

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“MODELOS DE CALIBRACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA
Y FENÓLICOS TOTALES USANDO ESPECTROSCOPIA DEL
INFRARROJO MEDIO EN TARWI (*Lupinus mutabilis*)”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

ZULY DEL PILAR SABELINO FRANCA

LIMA – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“MODELOS DE CALIBRACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA Y
FENÓLICOS TOTALES USANDO ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO
MEDIO EN TARWI (*Lupinus mutabilis*)”**

Presentado por:

ZULY DEL PILAR SABELINO FRANCIA

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Carlos Nuñez Saavedra
PRESIDENTE

PhD. Ritva Repo de Carrasco
MIEMBRO

Mg. Sc. Carlos Elías Peñafiel
MIEMBRO

PhD. Patricia Glorio Paulet
ASESORA

Lima- Perú

2020

DEDICATORIA

A Dios, quien dirige mi camino.

A mi familia por impulsarme a seguir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por lo que me ha enseñado en este tiempo, por darme fortaleza y paciencia.
- A mis padres, hermanos y abuela Rosa por su amor y apoyo constante.
- A mi asesora PhD. Patricia Glorio, por el apoyo incondicional, los valiosos conocimientos compartidos, las facilidades brindadas, por su paciencia y dedicación en cada etapa de esta investigación. Muchas gracias por la confianza puesta en mí.
- Al PhD Luis Rodríguez-Saona por su asesoramiento y apoyo para la realización del presente estudio. Por sus palabras de ánimo y confianza puesta en mí.
- A mis jurados el Mg.Sc. Carlos Elías, la PhD Ritva Repo y el Dr Carlos Nuñez que con sus observaciones, ayudaron a enriquecer la presente tesis.
- A los técnicos de la FIAL, por facilitarme el uso de los laboratorios y compartir sus conocimientos. De manera especial, a Sonia y a la Sra Deifilia por su amistad y sus palabras de ánimo. Les agradezco de corazón todo su apoyo.
- A mis estimados amigos de la UNALM, con los cuales compartí gratos momentos, especialmente a Diana, Miguel, Rocío y Dominic, por brindarme su apoyo incondicional.
- A todas aquellas personas que de alguna manera apoyaron el desarrollo de la presente tesis como Eudes, por los conocimientos compartidos; a Almendra, Yesmina y Reina por apoyarme en los laboratorios.
- Al PNIA, por el financiamiento para el desarrollo de la investigación como parte del proyecto “Investigación Biotecnológica de la cadena productiva del tarwi mediante la Innovación Fitotécnica de 30 ecotipos, procesamiento integral del grano y validación de métodos de análisis cualitativo y cuantitativo de alcaloides y proteínas” (N° 022-2015-INIA-PNIA). Al equipo responsable del proyecto, el Departamento de Leguminosas por gestionar las facilidades para el desarrollo de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. TARWI	3
2.1.1. ASPECTOS GENERALES	3
2.1.2. ECOTIPO.....	5
2.1.3. PRODUCCIÓN DE TARWI	6
2.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TARWI.....	7
2.1.5. DESAMARGADO DE TARWI	9
2.2. PROTEINAS.....	11
2.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.....	11
2.2.2. PROTEÍNAS EN LUPINO.....	11
2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS	13
2.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN	13
2.3.2. FUNCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	14
2.3.3. PROPIEDADES Y BENEFICIOS A LA SALUD	16
2.3.4. COMPUESTOS FENÓLICOS EN LUPINO	17
2.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	18
2.4.1. DESARROLLO HISTÓRICO.....	18
2.4.2. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO	19
2.4.3. ESPECTROSCOPIA	20
2.4.4. ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO MEDIO	21
2.4.5. ASIGNACIÓN DE BANDAS ESPECTRALES DEL INFRARROJO MEDIO	24
2.4.6. INSTRUMENTACIÓN PARA ESPECTROMETRÍA INFRARROJA	28

