76.38	77.44	74.24	72.81	68.97	73.97	3.33
Variedad 12	66.00	79.51	70.99	62.70	71.77	70.19	6.40
Variedad 13	71.19	73.81	72.83	67.13	64.56	69.90	3.93
Variedad 14	66.79	69.96	71.72	71.08	70.38	69.99	1.91
Variedad 15	74.05	74.26	75.44	74.16	69.58	73.50	2.26
Variedad 16	71.64	72.83	67.35	72.06	69.63	70.70	2.22
Variedad 17	69.79	73.16	74.08	76.49	69.94	72.69	2.85
Variedad 18	74.19	71.86	70.51	71.20	64.58	70.47	3.57

ANEXO 7

Tratamientos matemáticos de corrección y diferenciación espectral utilizados en la determinación de ecuaciones para contenido de almidón en base fresca (%).

TM		MEAN	RANGO	SD	NºM	SEC	SECV	1-VR	SD/SECV
0-0-5-1	<i>none</i>	20,187	16,44-23,47	1,428					
0-0-8-1	<i>none</i>	20,187	16,44-23,47						
0-0-12-1	<i>none</i>	20,187	16,44-23,47						
1-5-5-1	<i>none</i>	20,224	16,44-23,47						
1-8-8-1	<i>none</i>	20,224	16,44-23,47						
1-12-12-1	<i>none</i>	20,224	16,44-23,47						
2-5-5-1	<i>none</i>	20,151	16,44-22,96						
2-8-8-1	<i>none</i>	20,151	16,44-22,96						
2-12-12-1	<i>none</i>	20,151	16,44-22,96						
0-0-5-1	<i>SNV Y D</i>	20,187	16,44-23,47						
0-0-8-1	<i>SNV Y D</i>	20,187	16,44-23,47						
0-0-12-1	<i>SNV Y D</i>	20,187	16,44-23,47						
1-5-5-1	<i>SNV Y D</i>	20,224	16,44-23,47						
1-8-8-1	<i>SNV Y D</i>	20,224	16,44-23,47						
1-12-12-1	<i>SNV Y D</i>	20,224	16,44-23,47						
2-5-5-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						
2-8-8-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						
2-12-12-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						
2-20-16-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						
2-20-20-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						
2-10-20-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						
2-10-10-1	<i>none</i>	20,151	16,44-22,96						
2-10-10-1	<i>SNV Y D</i>	20,151	16,44-22,96						

TM: tratamiento matemático, MEAN: Promedio de los valores de laboratorio, SD: Desviación estándar, NºM: numero de muestras en el sets de calibración, SEC: Error estándar de calibración, R²: Coeficiente de determinación de calibración, SECV: Error estándar de validación cruzada, 1-VR: Coeficiente de determinación de predicción y SD/SECV: relación entre SD y SECV.

ANEXO 8

Tratamientos matemáticos de corrección y diferenciación espectral utilizados en la determinación de ecuaciones para contenido de materia seca (%).

TM		MEAN	RANGO	SD	NºM	SEC	SECV	1-VR	SD/SECV
0-0-5-1	<i>none</i>								
0-0-8-1	<i>none</i>								
0-0-12-1	<i>none</i>								
1-5-5-1	<i>none</i>								
1-8-8-1	<i>none</i>								
1-12-12-1	<i>none</i>								
2-5-5-1	<i>none</i>								
2-8-8-1	<i>none</i>								
2-12-12-1	<i>none</i>								
0-0-5-1	<i>SNV Y D</i>								
0-0-8-1	<i>SNV Y D</i>								
0-0-12-1	<i>SNV Y D</i>								
1-5-5-1	<i>SNV Y D</i>								
1-8-8-1	<i>SNV Y D</i>								
1-12-12-1	<i>SNV Y D</i>								
2-5-5-1	<i>SNV Y D</i>								
2-8-8-1	<i>SNV Y D</i>								
2-12-12-1	<i>SNV Y D</i>								
2-20-16-1	<i>SNV Y D</i>								
2-20-20-1	<i>SNV Y D</i>								
2-10-20-1	<i>SNV Y D</i>								
2-10-10-1	<i>none</i>								
2-10-10-1	<i>SNV Y D</i>								

TM: tratamiento matemático, MEAN: Promedio de los valores de laboratorio, SD: Desviación estándar, NºM: numero de muestras en el sets de calibración, SEC: Error estándar de calibración, R²: Coeficiente de determinación de calibración, SECV: Error estándar de validación cruzada, 1-VR: Coeficiente de determinación de predicción y SD/SECV: relación entre SD y SECV.

ANEXO 9

Tratamientos matemáticos de corrección y diferenciación espectral utilizados en la determinación de ecuaciones para contenido de almidón en base seca (%).

TM	MEAN	RANGO	SD	NºM	SEC	SECV	1-VR	SD/SECV	
0-0-5-1	<i>none</i>								
0-0-8-1	<i>none</i>								
0-0-12-1	<i>none</i>								
1-5-5-1	<i>none</i>								
1-8-8-1	<i>none</i>								
1-12-12-1	<i>none</i>								
2-5-5-1	<i>none</i>								
2-8-8-1	<i>none</i>								
2-12-12-1	<i>none</i>								
0-0-5-1	<i>SNV Y D</i>								
0-0-8-1	<i>SNV Y D</i>								
0-0-12-1	<i>SNV Y D</i>								
1-5-5-1	<i>SNV Y D</i>								
1-8-8-1	<i>SNV Y D</i>								
1-12-12-1	<i>SNV Y D</i>								
2-5-5-1	<i>SNV Y D</i>								
2-8-8-1	<i>SNV Y D</i>								
2-12-12-1	<i>SNV Y D</i>								
2-20-16-1	<i>SNV Y D</i>								
2-20-20-1	<i>SNV Y D</i>								
2-10-20-1	<i>SNV Y D</i>								
2-10-10-1	<i>none</i>								
2-10-10-1	<i>SNV Y D</i>								

TM: tratamiento matemático, MEAN: Promedio de los valores de laboratorio, SD: Desviación estándar, NºM: numero de muestras en el sets de calibración, SEC: Error estándar de calibración, R²: Coeficiente de determinación de calibración, SECV: Error estándar de validación cruzada, 1-VR: Coeficiente de determinación de predicción y SD/SECV: relación entre SD y SECV.

ANEXO 10

Análisis de Varianza (ANDEVA), mediante Test de Fisher, para el contenido de almidón en base fresca para las 18 variedades de papas.

Contenido de almidón en base fresca (%)			
Origen	Entre grupos	Inter grupos	Total Corregido
Suma de Cuadrados	55,9948	123,579	179,574
Grados de Libertad	17	72	89
Media	3,29381	1,71638	
Fisher	1,92		
Valor-p	0,0296		