



Uso de espectroscopia NIR en la detección rápida de proteínas y extracto etéreo en genotipos de avena, aplicado al mejoramiento genético de la especie.

Autores: Iris Lobos, Mariela Silva, Rodolfo Saldaña / INIA Remehue; Mónica Mathias / INIA Carillanca

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS - INFORMATIVO N° 263 - AÑO 2021

Antecedentes generales

La avena es conocida por contener macronutrientes de elevado valor, micronutrientes, y compuestos secundarios beneficiosos como los β -glucanos, ácidos grasos esenciales y avenantramidas. Por ello, este cereal exhibe múltiples beneficios comprobados sobre la salud, destacándose su efecto hipocolesterolémico, hipo-glicémico, regulación del peso corporal y la presión sanguínea, beneficiando la salud cardiovascular.

El bajo contenido de gluten de la avena, en comparación con otros cereales, ha generado interés acerca de su inclusión en la dieta libre de gluten de pacientes con enfermedad celíaca. Esto es relevante, porque se ha determinado que con frecuencia las dietas libres de gluten tienen perfiles de macro y micronutrientes menos saludables en comparación con una dieta con gluten, con contenidos más bajos de fibra dietaria, folato, proteína total, vitamina E, magnesio y potasio, además de un mayor nivel de grasas (en su mayoría saturadas) y calorías; lo que se debería a la ausencia de granos de cereal. La inclusión de variedades de avena libres de gluten con buen aporte de proteína, entre otros, podría mejorar significativamente la calidad nutricional de las dietas para pacientes celíacos.

En este contexto, el proyecto Núcleo "Selección de genotipos de avena libres de gluten", que actualmente se desarrolla en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) está trabajando en la estandarización y aplicación de la espectroscopia NIR en la selección de líneas avanzadas de avena libres de gluten con alto contenido de proteínas. Esta técnica analítica, rápida y no contaminante, permite cuantificar indirectamente el contenido de proteínas, grasas y otros metabolitos de interés, en un gran número de genotipos. Al ser una técnica no

destruccion de la semilla, es idónea para su aplicación en programas de mejoramiento genético, cuando todavía se cuenta con bajas cantidades de semillas de las líneas avanzadas.

Con el uso de esta metodología, se espera contribuir en la toma de decisiones en el proceso de selección de genotipos de avena libres de gluten; seleccionando aquellos que posean un buen aporte de proteínas, además de un contenido aceptable de grasas, entre otros.

Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS)

La caracterización de la composición nutricional de los alimentos se realiza mediante análisis bromatológicos, que tienen la desventaja de ser lentos en su proceso, destruyen la matriz alimentaria y requieren de instrumentación específica por cada tipo de análisis, lo que contribuye al elevado costo de estos.

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos métodos instrumentales tan robustos y fiables como los métodos convencionales. Uno de ellos es la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS). La región NIR se encuentra en el rango de longitudes de onda entre 780–2500 nm en el espectro electromagnético. Cuando la muestra es escaneada, la energía radiante se absorbe selectivamente de acuerdo a las frecuencias de vibración específica de las moléculas presentes y produce un sobretono (vibraciones fundamentales o estados excitados superiores) en el espectro. Todos los enlaces orgánicos (por ejemplo; C-H; N-H y O-H) tienen bandas de absorción en la región NIR, por lo que puede detectar enlaces de las fracciones de proteínas, grasas, carbohidratos, entre otros.

La utilización rutinaria de la espectroscopía NIR requiere el desarrollo y validación previa de un modelo de calibración que relacione las propiedades del espectro NIR con el contenido del analito de interés.

Para desarrollar y validar los modelos de regresión para cada parámetro, se utiliza la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y las muestras se dividen en dos conjuntos. Para definir cada conjunto, las muestras se ordenan según el valor químico de cada parámetro, y posteriormente se distribuyen alternativamente, uno para calibración y otro para validación. De esta manera, ambos conjuntos cubren todo el rango de datos químicos y el total de las muestras, así un primer conjunto de submuestras se utiliza para desarrollar los modelos de calibración y un segundo conjunto para evaluar el desempeño de los modelos desarrollados.

