

Espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS). Su aplicación en análisis de jugos de caña de azúcar

Silvia Zossi*, Roberto M. Ruiz*, Natalia Sorol* y Marcos Sastre*

RESUMEN

La espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS) es una metodología instrumental que ha presentado un desarrollo creciente en los últimos años en la industria azucarera mundial. Se la utiliza tanto en centros de investigación como en diversas industrias, por ser una técnica no destructiva, rápida, que no emplea reactivos químicos y que requiere menos mano de obra que los métodos tradicionales empleados en el laboratorio. Por tal motivo, se decidió determinar para las condiciones de la industria azucarera de Tucumán (Argentina), los modelos de calibración más adecuados que permitan predecir los parámetros Brix y pol en jugo de caña de azúcar, mediante el empleo de un equipo NIRS, haciendo posible el reemplazo de los ensayos tradicionales de estos dos parámetros. Los resultados obtenidos de indicadores estadísticos, tales como error estándar de calibración (SEC), error estándar de predicción (SEP) y coeficiente de correlación de la calibración (R^2) fueron altamente satisfactorios en los parámetros evaluados y presentaron concordancia con los valores encontrados en la bibliografía mundial.

Palabras clave: calidad de jugos de caña, Brix y pol en jugos de caña, análisis estadístico.

ABSTRACT

Near Infrared Spectroscopy (NIRS). Its application in sugarcane juice analysis

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is an instrumental method which has been increasingly developing during the last few years in sugar industry worldwide. It is employed at research centres and in various industries as well, due to its advantages: it is a non-destructive technique, it is fast and does not require chemical reagents or as much workforce as required by traditional methods used in the laboratory. This work aims to determine the most suitable calibration models to predict Brix and pol in sugarcane juice by means of NIRS equipment, so as to replace traditional methods based on those two parameters. Results obtained from statistical indicators like standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP) and calibration correlation coefficient (R^2) were highly satisfactory for the evaluated parameters and showed agreement with values reported in existing bibliography.

Key words: sugar cane juice quality, Brix and pol in sugar cane juice, statistical analysis.

*Sección Química de Productos Agroindustriales, EEAOC. calidad@eeaac.org.ar

INTRODUCCIÓN

El empleo de la espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS) para análisis de distintos productos de las industrias de alimentos, química, bioquímica, ambiental, farmacéutica y médica, se viene desarrollando desde hace tres décadas.

La espectroscopia estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia. NIRS comprende el segmento de luz de longitudes de ondas entre 800 y 2600 nm del espectro electromagnético y analiza la absorción de energía en dicha región por los grupos funcionales de las moléculas de la muestra.

Su uso generalizado se debe principalmente a que permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos de multicomponentes en muestras, con un mínimo de preparación. Esta metodología, además, se caracteriza por ser no destructiva, rápida, no emplear reactivos químicos, disminuir el error del operador y requerir menos mano de obra que los métodos tradicionales empleados en el laboratorio. Sin embargo, se debe tener presente que es un método secundario, lo cual significa que debe ser calibrado contra otras metodologías y que sus respuestas no presentarán mayor exactitud que la de los métodos primarios empleados (Rein, 2007).

También se debe mencionar que presenta algunas desventajas, entre las cuales se destacan: el alto costo de los equipos, la competencia técnica que debe poseer el operador y el tiempo requerido para desarrollar una base de datos que permita obtener ecuaciones de calibración robustas, que originen predicciones confiables (White *et al.*, 2006).

La espectroscopia por infrarrojo cercano comenzó a emplearse en la industria azucarera mundial hace aproximadamente quince años en Estados Unidos (Johnson, 2000), en Sudáfrica (Schaffler y Meyer, 1996; Schaffler, 2000), en Australia (De Brujin, 1997) y en Colombia (Larrahondo *et al.*, 2001 a y b).

En 2005 la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC), en Tucumán, Argentina, comenzó la evaluación de dos equipos NIRS, destinados al análisis de muestras líquidas y sólidas provenientes del programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar, con la finalidad de evaluar la calidad de distintas variedades para realizar un proceso de selección varietal más eficiente.

