# DESARROLLO Y EVALUACION DE UNA ECUACION NIRS PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON EN RAICES DE PLANTAS FORESTALES

**G. Palacios [1], R.M. Navarro [1] y A. del Campo [2]**

**[1] Departamento de Ingeniería Forestal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048-14080 Córdoba.**

**[2]EGMASA**

RESUMEN

Los brinzales de especies forestales acumulan carbohidratos no estructurales en sus tejidos, los cuales son utilizados como sustancias de reserva de energía en el proceso de arraigo. Los fisiólogos forestales han destacado la importancia de estas sustancias, sugiriendo su valor como indicador de calidad de planta forestal.

En este trabajo se presentan los resultados de la determinación de carbohidratos no estructurales en raíz de varias especies forestales. Se ha obtenido una ecuación de calibración NIR, que permite una análisis rápido y preciso de almidón en raíz, lo que facilita el empleo de este atributo de calidad en viveros forestales.

PALABRAS CLAVES: carbohidratos, NIR, calidad de planta.

SUMMARY

Forest seedling all accumulates non-structural carbohydrates, which can be used as an energy store, in their vegetative tissues throughout their growth cycle. These reserves have been of considerable interest to plant physiologists who have argued about their relative importance and contribution to seedling quality.

In this paper we report the determination of non-structural carbohydrates content using NIR based tissue tests to rapidly analyse root samples; and we suggest an algorithm to measured amounts of non-structural carbohydrates as a useful indication of seedling quality.

KEY WORDS: carbohydrates, NIR, seedling quality.

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los atributos fisiológicos de calidad que más puede aportar acerca de la respuesta de la planta tras su establecimiento en campo, es el contenido radical en carbohidratos no estructurales (Puttonen, 1987; Rose, *et al.*, 1992). Son diversas las técnicas analíticas existentes para la determinación de este parámetro, fundamentadas en procesos químicos de tinción o de digestión enzimática (Rose *et al.*, 1991). La mayoría de estas técnicas ofrecen buenos resultados en análisis cuantitativo de carbohidratos; sin embargo, se trata de analíticas complejas, llevadas a cabo por laboratorios muy especializados y con unos costes bastante elevados, lo que las hace estar fuera del alcance de la mayoría de viveristas forestales.

La aparición de nuevas tecnologías de análisis de componentes estructurales ofrece la posibilidad de eliminar estas limitaciones. Entre estas tecnologías se encuentra la técnica de Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano, habitualmente conocida como técnica NIRS, basada en las relaciones existentes entre las características fisicoquímicas y/o sensoriales de los componentes de una determinada sustancia y la absorbancia que éstos generan a ciertas longitudes de onda en la región del infrarrojo cercano.

El análisis cualitativo NIRS más generalizado, consiste en la comparación del espectro producido por un producto del que desconocemos sus características, con una librería espectral o con un espectro estándar, representativo de un determinado producto, del que se tiene información sobre sus atributos cualitativos (Shenk y Westerhaus, 1995; Portal, 1999). El éxito del análisis cualitativo NIRS depende, en gran medida, de la estrategia quimiométrica utilizada y de la posibilidad de obtener muestras auténticas (Williams y Sobering, 1996).

Una *calibración universal* es aquella capaz de analizar y predecir con éxito entre el 90 y el 95 % del total de muestras de un determinado producto, siendo entonces considerada como muy estable (Shenk y Westerhaus, 1995). La obtención de una ecuación *universal* y estable de predicción del contenido de carbohidratos en raíces de planta forestal cultivada de vivero supondría un importante avance en el desarrollo de técnicas de evaluación de la calidad de planta forestal, tan importante para

el éxito de nuestras repoblaciones.

