

Evaluación del contenido de amilosa en arroz mediante espectroscopia de infrarrojo cercano-NIRS

Johana Katerine Loaiza, Jesús E. Larrahondo

Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR). Colombia-Palmira.
Universidad Santiago de Cali y Universidad del Valle, Colombia-Cali

RESUMEN. La espectroscopia de infrarrojo cercano NIRS (por sus siglas en inglés) se emplea para el control de calidad de los alimentos. La determinación de amilosa en el arroz es un carácter heredable que correlaciona con la calidad del grano, importante en los programas de fitomejoramiento de arroz. El presente trabajo, establece la viabilidad de evaluar el contenido de amilosa en el arroz con la técnica NIRS. Inicialmente, se determinó entre arroz paddy o integral, cuál es el más apropiado para evaluar amilosa empleando NIRS. Se tomaron espectros a las 540 materiales de arroz procedentes del germoplasma del Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego FLAR, y posteriormente se hizo análisis de componentes principales y análisis de regresión múltiple en cada tipo de arroz. El arroz integral fue el que obtuvo mejores resultados estadísticos. En el desarrollo de la calibración se empleó como referencia otra calibración en NIRS basada en harina de arroz con un $R^2=0.9$ de calibración y $R^2=0.78$ de validación, y se empleó Winisi para desarrollar la quimiometría. Se utilizó mínimos cuadrados parciales MPLS y una matemática de 2,1,1,2; longitud de onda de 1100-2492,2, lo que arrojó un $R^2 \geq 0.68$ de validación externa, aceptable para caracterizar las generaciones tempranas, con aproximadamente el 83% de aciertos. Los programas de fitomejoramiento del FLAR evalúan 15.000 materiales en el año en las generaciones tempranas, lo que significa US\$ 3.600 dólares y 45 días menos que evaluar con la calibración de harina de arroz, siendo la que actualmente se emplea en el FLAR.

Palabras clave: Amilosa, arroz integral, calibración, NIRS.

SUMMARY. Evaluation of rice amylose content by near infrared Spectroscopy. The determination of amylose in the rice is an inheritable character that it correlates with the quality of the grain, importantly breeder rice. The present work, it establishes the viability of evaluating the content of amylose in the rice with the technology NIRS. Initially, paddy or integral decided between rice, which is most adapted to evaluate amylose using NIRS. Spectra took to 540 materials of rice of the germplasm banks of the Latin American Found for Irrigated Rice. FLAR, and later there was done analysis of principal components and analysis of multiple regression in every type of rice. The brown rice was the one that most better statistical results. In the development of the calibration another calibration used as reference in NIRS based on flour of rice with a $R^2 = 0.9$ of calibration and $R^2 = 0.78$ of validation, and Winisi was used to develop the chemometrie. There was in use square minimums partial MPLS and a mathematics of 2,1,1,2; wavelength of 1100-2492,2, which a $R^2 = 0.68$ of external, acceptable validation to characterize the early generations, with approximately 83 % of successes. The programs breeding of the FLAR evaluate 15.000 materials in the year in the early generations, which means US\$ 3.600 dollars and 45 days less that to evaluate with the calibration of flour of rice, being the one that nowadays is used in the FLAR.

Key words: Amylose, brown rice, calibrations, NIRS

INTRODUCCIÓN

El arroz, el trigo y el maíz son los tres cereales de mayor importancia en el mundo, suscitando una alta influencia en la nutrición humana y en la seguridad alimentaria (1). Un aspecto importante en el arroz son las características culinarias las cuales están relacionadas con la estructura química del almidón (2), este polímero está compuesto por dos moléculas, una es la amilosa y la segunda la amilopectina (3), el mayor o menor contenido

de amilosa en el grano determina la calidad en cuanto a su cohesividad, textura y brillo del arroz cocido (4). En general, se puede considerar que el contenido de amilosa relaciona varias características de la calidad culinaria del arroz.