2.4.7. VENTAJAS DEL ESPECTRÓMETRO DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	32
2.4.8. TÉCNICAS DE MUESTREO	33
2.5. QUIMIOMETRÍA.....	34
2.5.1. CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE	35
2.5.2. ETAPAS PARA CONSTRUIR UN MODELO DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE	36
2.5.3. REGRESIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)	37
2.5.4. PRE TRATAMIENTO DE LOS ESPECTROS	41
2.5.5. EVALUACIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN.....	42
III. METODOLOGÍA.....	45
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	45
3.2. MATERIA PRIMA	45
3.2.3. EQUIPOS.....	46
3.2.4. REACTIVOS	47
3.2.5. SOFTWARES	47
3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	48
3.3.1. CONTENIDO DE HUMEDAD.....	48
3.3.2. CONTENIDO DE PROTEÍNA	48
3.3.3. CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	48
3.3.4. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO	49
3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	49
3.4.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	49
3.4.2. DESARROLLO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN	52
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1. CONTENIDO DE PROTEINA EN TARWI.....	58
4.2. CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI.....	60

4.3.	EFFECTO DEL DESAMARGADO EN EL CONTENIDO DE PROTEINA	63
4.4.	ESPECTRO MIR DE TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	69
4.4.1.	BANDAS MIR ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS	72
4.4.2.	BANDAS MIR ASOCIADAS A LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	73
4.5.	CALIBRACIÓN PLS DE TARWI	73
4.5.1.	CALIBRACIÓN PLS DE PROTEÍNA	74
4.5.2.	CALIBRACIÓN PLS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	77
V.	CONCLUSIONES	82
VI.	RECOMENDACIONES.....	83
VII.	BIBLIOGRAFÍA	84
VIII.	ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución del color secundario del grano de tarwi	4
Tabla 2: Clasificación taxonómica del tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>)	5
Tabla 3: Algunos ecotipos de tarwi en el Perú	6
Tabla 4: Composición proximal del tarwi	9
Tabla 5: Contenido de aminoácidos del tarwi	12
Tabla 6: Contenido de fenólicos totales en cultivares de tarwi de Perú	17
Tabla 7: Regiones del Infrarrojo	23
Tabla 8: Bandas de amidas en la región del infrarrojo medio	27
Tabla 9: Materiales usados como cristales de ATR y sus propiedades	34
Tabla 10: Estadísticos evaluados para la selección de modelos MIR	53
Tabla 11: Esquema del diseño experimental para la calibración de proteína y compuestos fenólicos totales	55
Tabla 12: Matriz de consistencia	56
Tabla 13: Contenido de proteínas y compuestos fenólicos en tarwi	65
Tabla 14: Bandas (cm ⁻¹) en el espectro MIR del tarwi (<i>L. mutabilis</i>)	71
Tabla 15: Resumen del análisis estadístico multivariado para proteína en tarwi	75
Tabla 16: Resumen del análisis estadístico multivariado para fenólicos totales	79
Tabla 17: Composición de las soluciones para la curva estándar de fenólicos totales en micropozos	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales regiones de tarwi en el Perú	7
Figura 2: Producción de tarwi en el Perú	8
Figura 3: Formación del enlace peptídico	12
Figura 4: Estructura química del fenol	13
Figura 5: Clasificación de las familias de compuestos fenólicos	15
Figura 6: Regiones del espectro electromagnético	22
Figura 7: Tipos de transiciones de las bandas de absorción en el infrarrojo	24
Figura 8: Tipos de vibraciones moleculares por absorción infrarroja	25
Figura 9: Espectro en el infrarrojo medio de la de las bandas de la amida I, II y III	26
Figura 10: Diagrama del instrumento para un espectrómetro con transformada de Fourier	30
Figura 11: Esquema de la aplicación de la transformada de Fourier (FT) en la obtención de un espectro	31
Figura 12: Diagrama de la técnica de muestreo por reflectancia total atenuada.	34
Figura 13: Representación gráfica de las relaciones del modelo PLS	40
Figura 14: Error estándar de validación cruzada vs el número de factores de un modelo ..	41
Figura 15: Mejora de la resolución de un contorno de banda complejo de bandas infrarrojas superpuestas	43
Figura 16: Flujo de operaciones para la obtención de tarwi molido parcialmente desgrasado	51
Figura 17: Protocolo para el desarrollo de la calibración del contenido de proteínas en tarwi	53
Figura 18: Protocolo para el desarrollo de la calibración del contenido de fenólicos totales en tarwi	54