Dentro del sector forestal, las técnicas de análisis cualitativo NIRS, podrían encontrar numerosas aplicaciones de gran importancia como certificación de maderas, identificación de variedades y procedencias, comprobación de la pureza de productos forestales, que podrían resultar de gran utilidad dentro de la mayor parte de los sectores incluidos en la ciencia forestal. Sin embargo, han sido pocas las aplicaciones que de esta tecnología se han llevado a cabo dentro del sector forestal, y en particular, para los viveros forestales, su empleo es prácticamente nulo. El Departamento de Ingeniería Forestal junto al Servicio Centralizado NIRS-Banco de Muestras de la Universidad de Córdoba ha desarrollado una metodología que permite a cualquier viverista análisis de carbohidratos no estructurales en raíz.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

El proceso de preparación de muestras para la determinación de carbohidratos no estructurales en raíz se inicia con la separación de la parte radical del resto de la planta. Las muestras fueron conservadas, envueltas en papel de aluminio, en un congelador *ScienTemp LO-COLD FREEZER (Scientemp Corp. Adrian, Michigan, U.S.A.)* a una temperatura aproximada de -80ºC. Una vez las muestras iban a ser analizadas se procedía a su descongelación a temperatura ambiente (en torno a los 20-22ºC), para luego ser desecadas. El secado de las muestras se llevó a cabo en microondas (*Moulinex EM-S1050*). Para uniformizar la técnica de secado en microondas para las especies forestales estudiadas, se estableció un tiempo de secado de una hora a una potencia de 80 W, de forma que el elevado tiempo de secado asegura que tanto las raíces finas como las gruesas quedan completamente secas. Cada muestra fue molida en un molino ciclónico *Ika Labortechnik A10* (180W) hasta el menor tamaño de partícula posible, de forma que la muestra quedara homogeneizada, y éstas eran introducidas en bolsas de plástico y envasadas al vacío mediante una envasadora *Vaessen Schoemaker*.

Para la obtención de los espectros se utilizó un equipo monocromador de barrido continuo *FOSS-NIRSystem 6500 System I*, con módulo de giro y detector de reflexión, del Servicio Centralizado - Banco de muestras de la UCO. Este equipo cubre el rango completo VIS+NIR (bandas del visible y del infrarrojo cercano) de longitudes de onda comprendidas entre los 400 y los 2500 nm sin requerir un cambio de detectores. El equipo se encuentra conectado a un ordenador que dispone del software ISI NIRS 3 versión 3.11, perteneciente a Infrasoft International, el cual se ha empleado tanto para la recogida espectral como para todo el tratamiento quimiométrico de los datos espectrales y de referencia.

Para realizar el análisis NIRS la muestra se deposito en unas cápsulas de tipo estándar, con ventana de cuarzo de 36,25 mm. de diámetro. Debido a la escasa cantidad de muestra, fue necesario recurrir al uso de adaptadores metálicos que reducen la capacidad de la cápsula, y por ende el diámetro de la zona útil de recogida de espectros, que pasó de 36,25 mm. a 17,85 mm.

Para la recogida de espectros se escogieron al azar un total de 142 muestras, entre las que se incluyeron muestras de pino piñonero (*Pinus pinea* L.), pino carrasco (*Pinus halepensis* Mill.), pino negral (*Pinus pinaster* Ait.), pino salgareño (*Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii*), pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.), acebuche (*Olea europaea* L. var. s*ylvestris* Brot.), encina (*Quercus ilex* L.), alcornoque (*Quercus suber* L.) y algarrobo (*Ceratonia silicua* L.).

Con esta variabilidad de especies forestales representadas en el análisis, se pretende aumentar el rango de predicción de la ecuación de calibración para la determinación de carbohidratos en raíces, abarcando las especies que con mayor frecuencia son cultivadas en los viveros forestales. Como paso previo a la calibración y, debido a lo costoso y laborioso que resulta el análisis de carbohidratos por vía química, se procedió a la definición espectral de los colectivos de calibración para determinar la estructura y variabilidad del total de espectros recogidos, con el objetivo de seleccionar un grupo de muestras que fueran representativas del total de la población. Para ello, se realizó un análisis espectral mediante el cual se definieron los colectivos de calibración (Shenk y Westerhaus, 1991). El análisis espectral permitió comprobar la existencia de varias subpoblaciones perfectamente diferenciadas. Esta diferenciación espectral era *a priori* predecible, debido a la utilización de muestras de distintas especies forestales de las que cabe esperar ciertas diferencias interespecíficas en cuanto al contenido en carbohidratos, y por tanto en su respuesta espectral. Sin embargo, tras un primer análisis espectral, se decidió considerar el conjunto de la población como un único colectivo, pues la discriminación