Existen varias metodologías utilizadas para la determinación del contenido de amilosa, una es el método colorimétrico registrado por la Asociación Americana de Química de Cereales AACC (5), el cual ha sido considerado de referencia para determi-

nar el contenido de amilosa en programas de mejoramiento de arroz (6). El NIRS, es un instrumento usado en la determinación del almidón de arroz (6 y 7). Para evaluar el contenido de amilosa empleando el NIRS, se requiere realizar una calibración utilizando la quimiometría como herramienta principal, que permite obtener un modelo matemático ideal para predecir el contenido de amilosa en el arroz. En la literatura se reportan diferentes calibraciones para determinar el contenido de amilosa de forma rápida y con poca cantidad de muestra, favoreciendo el proceso de selección genética en los programas de mejoramiento de arroz (3, 8 y 9). Asimismo, se reportan trabajos de caracterización de amilosa utilizando calibraciones obtenidas en el NIRS con muestras de arroz integral (10 y 11).

La técnica NIRS para evaluar el contenido de amilosa, es la principal metodología empleada en el Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego FLAR y en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, esta metodología es utilizada con muestra de harina de arroz. La preparación de la harina, consiste en secar, descascarar, pulir y pulverizar el arroz, y luego dejar en reposo durante ocho horas para estabilizar la humedad de la harina, este proceso es considerado largo y dispendioso, afectando la eficiencia en la evaluación de amilosa. Se estimó una reducción significativa al calcular el tiempo y costo para realizar el mismo análisis empleado arroz con menos proceso de preparación de muestra: como arroz paddy o arroz integral, dejando como resultado optimización del proceso. En el mismo orden de ideas, evaluar el contenido de amilosa en muestra con la menor manipulación y preparación contribuye con los resultados del programa de fitomejoramiento del FLAR y el CIAT, no sólo porque se reduce el tiempo de preparación de muestras y el costo de operación, sino también porque se entregan más rápido los resultados y se genera mayor capacidad de análisis, teniendo en cuenta que, en los últimos años se ha venido incrementando el número de evaluaciones de amilosa en el laboratorio de calidad de arroz del FLAR, pasando de evaluar 13000 muestras en el año 2008 a 20000 muestras en el año 2014.

El objetivo de este trabajo es establecer la viabilidad de realizar una calibración en el NIRS que cuantifique amilosa con arroz en paddy o arroz integral ya que estos dos requieren menos proceso de preparación de muestra, contribuyendo en la optimización del análisis y en la efectividad en la entrega de resultados a los me-

joradores de arroz, quienes utilizan los datos para continuar sus avances de mejoramiento genético.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

Las actividades de este estudio se desarrollaron en el Laboratorio de Calidad de Arroz del Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego -FLAR, ubicado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Este Centro de Investigación está localizado en el kilómetro 17 recta Cali – Palmira, municipio de Palmira, Valle del Cauca. Con una temperatura promedio de 26°C, una altura de 1001 m.s.n.m. y con coordenadas 3° 29'56.42" Latitud Norte, 76° 21'22.36" Longitud Oeste. La temperatura promedio del Laboratorio de Calidad es 22 °C y humedad relativa de 56%.

Muestras

La muestra utilizada fue arroz paddy y arroz integral, para el método de referencia se utilizó harina de arroz pulido. Se tomaron 540 accesiones procedentes del banco de trabajo del CIAT con las cuales se realizó un barrido espectral que permitió determinar el estado del arroz ideal para desarrollar la calibración. Se realizó la calibración del equipo con los 495 materiales más representativos de la muestra inicial, donde se utilizaron variedades de arroz del CIAT, líneas y variedades del FLAR, y un panel de diversidad de sub especies indicas de arroz obtenidas del banco de semilla del Instituto Internacional de Investigación de Arroz IRRI (por sus siglas en inglés). Para la selección de la muestra se tuvo en cuenta el contenido de amilosa por categoría: alta, intermedia y baja como también diversidad en la información genética.