Figura 19: Histograma del contenido de proteínas en tarwi amargo (52 ecotipos)	59
Figura 20: Histograma del contenido de proteínas en tarwi desamargado (52 ecotipos) ...	61
Figura 21: Histograma del contenido fenólico en tarwi amargo (52 ecotipos)	62
Figura 22: Histograma del contenido fenólico en tarwi desamargado (52 ecotipos)	64
Figura 23: Contenido de proteínas (% b.s.) en tarwi	67
Figura 24: Contenido de fenólicos totales (mg EAG /100 g b.s.) en tarwi	68
Figura 25: Espectro FT - MIR del tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>)	71
Figura 26: Vector de Regresión de la calibración de proteína en tarwi	75
Figura 27: Predicción del contenido de proteína de tarwi.....	76
Figura 28: Vector de Regresión de la calibración de fenólicos totales en tarwi	78
Figura 29: Regresión PLS del contenido de fenólicos totales de 37 ecotipos de tarwi amargo	80
Figura 30: Regresión PLS del contenido de fenólicos totales de 40 ecotipos de tarwi desamargado	81
Figura 31: Equipo portátil ATR-FTIR	109

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CARACTERÍSTICAS DE 52 ECOTIPOS DE TARWI	96
ANEXO 2: DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	103
ANEXO 3: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO.....	105
ANEXO 4: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN TARWI DESAMARGADO.....	105
ANEXO 5: CONTENIDO DE HUMEDAD DE LOS 52 ECOTIPOS DE TARWI.....	106
ANEXO 6: PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE GRASA EN TARWI MOLIDO.....	108
ANEXO 7: MEDICIÓN EN EL INFRARROJO CON EL ESPECTRÓMETRO PORTÁTIL (TRU DEFENDER FT)	109
ANEXO 8: CONTENIDO PROTEICO EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	111
ANEXO 9: CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	113
ANEXO 10: VECTOR DE REGRESIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	115
ANEXO 11: NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES PARA EL MODELO PLSR DE PROTEINA EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	117
ANEXO 12: PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	118
ANEXO 13: VECTOR DE REGRESIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO.....	119
ANEXO 14: VECTOR DE REGRESIÓN PARA EL MODELO DE CALIBRACIÓN DEL CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI DESAMARGADO	121
ANEXO 15: NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES PARA EL MODELO PLSR DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN TARWI AMARGO	123

ANEXO 16: ECOTIPOS AMARGOS PARA LA CALIBRACIÓN DE FENÓLICOS TOTALES	124
ANEXO 17: NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES PARA EL MODELO PLSR DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN TARWI DESAMARGADO	125
ANEXO 18: ECOTIPOS DESAMARGADOS PARA LA CALIBRACIÓN DE FENÓLICOS TOTALES	126