entre las distintas subpoblaciones, suponía la obtención de una ecuación de calibración para cada uno de los colectivos, constituidos por un número reducido de espectros. De esta forma, y tras realizar el análisis espectral sin discriminar entre subpoblaciones espectrales, se escogieron un total de 41 muestras como representativas del conjunto de la población, las cuales fueron analizadas según el método químico de referencia y, posteriormente, utilizadas para la calibración de la ecuación de predicción del contenido en carbohidratos a partir del análisis NIRS.

El método analítico escogido para el análisis químico de referencia fue el desarrollado por Jones (Huber, 1989). Este procedimiento permite la extracción y separación de los azúcares solubles (hexosa y sacarosa) y el almidón del tejido de la planta. El método se basa en transformación, por vía enzimática, de la fructosa, la sacarosa y el almidón en unidades de glucosa que son medidas de forma indirecta, utilizando para ello un complejo enzimático que transforma el NADP en NADP(H) en cantidades proporcionales a los contenidos de glucosa de la muestra.

La calibración de una ecuación NIRS consiste en la obtención de una relación matemática adecuada entre la información espectral de la población recogida a través del análisis NIRS y los valores de la muestra seleccionada como representativa de la población total, obtenidos a través del método de referencia. En esta ocasión se escogió el método de regresión por mínimos cuadros parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1995; Portal, 1999).

Para realizar la validación de las ecuaciones de calibración obtenidas para cada parámetro considerado, se escogió una muestra al azar de cada especie forestal representada dentro del grupo de calibración, hasta hacer un total de 10 muestras. Las muestras seleccionadas fueron sometidas al tratamiento químico de referencia para la obtención de sus datos de laboratorio. Del mismo modo, se recogieron sus datos espectrales utilizando la misma metodología que para las muestras integrantes del colectivo de calibración.

## 3. RESULTADOS

La determinación del contenido en almidón de referencia se realizo sobre 41 muestras mediante una curva patrón obtenida del análisis colorimétrico de 7 muestras con concentraciones conocidas de almidón. De este modo, el valor del error típico de laboratorio (ETL) obtenido para la determinación de almidón fue de 3,14 mg de almidón/g de tejido radical, que puede considerarse como aceptable. En cuanto a la analítica de los azúcares solubles, glucosa y sacarosa, se obtuvieron ETL demasiado elevados como para asumir una cierta precisión del método (27,26 mg de glucosa/gr de tejido radical y 40,49 mg de sacarosa/gr de tejido radical), lo que obligó a descartar este tipo de determinaciones para la obtención de una ecuación NIRS de predicción del contenido radical en azúcares solubles.

La obtención de la ecuación de calibración se llevo a cabo utilizando el método de regresión de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS). El número máximo de términos de la regresión fue fijado en 7. Cabe destacar que la ecuación NIRS a desarrollar no presenta una ecuación matemática que pueda expresarse de forma escrita, sino que se trata de una aplicación interna del software ISI que utiliza los parámetros espectrales seleccionados durante el proceso de calibración (Tabla 1).

La muestra de validación se realizo utilizando 10 muestras que fueron sometidas al correspondiente método analítico de referencia, cuyos resultados fueron comparados con los predichos por la ecuación NIRS desarrollada, comprobando de esta forma la capacidad real de predicción de la ecuación. Entre las cuales se detectó un anómalo espectral correspondiente a la muestra de algarrobo **Cs TM Gr-1**, y un anómalo químico de encina con referencia **Qi FC Gr-3.** De este modo el colectivo de validación quedó formado por un total de 8 muestras. Los estadísticos obtenidos en el proceso de validación, junto con los valores límite propuestos por el software ISI, se exponen en la tabla 2.