Preparación de la muestras

La muestra utilizada en arroz paddy se secó al sol y luego se limpió las impurezas como piedras, raquis, raquillas arroz vano y otros. La muestra en arroz integral además de la limpieza se descascaró en un molino Suzuki MT-2005 N° 4.259-6; estos procesos se hicieron tanto para el barrido espectral como para el desarrollo de la calibración. Para el método de referencia se utilizó muestra en harina, la preparación de la harina de arroz también demandó limpieza, secado, descascarado pulió del grano utilizando el molino Suzuki MT-2005 N° 4.259-6, que además de tener la opción de descascarar permite pulir el arroz. Posteriormente, las muestras fueron pulverizadas en un molino Cyclone-

LabSampleMill 3010-080p, con un tamaño de partícula 5mm.

Toma de espectros

Las muestras de arroz: paddy, integral y harina se analizaron y escanearon por duplicado empleando NIRSSystem 6500 con reflectancia ($1/\log R$) y un rango de longitud de onda de 400-2,498 nm. Se tuvo en cuenta el mismo orden de escaneo desde el paddy hasta harina de arroz.

Análisis Espectral

En la selección del estado del arroz indicado para desarrollo de la calibración, se realizó análisis espectral utilizando herramientas estadísticas como: análisis de componentes principales ACP y la distancia de Mahalanobis (12). También, se realizó regresiones múltiples, y finalmente, se discriminó por tendencias teniendo en cuenta el comportamiento de los espectros con respecto a la clasificación por categoría de amilosa.

Calibración

Se empleó el software Winisi para establecer los ajustes de calibración: limpieza de ruidos, segmentación de espectro por longitudes de onda, aplicación de la segunda derivada utilizada en granos enteros (13), gap, smooth, logaritmos y regresión. Se hizo una matriz de resultados con los datos obtenidos teniendo en cuenta las diferentes variables mencionadas, de esta forma se proyectó el mejor coeficiente de determinación R^2 , el error estándar de calibración SEC y el error estándar de validación cruzada SECV. Lo anterior se realizó utilizando la herramienta Monitor Result del programa Winisi que trae consigo el NIRS. Por otro lado se calculó la desviación residual predictiva $RPD \geq 3.0$, considerando que para este rango se puede predecir datos y categorizar por alto, intermedio y bajo la amilosa (6).

Validación

Validación Interna

Se tomaron 232 muestras conocidas entre alta, intermedia y baja, estas muestras fueron también utilizadas en la calibración. Se calculó R^2 , SEP y Slope utilizando Monitor Result.

Validación Externa

En la validación externa se empleó 47 muestras desconocidas por la calibración, se calculó R^2 y SEP con el Monitor Result, y se hizo un ANOVA para determinar si se presentan diferencias significativas entre los valores de referencia y los predichos por la nueva calibración. Se halló el porcentaje de aciertos; donde acier-

tos = % aciertos/total. Lo anterior, dado que los fitomejoradores de arroz; buscan categorizar los materiales entre alto, intermedio y bajo en amilosa, y seleccionar los entre los descartables y los promisorios, sin importar la exactitud del valor.

Tiempo y Costos

Se realizó cálculos y tablas comparativas que permitieron estimar el tiempo y costo de la nueva calibración con respecto a la ecuación en harina de arroz.

RESULTADOS

Análisis Espectral

Se encontraron APC mayores a 10, aceptables para realizar calibraciones en arroz paddy y arroz integral (13). Para el coeficiente de determinación el más representativo fue el R^2 de la regresión múltiple de arroz integral ($R^2=0.47$), se midió la distancia de Mahalanobis al centro poblacional (12) para lo cual se observaron 60 materiales atípicos en arroz paddy y 45 muestras atípicas para arroz integral.