El objetivo del presente trabajo es determinar los modelos de calibración más adecuados para los parámetros Brix % (contenido de sólidos solubles) y pol % (contenido de sacarosa aparente) en jugo, mediante el empleo del equipo NIRS para muestras líquidas, y poder así reemplazar las determinaciones tradicionales de estos dos parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante las zafas 2005, 2006, 2007 y 2008, fueron procesadas muestras de jugo primario de caña limpia, sin "trash", en el Laboratorio de Investigaciones Azucareras de la EEAOC. El jugo, proveniente de las distintas variedades evaluadas, fue extraído con un trapiche de planta piloto, con un molino de tres rodillos y un nivel de extracción comprendido entre 57% y 65%.

Del total de muestras procesadas, 6757 fueron analizadas en forma paralela por las técnicas tradicionales y por la metodología NIRS, para evaluar los tres parámetros estudiados: pol % jugo y Brix densimétrico y refractométrico.

Los métodos de referencia primarios empleados en nuestro laboratorio fueron:

- Pol % jugo: utilización de un polarímetro digital Optical Activity, modelo Polar 2001 (Chen, 1985).
- Brix refractométrico (BrixR): mediante un refractómetro digital marca Leica, modelo AR600 (Chen, 1985).
- Brix densimétrico (BrixD): mediante un brixómetro con termómetro incorporado (Chen, 1985).

Las muestras evaluadas son representativas de diversos factores de importancia para la caña cosechada, como por ejemplo el grado de maduración, el tipo de suelo, la variedad y las condiciones climáticas, los cuales inciden en la obtención de un modelo de calibración más robusto.

Todas las muestras fueron analizadas en el rango de longitudes de onda de 400-2500 nm en un instrumento monocromador Foss NIRSystem 6500 (Silver Spring, Maryland, USA) para muestras líquidas (detector de transmitancia). Se emplearon los softwares ISIScan 2.21 para la obtención de los espectros, y WinISI III para los modelos de calibración correspondientes.

Para el cálculo de los modelos de calibración, las muestras espectralmente parecidas (redundantes) fueron eliminadas por el software (4222 muestras). Para la validación, el software descartó aquellas cuyos espectros no estaban representados por las muestras empleadas en la calibración ("outliers", aproximadamente 135 para cada uno de los parámetros estudiados), utilizando el criterio de discriminación de muestras, basado en el análisis por componentes principales (PCA) (Craig *et al.*, 2004).

La expresión matemática de la ecuación de calibración puede escribirse como:

$$y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$$

Donde:

y representa el parámetro químico en estudio (pol %, BxR o BxD); **b₀** es la ordenada al origen; **b₁** a **b_n** son los coeficientes de regresión y **x₁** a **x_n**, las absorbancias a las diferentes longitudes de onda. El software no proporciona esta ecuación, sino que realiza los cálculos matriciales pertinentes, brindando solo los parámetros de las calibraciones obtenidas (coeficiente de correlación y errores).

El modelo matemático empleado es el de cuadrados parciales mínimos (PLS), el cual utiliza toda la información espectral y la incorpora en el modelo de calibración. También se utilizan la segunda derivada, para perfeccionar los espectros en el infrarrojo cercano, y el método estadístico de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1991). Asimismo, se lleva a cabo la corrección de los espectros mediante el procedimiento normal estándar o procedimiento de SNV (Barnes *et al.*, 1989), para el desarrollo de los modelos de calibración y predicción, ya que evita un sobre ajuste de los modelos por corrección de los efectos de tamaño de partícula, obteniéndose una escala común a todos los espectros.

Para evaluar la calibración, se determinan los siguientes parámetros estadísticos: error estándar de calibración (SEC), coeficiente de determinación en la calibración (R^2) y error estándar de validación cruzada (SECV).

El error estándar de calibración se calcula como (Cozzolino, 2002):

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - Y_i)^2}{n - t - 1}}$$

Donde:

y_i = valores de laboratorio usados en la calibración.

Y_i = valores predichos por la ecuación NIRS.

n = número de muestras.

t = número de componentes principales (PCR).

De igual manera, el software calcula el error estándar de validación cruzada.

La precisión de una calibración NIRS indica su efectividad en la estimación de los valores de un determinado parámetro en un conjunto de muestras.

Los modelos de calibración se seleccionaron buscando minimizar el error estándar de validación cruzada y el error estándar de calibración.

Para verificar la verdadera precisión de una calibración NIRS, se evaluó el comportamiento de las ecuaciones obtenidas sobre muestras diferentes a las usadas en la calibración, con variabilidad para el parámetro en estudio (valores altos, medios y bajos) y analizadas bajo las mismas condiciones. En este caso, para la validación se utilizaron 2000 muestras obtenidas durante la zafra 2008.