RESUMEN

La espectroscopia infrarroja media es una técnica instrumental que proporciona un análisis rápido y de bajo costo, empleado para identificar y cuantificar diversos compuestos. El objetivo del presente estudio fue desarrollar modelos de calibración que estimen el contenido de proteínas y de compuestos fenólicos totales en 52 ecotipos peruanos de tarwi (*Lupinus mutabilis*) amargo y desamargado utilizando espectroscopia del infrarrojo medio (4000 - 700 cm^{-1}) y análisis multivariado (Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales, PLSR). Los porcentajes de proteína en tarwi desamargado (40.49 - 55.83 %) fueron superiores al del tarwi amargo (34.46 - 43.76 %). Respecto al contenido de compuestos fenólicos, hubo una pérdida considerable de estos en el tarwi desamargado (94.45 - 204.67 mg equivalentes de ácido gálico EAG /100 g) en comparación al amargo (428.49 - 526.8 mg EAG /100 g). Los modelos se procesaron empleando la segunda derivada. Las bandas representativas del modelo para proteínas están centradas en 1507 y 1550 cm^{-1} (amida II) y 1691 cm^{-1} (amida I). La presencia de compuestos fenólicos se relacionó a la vibración del anillo aromático (1450 cm^{-1}) y de enlaces correspondientes a flavonoides (1690 cm^{-1}). El modelo PLSR para proteína de los 52 ecotipos, amargos y desamargados, indicó una correlación de calibración de 0.95 y validación cruzada de 0.95, un SECV (Error Estándar de Validación Cruzada) de 2.17 % y SEC (Error Estándar de Calibración) de 2.11 %. Para determinar el contenido de fenólicos totales, se emplearon modelos independientes de tarwi amargo y desamargado que consideraron 37 y 40 ecotipos, respectivamente. Ambos modelos de fenólicos obtuvieron altos valores de error (entre 10 y 17 mg EAG / 100 g) y valores medios de r^2 (< 0.83). Finalmente, los parámetros indican que el modelo de proteína es confiable; pero los modelos sobre el contenido fenólico alcanzaron parámetros de valor medio que brinda solo contenidos aproximados.

Palabras claves: tarwi, proteínas, compuestos fenólicos, espectroscopia MIR regresión PLS.

ABSTRACT

Infrared spectroscopy is an instrumental technique that provides a faster and lower cost analysis, being useful for the identification and quantification of different compounds. The objective of the present study was to develop calibration models to estimate total protein and phenolic content in 52 Peruvian bitter and debittered ecotypes of tarwi (*Lupinus mutabilis*) using medium infrared spectroscopy (4000-700 cm^{-1}) and multivariate analysis (Regression of Partial Least Squares, PLSR). The percentage of protein in debittered tarwi (40.49 - 55.83 %) were higher than in bitter tarwi (34.46 - 43.76 %). Regarding the phenolic compounds content, there was a considerable loss of these in debittered tarwi (94.45-204.67 mg EAG / 100 g) compared to the bitter tarwi (428.49-526.8 mg EAG/100 g). The calibration models were pre-processed by the second derivative. The representative bands of the model for protein content was centered in 1507 y 1550 cm^{-1} (amide II) and 1691 cm^{-1} (amide I). The presence of phenolic compounds was related to the vibration of the aromatic ring (1450 cm^{-1}) and of bonds corresponding to flavonoids (1690 cm^{-1}). The PLSR model for protein of the 52 ecotypes, bitter and debittered, indicated a calibration correlation of 0.95 and cross validation of 0.95, a SECV (Standard Error of Cross Validation) of 2.17 % and SEC (Standard Error of Calibration) of 2.11%. To determine the total phenolic content, independent models of bitter and debittered tarwi were used, which considered 37 and 40 ecotypes, respectively. Both phenolic models obtained high error values (between 10 and 17 mg EAG / 100 g) and mean values of r^2 (< 0.83). Finally, the parameters indicate that the protein model indicates a prediction of high reliability; however, the phenolic content models reached parameters of average value that indicates only approximate contents.

Keywords: tarwi, protein, phenolic compounds, MIR spectroscopy, PLS regression.