Calibración

Dado los resultados del coeficiente de regresión fue considerado poco factible obtener una calibración con arroz paddy, por lo anterior, se consideró realizar solo una calibración empleando arroz integral. Las muestras atípicas identificadas por el cálculo de la distancia de Mahalanobis fueron eliminadas, considerando que los espectros restantes traen información limpia y representativa. En el Cuadro 1, se presenta las combinaciones más distintivas en las variables de calibración con la que se obtuvo 2 inte.eq ; empleando 435 datos, con una matemática de 2,1,1,2 y una segmentación de longitud de onda de 11000-2492,2, un suavizado con la opción SNV and Detrend y un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales MPLS. Los resultados estadísticos obtenidos fueron SEC 0,33 SECV 1,20 R^2 0,99 y RPD 3,06.

Validación Interna

Se encontró un $R^2 = 0,83$ (Figura 1) y SEP 1,23 y Slope 0.4, indicando una alta significancia en la predicción de datos.

Validación Externa

La validación interna fue mejor que la validación externa ya que en esta se obtuvo $R^2=0,68$ (Figura 2) y SEP= 1,4. Los datos del ANOVA con un δ 0,05 (Tabla 1) no presentaron diferencias significativas con un $p=0,34$; lo que indica, que entre los datos obteni-

CUADRO 1. Combinaciones de calibración más representativas por sus variables estadísticas.

Segmentación de Longitud	Derivada	Gap	Smoothe 1	Smoothe 2	RSQ	SEC	SECV	1-VR	Sd	RPD
1150-2492,2	2	1	2	2	0.984	0.460	1.372	0.861	3.654	2.66
1150-2492,2	2	1	1	2	0.989	0.329	1.325	0.870	3.676	2.77
1150-2492,2	2	1	1	5	0.957	0.773	1.491	0.837	3.700	2.48
1100-2492,2	2	1	2	2	0.982	0.493	1.364	0.862	3.648	2.67
1100-2492,2	2	1	1	2	0.992	0.327	1.214	0.891	3.707	3.05
1100-2100,2	2	1	1	2	0.972	0.671	1.362	0.864	3.705	2.72
1100-2498,2	2	1	1	2	0.992	0.334	1.208	0.892	3.700	3.06
1100-2498,2	2	1	1	1	0.979	0.534	1.263	0.882	3.681	2.91

Sd: desviación estándar

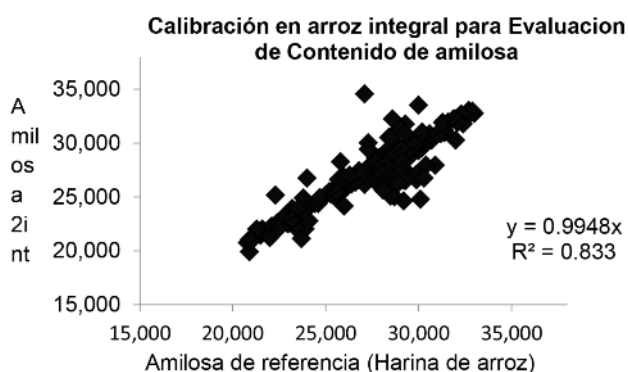


FIGURA 1. Correlación de la validación interna.

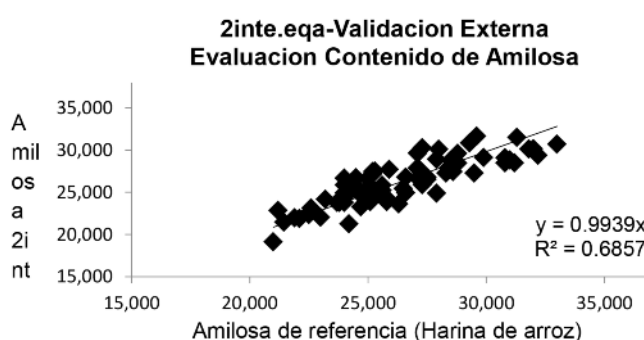


Figura 2. Correlación validación externa.

TABLA 1. ANOVA entre datos de referencia y datos predichos.