Para la validación se determinó el error estándar de predicción (SEP) según Valderrama *et al.* (2007):

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - Y_i)^2}{n - t - 1}}$$

Donde:

y_i = valores de laboratorio.

Y_i = valores predichos por la ecuación NIRS.

n = número de muestras.

Otra forma de evaluar las ecuaciones NIRS con relación a su precisión y exactitud, es a través de la relación entre el error estándar de validación cruzada y el desvío estándar del análisis químico (SECV/SD). Si esta relación es mayor a 0,33, los modelos presentan un bajo poder de predicción (Craig *et al.*, 2004).

Para analizar si la correlación existente entre los valores determinados por el laboratorio y aquellos obtenidos por espectroscopia NIRS era significativa, se empleó la Prueba F de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 6757 muestras usadas en la calibración, el software seleccionó 2335 muestras espectralmente diferentes para construir los modelos de calibración. En la Tabla 1 se muestran las estadísticas obtenidas luego del proceso de validación cruzada, a partir del software WinISI:

Donde:

n = número de muestras.

Media = valor promedio de los datos de referencia.

SD = desviación estándar de los valores de referencia.

R^2 = coeficiente de correlación de la calibración.

SEC = error estándar de calibración.

SECV = error estándar de validación cruzada.

La calibración de todos los parámetros fue adecuada, lo que se refleja en un bajo error estándar de calibración y un significativo coeficiente de correlación. También se puede inferir que existe una aceptable predicción, dado que la relación entre el error estándar de validación cruzada y el desvío estándar del análisis químico es menor a 0,33 (Craig *et al.*, 2004).

Para validar las ecuaciones de calibración obtenidas, se emplearon 2000 muestras analizadas durante la zafra 2008; las estadísticas de estas se muestran en la Tabla 2:

Tabla 1. Parámetros estadísticos de muestras seleccionadas para la calibración.

Parámetro	n	Media	SD	Rango	R^2	SEC	SECV	SECV/SD
Pol %	2165	15,51	2,35	8,47-22,55	0,987	0,268	0,287	0,12
BxR	2109	18,34	2,08	12,09-24,60	0,986	0,246	0,253	0,12
BxD	2158	18,19	1,94	12,38-24,02	0,987	0,226	0,245	0,13

Tabla 2. Parámetros estadísticos de muestras seleccionadas para la validación de la metodología NIRS.

Parámetro	R ²	SEP	F	p
Pol %	0,988	0,231	158010	<0,001
BxR	0,987	0,213	158642	<0,001
BxD	0,981	0,243	111609	<0,001

Donde:

p = probabilidad.

R² = coeficiente de correlación de la calibración.

SEP = error estándar de predicción. Corresponde a la desviación estándar de los residuales con una probabilidad de 67%. Para un determinado grupo de muestras puede esperarse que en un 95% de ellas, el valor del parámetro determinado por NIRS no difiera del valor de laboratorio en más de dos veces de SEP.

F = coeficiente de Fisher.

Se analizaron estadísticamente mediante la prueba F de Fisher estas correlaciones y se encontró que son altamente significativas ($p < 0,001$), como puede observarse en la Tabla 2.

En las Figuras 1, 2 y 3, se muestra la relación entre los datos obtenidos por química húmeda y la predicción NIRS para 2000 muestras utilizadas en la validación.

Como se puede observar en las curvas de calibración, los coeficientes de correlación son significativos con errores aceptables, lo que nos indica una buena respuesta de esta metodología en cuanto a repetibilidad y reproducibilidad para los parámetros estudiados.

Los valores determinados en el Laboratorio de Investigaciones Azucareras de la EEAOC presentan resultados concordantes con los obtenidos en otros países. En la Tabla 3 se muestran los parámetros de validación obtenidos en Australia para esta metodología (Schaffler, 2001) y en la Tabla 4 los determinados en el Ingenio San Pantaleón en Guatemala (Hernández *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos empleando la espectroscopia de infrarrojo cercano en estos primeros cuatro años de desarrollo son muy alentadores, ya que hicieron posible reemplazar las determinaciones convencionales de pol % jugo y Brix % jugo (BxR y BxD) en las evaluaciones de calidad de caña de azúcar que realiza el Laboratorio de la Sección Química de la EEAOC. Al ser una metodología más rápida, al no insumir productos químicos, al requerir menos mano de obra y tener una confiabilidad analítica aceptable, esta irá reemplazando con el tiempo a las determinaciones convencionales.