Posteriormente, se procede a la selección de longitudes de onda, pre-tratamientos matemáticos, número de factores PLS y determinación de valores atípicos se realizan utilizando la función de optimización incluida en el software (OPUS 6.5) del instrumento. Empleando este análisis y comparando los valores obtenidos por el método de referencia con los predichos por la tecnología NIR, se obtienen los siguientes parámetros como indicadores de la fiabilidad de la metodología NIRS:

1. Coeficiente de determinación R^2 , el cual debe ser lo más cercano a la unidad
2. Error estándar de estimación RMSEE, que debe ser lo más bajo posible
3. Número de factores PLS, el cual se recomienda sea menor a 10
4. Valor RPD (Desviación Residual Predictiva), estadístico adimensional que realiza una evaluación rápida del modelo de calibración en espectroscopia NIR y se define como la relación entre la desviación

estándar del método químico de referencia y el error de predicción (SEP) encontrado en el modelo NIRS.

Si un producto muestra un rango estrecho en la composición química, o si el error en la estimación es grande en comparación con la desviación estándar de la composición, entonces la regresión encuentra una dificultad creciente para encontrar calibraciones NIR estables. Por lo tanto, el valor de RPD debe ser lo más alto posible.

La tabla 1 muestra los descriptores de calibración más utilizados para la elección del mejor modelo de calibración: R^2 y RPD (NIR) de la siguiente manera:

Tabla 1. Valores de clasificación según Williams (2014) para aplicaciones de NIR en forrajes, piensos y suelos.

R^2	RPD	Modelo de calibración
> 0,91	> 4	Excelente
0,90 - 0,82	> 3	Bueno (control de calidad)
0,81 - 0,66	2,9 - 2,0	Apropiado para detección
0,65 - 0,50	2 - 1,5	Calibración entre nivel bajo y alto
< 0,49	< 1,5	Deficiente

El Laboratorio de Espectroscopia NIR del Centro Regional de Investigación INIA Remehue cuenta con un equipo FT-NIR de última generación, donde los datos ópticos almacenados como espectros son sometidos a análisis de regresión con datos químicos de referencia para generar modelos de calibración. El mejor modelo es usado para predecir el o los parámetros de interés en muestras desconocidas.

Es así, como se ha trabajado en la generación de modelos de calibración capaces de cuantificar, en forma rápida y oportuna, el contenido de proteínas y grasas, en diversos genotipos de avena.



Foto 1. a) Granos de avena desnudos. b) Registro de muestras equipo BRUKER FT-NIR.