Origen	SC	GL	PC	F	P	Fcritico
Entre grupos	9147216	1	9147216	0,8	0,3	3,9
Dentro de grupos	941939836	92	10238476			
Total	951087052	93				

TABLA 2. Relación tiempo y costo por muestra

Información General	Costo total en dólar por muestra	Tiempo Total (minutos)
Muestras en harina	US \$ 0.86	5,00
Muestras en integral	US \$ 0.62	3,50

TABLA 3. Tiempo y costo requerido para evaluar amilosa /año

	# materiales	Generación	Tiempo mes/año	Costos (Dólar)
Harina de Arroz	5000	F7 y Viveros	2,6	US \$4,195.35
Arroz Integral	15000	F3-F6	5,46	US \$9,176.90
Sumatoria total	20000	8,0	US \$13,372.31

dos por la calibración con harina de arroz y los datos predichos por calibración con arroz integral se presentan similitud.

Con los 47 materiales se hizo una comparación entre el valor de referencia y los valores arrojados con la nueva calibración, y se estimó el porcentaje de aciertos, considerando en esta comparación los aciertos por

rangos de amilosa: alto (28-33 %), intermedio (23-27.9 %) y bajo (< 22.9%). Para este ensayo se obtuvo el 83% de aciertos, lo que define que para 20000 muestras año se obtendrían 17021 aciertos.

Relación tiempo y costo

En la Tabla 2 se observa que utilizar muestras en arroz integral reduce el costo en US \$23 dólares.

En los programas de mejoramiento del FLAR y el CIAT se analiza el contenido de amilosa desde generaciones tempranas F3 hasta generaciones avanzadas F6, de acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 2, y al 83% de aciertos obtenidos, se realizó un cálculo de costo y tiempo evaluando el contenido de amilosa en generaciones tempranas empleando la calibración de arroz inte-

gral, y las generaciones avanzadas empleando la calibración en harían de arroz que es más robusta y precisa, lo anterior, como una estrategia de mejoramiento y selección de material promisorio manteniendo el criterio en lo posible de optimización del proceso.

En la Tabla 3, se observa el tiempo y costo de evaluación del contenido de amilosa en el año, evaluando generaciones tempranas, 15000 muestras aproximadamente con la calibración 2inte.eqa y 5000 muestras de líneas avanzadas empleando la calibración de harina de arroz.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados, se consideró realizar la calibración con arroz integral, donde se encontró un buen ajuste en las respuestas de los datos, con un mínimo de 23 componentes principales (>10 ACP) y adicionalmente se tuvo en cuenta el criterio de la distancia de Mahalanobis al centro poblacional (12) para lo cual se observaron 45 muestras atípicas las cuales fueron eliminadas, considerando que los espectros restantes traen información limpia y representativa. También se determinó el coeficiente de determinación de la regresión múltiple de $R^2=0.47$ valorado como poco representativo, pero siendo más alto al compararlo con el R^2 obtenido para arroz paddy $R^2=0.10$. Se probaron 32 combinaciones matemáticas de las cuales se encontraron 11 combinaciones con $R^2>0.90$. Sin embargo, al realizar el análisis de desviación residual predictiva (RPD) se observaron solo tres combinaciones con valores cercanos a 3,0 (cuadro 1). Es de considerar que a mayor RPD mejor precisión, y que valores cercanos a 3,0 permiten establecer valores de referencias y permite categorizar por rango las muestras evaluadas (6). Con respecto al análisis de aciertos y a la predicción de los datos se puede considerar que es posible utilizar el modelo matemático encontrado con arroz integral 2inte.eqa para evaluar 15000 líneas de arroz en el año desde F3 hasta F6, con el 83 % de aciertos, considerando que es un porcentaje representativo para la selección temprana de poblaciones segregantes (9 y 10), las 5000 muestras evaluadas en generaciones avanzadas en el año requieren más detalle y precisión, para lo cual se pueden evaluar con la ecuación matemática hecha para harina de arroz, la cual tiene un R^2 0.78 de validación externa. Simplificando el proceso de preparación de las muestras en la evaluación de amilosa en

generaciones tempranas puede optimizar el proceso en menor tiempo y costo, lo que significa reducción en 48 días laborales y US \$3,500 dólares menos que al analizar el 100% de las muestras con harina de arroz, generando un valor agregado a los fitomejoradores del FLAR y el CIAT.