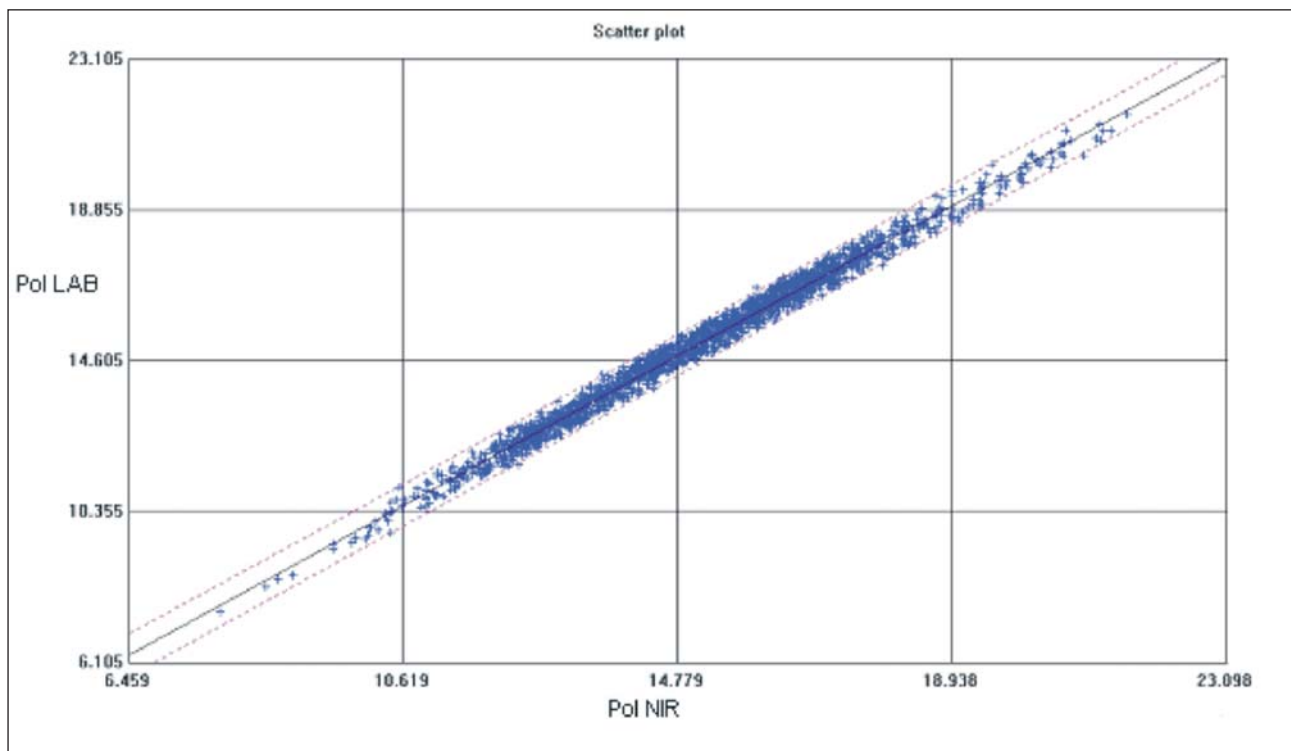


Figura 1. Validación en laboratorio (LAB) vs. NIRS para pol % en jugo (2000 muestras).