Una vez calibrada y validada la ecuación de predicción NIRS, fue aplicada a las 142 muestras que forman el total de la población cuyos espectros habían sido recogidos. Los resultados han sido agrupados por géneros, según se muestra en la figura 1. Puede observarse como el género *Quercus* (media = 36,82 mg de almidón/g de tejido radical) se encuentra por encima del resto de géneros forestales considerados en cuanto al contenido de almidón en las raíces, siendo el género *Pinus* (media = 4,87 mg de almidón / g de tejido radical) el que presenta los valores más bajos.

## 4. DISCUSIÓN

La dificultad que entraña la determinación cuantitativa de los contenidos radicales en carbohidratos no estructurales ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores, pero sin duda, la determinación de los azúcares solubles es la medida cuantitativa más difícil de determinar, como así lo demuestra el gran número de métodos desarrollados con tal fin (Huber, 1989; Rose *et al*., 1991).

La ecuación *universal* NIRS desarrollada ha sido calibrada para un conjunto de especies forestales cultivadas en vivero, oscilando los valores medios de contenido de almidón en raíces entre el valor máximo del género *Quercus* (36,82 mg/g de tejido radical) y el mínimo del género *Pinus* (4,87 mg/g de tejido radical).

Shenk y Westerhaus (1995) indican que los estadísticos básicos para la evaluación de la precisión de una ecuación NIRS son el error típico de los residuales, calculado para el colectivo de validación cruzada (*ETVC*) y la $R^2$ para el grupo de validación. En este sentido, la ecuación NIRS para la determinación de almidón en raíces de plantas forestales calibrada en este trabajo, presenta una buena precisión, siendo el *ETVC* (4,533) de magnitud similar al *ETL* (3,14); además, y siguiendo a Portal (1999), ecuaciones con *ETVC* de una magnitud de 1 a 1,5 veces el *ETL*, como ocurre en este caso, presentan una precisión excelente. Del mismo modo, el coeficiente de determinación de la regresión en el grupo de validación ($R^2$) es de 0,92, indicando que el 92% de la variabilidad existente en los datos del colectivo de calibración puede ser explicada por el modelo de regresión, lo que supone una excelente capacidad de predicción en análisis cuantitativo (Shenk y Westerhaus, 1996).

Sin embargo, la obtención de los estadísticos, junto con sus límites de aceptación, más adecuados en la analítica NIRS para la determinación de almidón y otros carbohidratos no estructurales en tejidos de plantas forestales ha de ser el fruto de un continuo proceso de investigación que se espera comience con este trabajo. La consideración conjunta de un amplio grupo de especies forestales como integrantes del colectivo de calibración, ha podido mermar, en cierta medida, el potencial de predicción de la ecuación NIRS obtenida. En este sentido, la obtención de ecuaciones de predicción NIRS calibradas para especies forestales concretas constituye el siguiente paso en la mejora de la calidad de predicción de esta técnica analítica.

## 5. Bibliografía


HUBER, S., 1989. *Standard Operating Procedure for Extraction and Analysis of Soluble Sugars and Starch from Pine Tree Tissues.* USDA-ARS, Raleigh, NC.

PORTAL BASURCO, C.I. 1999. *Desarrollo de calibraciones NIRS en granos y harinas: efecto de la forma de presentación del producto y del tipo de interacción radiación-muestra.* Trabajo Profesional Fin de Carrera. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba.

PUTTONEN, P. 1986. *Carbohydrate reserves in Pinus sylvestris seedling needles as an attribute of seedling vigor.* Scandinavian Journal of Forest Researh 1(2): (181-193).

ROSE, R., ROSE, C.L., OMI, S.K., FORRY, K.R., DURALL, D.M., BIGG, W.L. 1991. *Starch Determination by Perchloric Acid vs Enzymes: Evaluating the Accuracy and Precision of Six Colorimetric Methods.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 39, nº 1: (2-11).

ROSE, R. 1992. *Root Growth Potential and Starch Differences in Seedlings of Six Families of Genetically Improved Loblolly Pine.* Forest Science, vol. 38, nº 2: (448-456).