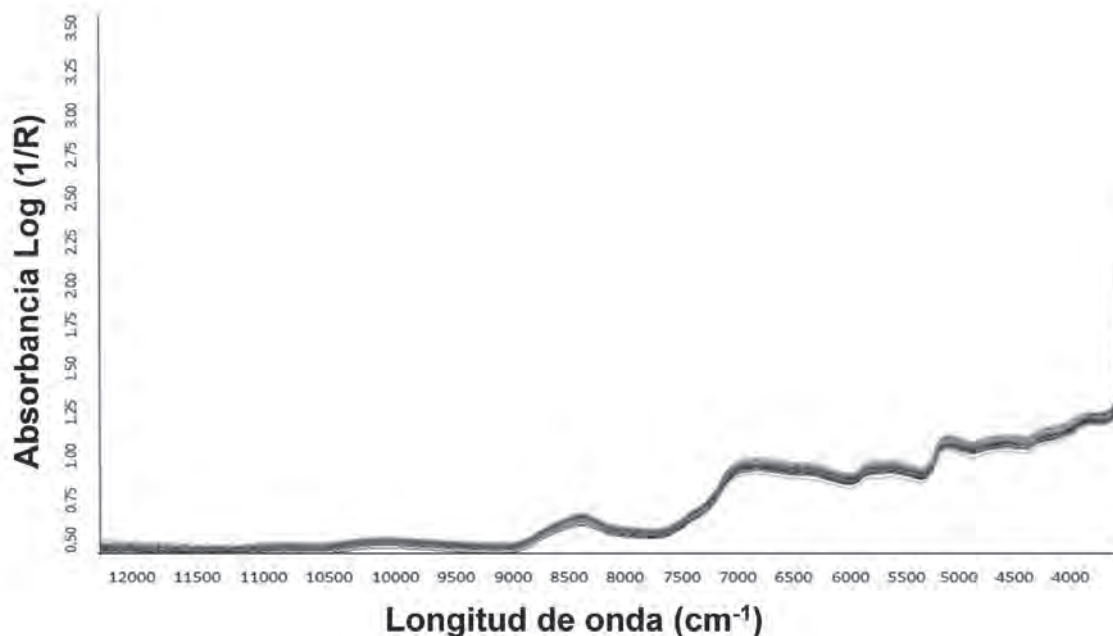


Figura 1. Espectros de diversos genotipos de avena en la región NIRS

Tabla 2. Descriptores de calibración PLS para muestras de avena

Parámetro	Calibración			Validación			Rango de Concentración	N
	R ²	RMSEE	RPD	R ²	RMSECV	RPD		
Humedad	71,7	0,2	1,9	66,6	0,2	1,7	89,49 - 91,24	100
Proteína	92,2	0,5	3,6	91,5	0,5	3,4	18,03-8,61	122
Grasa	82,8	0,3	2,4	74,7	0,4	2,0	10,03-5,44	100

Para ello, se utilizaron 142 muestras de diversos genotipos de avena, incluyendo variedades históricas nacionales y líneas avanzadas del Programa de Mejoramiento de Avena INIA. Se tomaron 50 gramos de avena desnuda (Foto 1a), las cuales fueron depositadas en una placa de Petri para proceder al registro de los espectros en modo reflectancia, usando un espectrometro BRUKER FT-NIR-MPA (Bruker Optik GmbH, Ettlingen Germany.) (Foto 1b y Figura 1). Posteriormente, cada muestra fue analizada para humedad, grasa y proteína por métodos químicos tradicionales (Harris, 1970; Manual Tecator Soxtec System, 1983).

Los resultados obtenidos por los métodos de referencia muestran amplios rangos de concentraciones para proteína y grasa en las muestras evaluadas (Tabla 2), condición fundamental para el desarrollo de ecuaciones de calibración NIRS robustas. También, se puede observar que el modelo de predicción obtenido es excelente para

proteína, bueno para grasa y aproximado para humedad. Es importante considerar que los resultados obtenidos para el parámetro humedad podrían estar relacionados con el estrecho rango de concentraciones en el grupo de muestras utilizadas, y por lo tanto, esta metodología requiere una validación adicional para este parámetro, que incluya un mayor número de muestras, pero por sobre todo un rango de concentración más amplia que cubra una variedad de condiciones climáticas y agrícolas.

Al graficar la composición predicha por NIRS y los valores de referencia obtenidos por métodos químicos (Figura 2), se observa que la dispersión de los puntos se concentra alrededor de la línea de igual respuesta, lo que corrobora que los espectros medidos por NIRS responden a los cambios de composición química de las avenas medido por métodos tradicionales de química húmeda de manera satisfactoria para proteína y grasa.