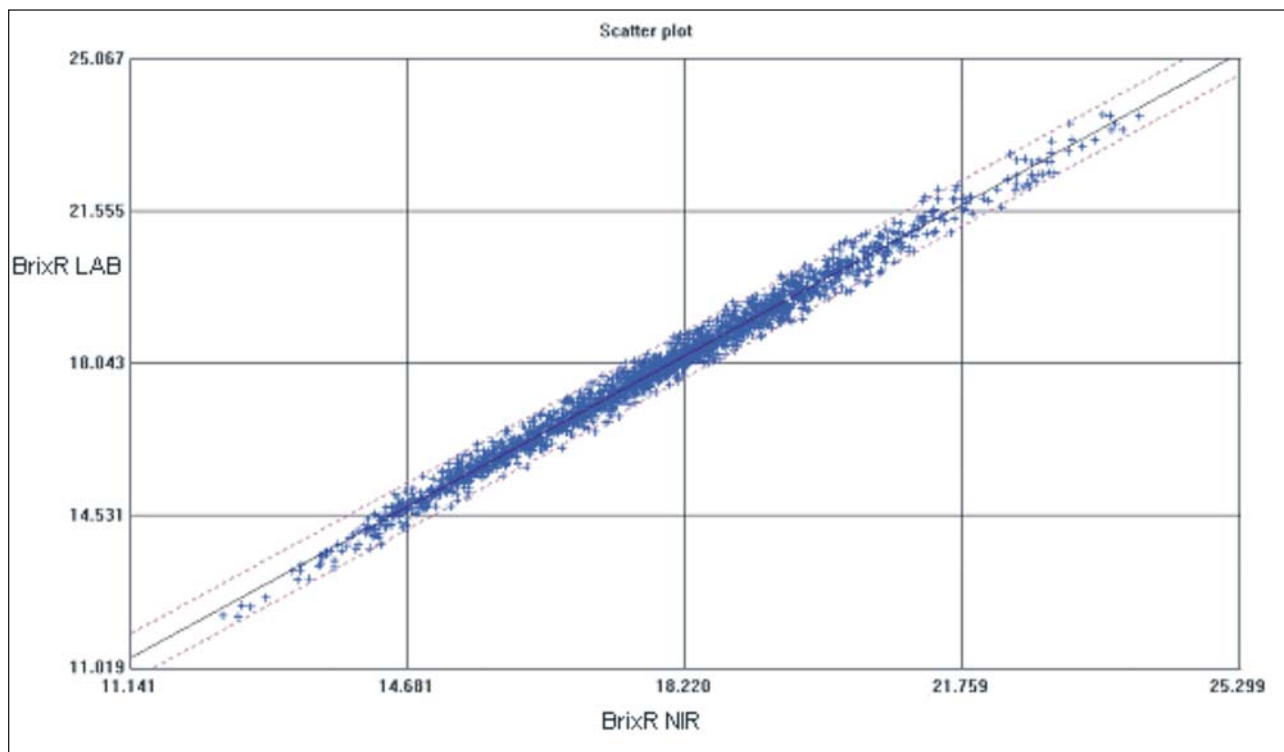


Figura 2. Validación en laboratorio (LAB) vs. NIRS para BxR % en jugo (2000 muestras).