ROSE, R., ATKINSON, 1992. *Nursery morphology and preliminary comparison of 3-year field perfomance of 1+0 and 2+0 bareroot Ponderosa pine seedlings.* Tree Planters Notes nº 43: (153-158).

SHENK, J.S., WESTERHAUS, M.O. 1991. *Population definition sample selection and calibration procedures for Near Infrared Spectra and modified partial least squares regresion.* Crops Science. Vol. 31: (469-474).

SHENK, J.S., WESTERHAUS, M.O. 1995. *Analisis of Agricultural and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy.* Monograph NIRSystems. Departament of Agronomy, Penn State University. Infrasoft International.

SHENK, J.S., WESTERHAUS, M.O. 1996. *Calibration the ISI way.* En *Near Infrared Spectroscopy. The Future Waves.* Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds). NIR Publicatios. Chichester. UK. Montreal, Canadá: (198-202).

WILLIAMS, P.C., SOBERING, D.C. 1996. *How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing Near Infrared calibration.* En *Near Infrared Spectroscopy. The Future Waves.* Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds). NIR Publicatios. Chichester. UK. Montreal, Canadá: (185-188).



**Agradecimientos**

Este trabajo ha sido posible gracias al INIA y la CICYT, a través de la convocatoria del Proyecto Estratégico Movilizador de I + D de apoyo a la forestación, mediante la financiación del proyecto *Definición del ciclo de producción de cuatro especies forestales (*Quercus ilex L.; Pinus pinea L.; Ceratonia siliqua L. y Olea europaea subsp. sylvestris) *de especial importancia en los programas de forestación en tierras agrarias en Andalucía* (FO96-006), junto al Servicio Centralizado NIRS-Banco de Muestras de la Universidad de Córdoba.

Tabla 1. Estadísticos de calibración obtenidos en la ecuación NIRS desarrollada.

| ESTADÍSTICOS | VALOR |
|---|---|
| Nº de muestras | 41 |
| Rango | 1,57 – 40,26 |
| Media | 24,269 |
| Desviación Típica | 13,05 |
| Nº de anómalos | 0 |
| Error Típico de Laboratorio | 3,14 |
| $R^2$ | 0,879 |
| Error de la regresión (ETC = ETVC) | 4,533 |
| Coeficiente de Variación | 18,678 |
| $R^2$ máximo estimado | 0,942 |

Tabla 2. Estadísticos obtenidos en la validación de la ecuación NIRS desarrollada

| ESTADÍSTICOS | VALOR | LÍMITES |
|---|---|---|
| Nº de muestras | 8 | - |
| Rango | 3,109 – 47,690 | - |
| Medias (Referencia – Predicción) | 17,146 – 17,084 | <20% de la diferencia |
| Desviación Típica | 17,092 –13,747 | <20% de la diferencia |
| Sesgo | 0,063 | 0,6 x ETC (2,720) |
| Error típico de la predicción (ETP) | 5,164 | - |
| Error Típico de Predicción (C) | 5,520 | <1,3 x ETC (5,893) |
| Pendiente | 1,192 | >0,90 |
| $R^2$ | 0,920 | >0,60 |
| Media H | 0,746 | <3 |
| RPD | 3,771 | ≥3 |
| RER | 9,835 | ≥10 |

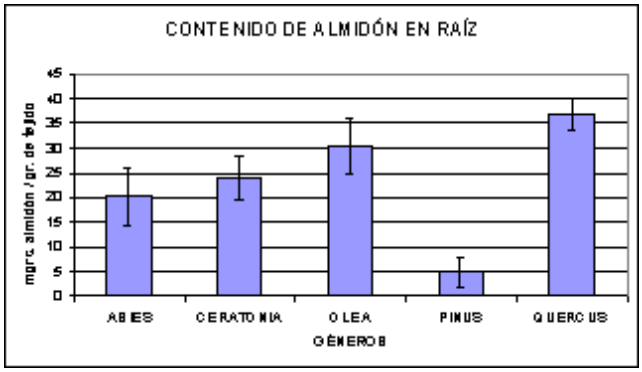


Figura 1.- Contenido de almidón en raíz agrupados por géneros forestales.