I. INTRODUCCIÓN

Un gran atributo de las leguminosas es su alto valor proteico, de entre todas resalta el tarwi (*Lupinus mutabilis*) por su contenido elevado de este macronutriente (41 - 51 %), superando incluso al de la soya (34 %) (Jacobsen & Mujica, 2006). A su vez, el tarwi es una fuente importante de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (Da Silva *et al.*, 1994; Gálvez *et al.*, 2009) que son importantes por sus propiedades antioxidantes (Porras & López, 2009). Diversos estudios indican que el tarwi es un alimento excepcionalmente nutritivo. No obstante, el mayor inconveniente para su consumo es la presencia de alcaloides, por lo que requiere pasar por un proceso de desamargado para ser de consumo humano.

El tarwi se originó a lo largo de los Andes, actualmente se cultiva predominantemente en Ecuador, Perú y Bolivia (Chirinos, 2014), habiendo potencial de desarrollo agronómico y agroindustrial en nuestro país. Por ello, ha surgido un gran interés en investigar y desarrollar productos en base a tarwi, y que requerirá el control de procesos como el del desamargado.

Entonces, surge como alternativa una moderna herramienta analítica: la espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FTIR) que muestra mayor rapidez de análisis y menor costo (Hesse *et al.*, 2005) frente a técnicas como la cromatografía. Además, Nielsen (2008) asegura que la espectroscopia en el infrarrojo medio es muy útil para analizar cualitativa y cuantitativamente diferentes alimentos y bebidas como vinos y aceites.

Junto a la espectroscopia, es necesario emplear también ciertas técnicas estadísticas como la calibración multivariable para el análisis cuantitativo, siendo la más empleada la regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR), la que relaciona la concentración de algún componente con el espectro (Araujo *et al.*, 2005) de un alimento, expresado en un modelo quimiométrico.

Por tanto, la presente investigación se planteó sobre los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Desarrollar 3 modelos de calibración para determinar el contenido proteico y fenólico en 52 ecotipos de tarwi empleando espectroscopia infrarroja media y la regresión de Mínimos Cuadrados Parciales.

-

Objetivos Específicos:

- Cuantificar el contenido de proteínas y de compuestos fenólicos totales en 52 ecotipos de tarwi amargo y desamargado por el método Kjeldahl y Folin Ciolcateau.

- Identificar las bandas relacionadas a proteínas y compuestos fenólicos totales en el espectro infrarrojo del tarwi amargo y desamargado.

- Establecer un modelo de calibración al relacionar el contenido proteico con los espectros del tarwi amargo y desamargado.

- Establecer dos modelos de calibración al relacionar el contenido de los compuestos fenólicos totales con los espectros del tarwi amargo y del desamargado.

- Validar la solidez del modelo quimiométrico mediante parámetros estadísticos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. TARWI

2.1.1. ASPECTOS GENERALES

El tarwi (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa almidonosa originaria de los Andes. Sus granos son de consumo humano. Es conocido como “chocho” en Ecuador y en el norte de Perú; “tarwi” en el centro del Perú; “tauri” en el sur del Perú y Bolivia (“chuchus” en Cochabamba, Bolivia) (Jacobsen & Mujica, 2006).

Los cultivos de tarwi crecen en zonas templadas y frías del Altiplano boliviano-peruano y Ecuador, en valles interandinos de 2.000 - 3.850 m.s.n.m., aunque algunos estudios han obtenido buenos rendimientos a nivel del mar (Jacobsen & Mujica, 2006). Así mismo, su cultivo requiere entre 350 - 800 mm de precipitación al año, por lo que es exclusivo en zonas secas pues es susceptible al exceso de humedad, y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado. Durante la formación del racimo y madurez no puede soportar las heladas, aunque algunos ecotipos a orillas del lago Titicaca si han presentado mayor resistencia al frío. Prefiere suelos francos y franco - arenosos, un buen drenaje y un pH entre 5 y 7 (Mayhua, 2012).







La coloración de la flor cambia desde cuando se empieza a formar hasta cuando madura de azul claro hasta uno muy intenso, por ello deriva su nombre científico “*mutabilis*”, es decir que varía. Comúnmente, los colores son distintos tonos de azul y púrpura (Tapia, 2000).