CONCLUSIONES

En los programas de mejoramiento de arroz es posible utilizar calibraciones en NIRS que permitan la predicción de datos en generaciones tempranas de acuerdo a los valores estadísticos en arroz integral, permitiendo contribuir de forma no destructiva, rápida y rentable en el desarrollo del cultivo de arroz para la calidad del grano.

AGRADECIMIENTOS

Ing. Andres Zuluaga Suarez, por la contribución durante su práctica profesional. A la Dra. Miryam Cristina Duque y Juan Cuasquer por la contribución y aportes en estadística. Al FLAR y al CIAT por el apoyo para el desarrollo de los trabajos en el Laboratorio de Calidad de Arroz.

REFERENCIAS

1. GRiSP (Global Rice Science Partnership). Rice Almanac, 4th edition, los Baños, Philippines: International Rice Research Institute; 2013.
2. Kusano M, Fukushima A, Fujita NO, Kobayashi M, Oitomen F, Ebana K, et al. Deciphering Starch Quality of Rice Kernels Using Metabolite Profiling and Pedigree Network Analysis. *Mol. Plant.* 2012; 5(2): 442 – 451.
3. Juliano, BO. Nutritive Value of Rice and Rice Diets. En: Philippine Rice Research Institute, editor. *Rice Chemistry and Quality*. 1 ed. Manila Philippine. Philippine Rice Research Institute; 2007. p 131-178.
4. Gaviria, L.J. Elaboración Culinaria y Organoléptica del Arroz Pulido Elaborado. En: *Molinería de Arroz Tomo II*. 1 ed. Bogotá DC.: Ediagro. LTDA. 2007, p 259-308.
5. American Association of Cereal Chemists AACC. *Approved Methods*. 11th. ed. Determination of the pasting properties of rice with the Rapid ViscoAnalyser. Method 61-02.01. Saint Paul, MN, USA; 2000.
6. Natsuga y Kawamura. (2006). Visible and Near-Infrared Reflectance Spectroscopy for Determining Physi-

- cochemical Properties of Rice. 2006 American Society of Agricultural and Biological Engineers ISSN 0001-2351 1069. Vol. 49(4): 1069-1076.
7. Shenk, J.S.; Workman, J. and Westerhaus, M. Applications of NIRS. Agriculture products. In Handbook of NIRS. 2^a. Editions. Burns. Pp 419-474.
 8. Bao, J. y Corke; H. Prediction of rice starch quality parameters by Near-Infrared Reflectance spectroscopy. *J Food Sci.* 2001; 66(7): 936-939.
 9. Bao, J. y Liang, YS. Determination of thermal and retrogradation properties of rice starch using near-infrared spectroscopy. *J Cereal Sci.* 2007; 46(1): 75-81.
 10. Wu, J.G. y Shi, C.H. Prediction of grain weight, brown rice weight and amylose content in single rice grains using near-infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Res.* 2004; 87(1): 13-21.
 11. Wu JG, Shi CH. Calibration model optimization for rice cooking characteristics by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) *Food Chem.* 2007; 103 (3): 1054-1061.(11).
 12. Cheewapramong, P. Use of Near-Infrared Spectroscopy for Qualitative and Quantitative Analyses of Grains and Cereal. Products. [Internet]. University of Nebraska Lincoln: Food science Technology Department; December 2007. [citado 11 de mayo 2016]. Disponible: <http://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/2/>
 13. Osborne, BG; Fearn, T; Hindle, PT. Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. Vol 1. 2nd ed. Addison-Wesley Longman &

Recibido: 17-05-2016

Aceptado: 18-11-2016