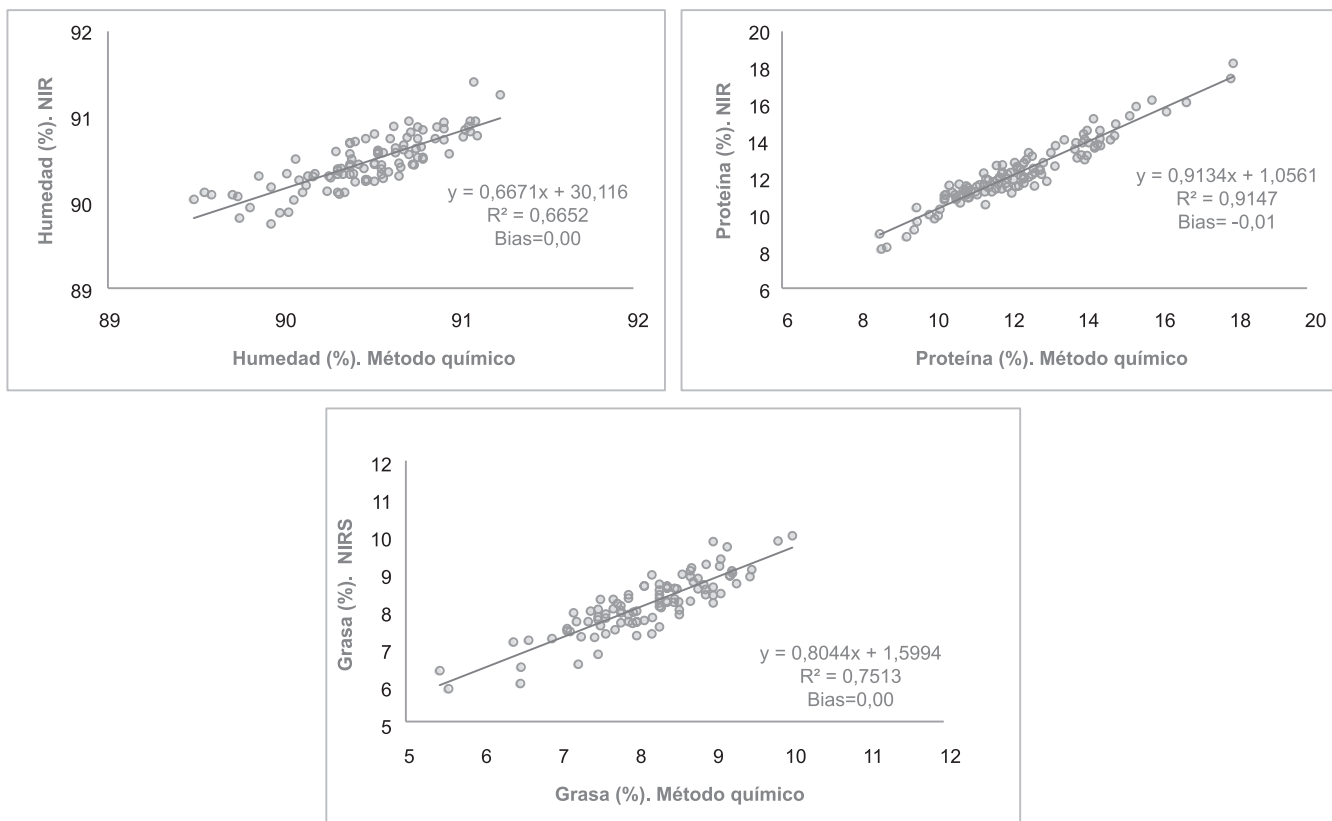


Figura 3. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por NIRS para la determinación de humedad, proteína y grasa para el conjunto de validación en muestras de diversos genotipos de avena desnuda.

Comentarios finales

A partir de los resultados obtenidos utilizando la metodología NIRS, queda de manifiesto la alta capacidad de predicción de proteína y grasa en diversos de genotipos de avena, contribuyendo a la toma de decisiones del programa de mejoramiento de avena INIA.

Si bien el proceso de calibración puede tomar varios meses, dependiendo de la variabilidad que se le quiera entregar a la calibración, y del objetivo final, una vez que la ecuación de calibración está validada, el análisis toma un par de minutos, descartando la molienda de las

semillas y el uso de reactivos. De ahí la importancia de esta técnica rápida, no destructiva y amigable con el medio ambiente.

Referencias

- Harris, 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. Vol. I. Animal Science Dept. Utah State University. USA.
- Manual Soxtec System HT6, Tecator". AN 67/83. 1983
- Williams, P.2014. The RPD statistic: a tutorial note. NIR News 25. 22-26.

Agradecimientos

Este informativo se enmarca en el proyecto Núcleos de Investigación INIA: selección de genotipos de avena libres de gluten, financiado por el Ministerio de Agricultura y ejecutado en el Laboratorio de Espectroscopía NIR de INIA Remehue.

Permitida la reproducción total o parcial de esta publicación citando la fuente y el autor.

La mención o publicidad de productos no implica recomendación INIA.

Editores: Ana María Sandoval, Innovación de Alimentos / INIA Carillanca; Javier Zúñiga, Laboratorio de Calidad de Trigos / INIA Carillanca

INIA Remehue, Ruta 5, km 8, Osorno, Chile. Fono +5664 2334819

www.inia.cl