En una vaina de entre 5 a 12 cm se llega a encontrar un número variable de semillas y de diversas formas (redonda, ovalada a casi cuadrangular), que alcanzan a medir entre 0,5 a 1,5

cm cada una (Jacobson & Mujica, 2006). Según Tapia (2000), un kilogramo contiene 3500 a 5000 semillas, dependiendo del tamaño y el peso de estas. La variación en tamaño depende tanto de las condiciones de crecimiento como del ecotipo o variedad.

El grano de tarwi presenta pigmentación que van desde blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón, negro y hasta combinados, con formas como marmoleado, media luna, ceja, salpicado y combinación (Gross, 1982; citado por Tapia, 2000) de estas como se observa en la Tabla 1. Ortega *et al.* (2010) indica que el color amarillo de la semilla es debido al contenido de grasas y carotenoides. Además, estima que las semillas de tarwi cuentan con un tegumento de espesor de 0.20 mm, por tanto, es el cotiledón la parte más representativa con un 84.66% del peso total y solo un 10.74 % de la semilla se compone por un tegumento blanco de textura plástica y resistente.

Tabla 1: Distribución del color secundario del grano de tarwi

DISTRIBUCIÓN	VALORACIÓN	MUESTRA
Ausente	0	
Media luna	1	
En ceja	2	
En lomo	3	
Salpicada	4	
En bigote	5	
Veteada	6	
En media luna veteada	7	
En ceja veteada	8	
Manchada	9	

FUENTE: NTE INEN 2 389 (2004), citado por Baldeón (2012)

Garay (2015) clasifica taxonómicamente al tarwi como se indica la Tabla 2.

Tabla 2: Clasificación taxonómica del tarwi (*Lupinus mutabilis*)

CLASIFICACIÓN	
Nombre Científico	<i>Lupinus mutabilis</i>
División	Espermatofitos
Sub-División	Angiosperma
Clase	Dicotiledóneas
Sub Clase	Arquiclamideas
Orden	Rosales
Familia	Papilionoideas
Sub – Familia	Genisteas
Género	<i>Lupinus</i>
Especie	<i>Mutabilis</i>

FUENTE: Garay (2015)

2.1.2. ECOTIPO

Las especies ecológicas se denominan comúnmente “ecotipos” o “ecospecies”. Estos han surgido por las diferentes combinaciones de factores ambientales y bióticos y, a través de la selección natural. Un ecotipo es una población o individuos de una especie que son genéticamente diferentes. Los diferentes ecotipos de una especie en particular, pueden diferir en sus requisitos edáficos, microclimáticos o bióticos (Pushkar, 2001).

En el tarwi, los diferentes ecotipos se expresan en factores como el período vegetativo, contenido de alcaloides, tolerancia a enfermedades, rendimiento y valor nutritivo. En la Tabla 3 se indica una lista de ecotipos de tarwi en el Perú, los cuales han sido conducidos en diferentes ambientes del Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Camarena *et al.*, 2012).

Cabe indicar que una variedad hace referencia también a un ecotipo considerando sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas que son específicas, como la resistencia a enfermedades y el rendimiento (Harper *et al.*, 2007; MINAGRI, 2008).

Tabla 3: Algunos ecotipos de tarwi en el Perú

VARIEDAD	LOCALIDAD ORIGEN
Altagracia	Huamachuco, La Libertad
Puno	Puno
H6	Huancayo
Andenes 80	Camaní
SCG – 09	Cusco
Yunguyo	ILLPA
Blanco Huamachuco	La Libertad
Blanco Cajamarca	Cajamarca
Tauribamba – Sihuas	Sihuas, Ancash
Huallanca	Huallanca, Ancash
SGC-22	San Juan de Yanamuclo
Tarwi PLGO 13-1 (UNALM 13)	Marcará, Ancash
Chacas	Chacas, Ancash

FUENTE: Camarena *et al.* (2012)