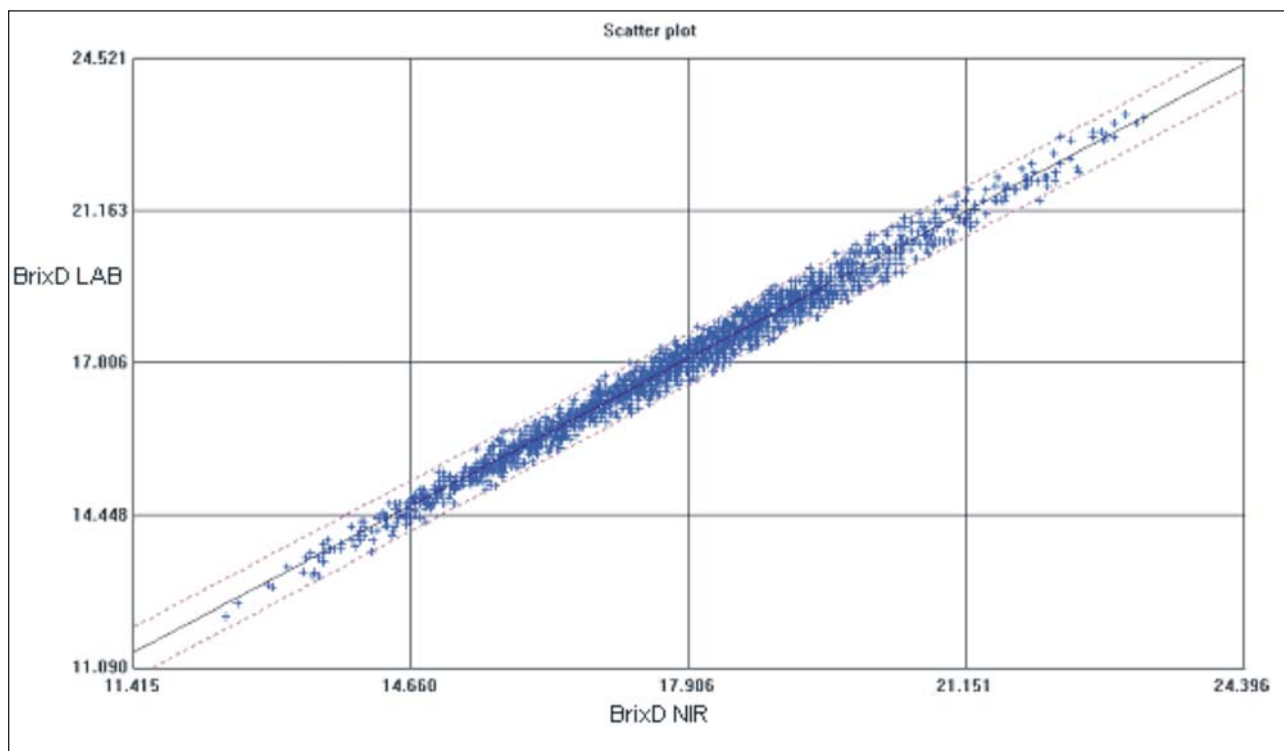


Figura 3. Validación en laboratorio (LAB) vs. NIRS para BxD % en jugo (2000 muestras).

Los modelos de calibración obtenidos en el mencionado laboratorio establecieron resultados comparables con los

obtenidos en otros países, si bien estos aún se podrán mejorar cuando se disponga de una base de datos analíticos mayor.

Tabla 3. Resultados obtenidos en Sugar Milling Research Institute, Australia.

	N	SECV	R ²	Rango
Pol %	1650	0,507	0,982	7,87 – 22,83
Brix %	1737	0,473	0,983	11,09 – 25,41

Tabla 4. Resultados obtenidos en el ingenio San Pantaleón, Guatemala.

	N	SECV	R ²	Rango
Pol %	185	0,2	0,994	9,75 – 25,01
Brix %	185	0,2	0,993	11,95 – 28,58

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Barnes, R. J.; M. S. Dhanoa and S. J. Lister. 1989.** Standard normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 43: 772-777.
- Chen, J. C. P. 1985.** Cane Sugar Handbook. 11. ed. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Cozzolino, D. 2002.** Uso de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia* 6 (2): 25-32.
- Craig, A. R.; J. Workman Jr. and J. B. Reeves III. 2004.** Near Infrared Spectroscopy in Agriculture. ASA – CSSA – SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- De Brujin, J. M. 1997.** Development and application of automatic NIRS in factory laboratories. *Zuckerind.* 11: 878 – 882.
- Hernández, M.; N. Monroy y E. Rodas. 2008.** Análisis de fibra de caña con tecnología NIR. Trabajo presentado en el Congreso de Técnicos Azucareros de Latinoamérica y el Caribe, 7, Guatemala. [En línea] Disponible en <http://www.atagua.org/index.php?showpage> (consultado 17 septiembre 2008).
- Johnson, T. P. 2000.** Cane sugar analysis by near infrared (NIR) to determine grower payment. *Int. Sug. J.* 102 (1223): 603-609.
- Larrahondo, J. E.; F. Palau; A. Navarrete and C. Ramirez. 2001a.** Applications of near infrared spectroscopy in the sugarcane industry of Colombia. En: Proc. ISSCT Congress, 24, Brisbane, Australia, pp. 163–165.
- Larrahondo, J. E.; F. Palau; A. Navarrete and C. Ramirez. 2001b.** The potential of near infrared spectroscopy in the sugarcane industry of Colombia. En: Proc. ISSCT Congress, 24, Brisbane, Australia, pp. 17–21.
- Rein, P. 2007.** Cane sugar engineering. Ed. Bartens, Berlin, Germany.
- Schaffler, K. J. 2000.** Trials and tribulations of implementing NIRS for raw sugar factory liquors. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 74, Durban, South Africa, pp. 361 – 368.
- Schaffler, K. J. 2001.** Automated routine analysis of quality parameters in sugar cane juices and molasses by NIR. En: Proc. ISSCT Congress, 24, Brisbane, Australia, pp. 143–146.
- Schaffler, K. J. and J. H. Meyer. 1996.** Near infrared analysis of shredded cane: a potential replacement for direct analysis of cane. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 70, Durban, South Africa, pp. 131-139.
- Shenk, J. S. and M. O. Westerhaus. 1991.** New standardization and calibration procedures for NIRS analytical systems. *Crop Sci.*, 31: 1694 – 1696.
- Valderrama, P. W.; B. Braga and R. J. Poppi. 2007.** Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2): 259-266.
- White, B. E.; L. S. Polanco and Ch. Verret. 2006.** Utilization of NIR spectroscopy for factory control. En: Proc. Sugar Processing Research Conference, Frontiers in Sugar Processing, Aguas de Sao Pedro, Brazil, pp. 230–244.