2.1.3. PRODUCCIÓN DE TARWI

Actualmente los cultivos de tarwi están en su mayoría en Ecuador, Perú y Bolivia, bajo diferentes sistemas de producción (Suca & Suca, 2015; Jacobsen & Mujica, 2006). En el Perú, la sierra de La Libertad, Cuzco, Puno y Huánuco son las regiones con mayor producción como se muestra en la Figura 1, según un reporte del MINAGRI durante el 2014 – 2015. Asimismo, Tapia & Fries (2007) indican centros de producción de tarwi, en las partes medias (2200 - 3500 m.s.n.m.) de los valles interandinos como en el valle del Mantaro, el valle del Vilcanota (Cusco), Ayacucho y Abancay en Perú y Cochabamba, Potosí, Sucre en Bolivia que son a la vez grandes centros de diversidad. Alrededor del Lago Titicaca, las provincias Yunguyo y Pomata son las que concentran más cultivos en suelos arenosos a 3 800 m.s.n.m. y además de tener variedades más tolerantes al frío y de crecimiento precoz.

Suca & Suca (2015) indican que la productividad actual del tarwi es muy similar a las leguminosas más consumidas en Perú como el frijol, pallar, garbanzo, lenteja, haba y arveja. La producción total de tarwi para el 2014 alcanzó 12 100 toneladas con un rendimiento de 1,3 t/ha. En la Figura 2 se diagrama la producción de tarwi para el Perú, viéndose un comportamiento fuertemente cíclico desde 1980 al 2000; incrementándose la producción de manera más sostenida a partir del 2006. De forma adecuada y proporcionando todos los requerimientos oportunamente, puede llegarse a producirse de 3500 a 5000 Kg/ha, según lo reportado por Jacobsen & Mujica (2006).

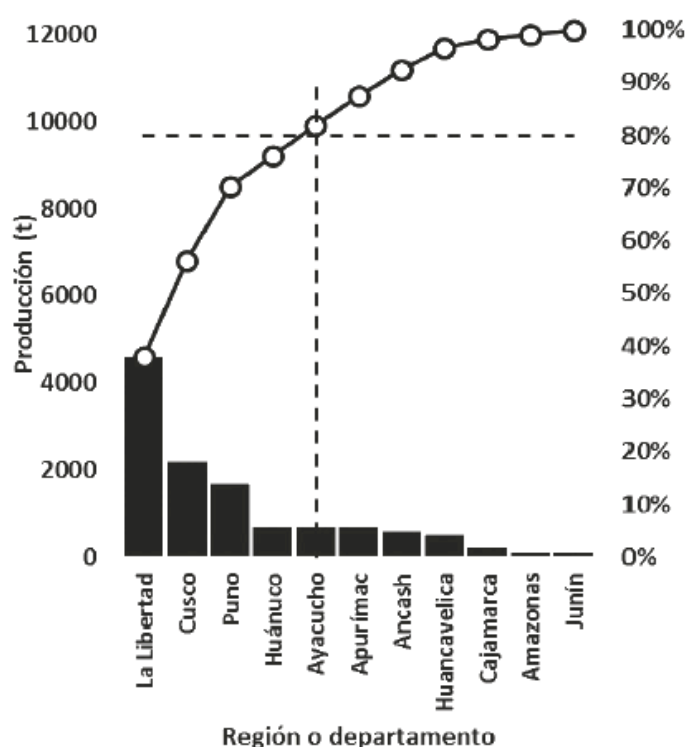


Figura 1: Principales regiones de tarwi en el Perú

FUENTE: Suca & Suca (2015)

2.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TARWI

El grano de tarwi (*Lupinus mutabilis*) es rico en proteínas y grasas, tanto que representan incluso más de la mitad de su peso. Por lo general se le compara con la soya (33.4 % proteína y 16.4 % de grasa) por su valor nutritivo, ya que ciertos ecotipos de lupino superan en proteína y grasa a esta popular leguminosa (Jacobsen & Mujica, 2006).

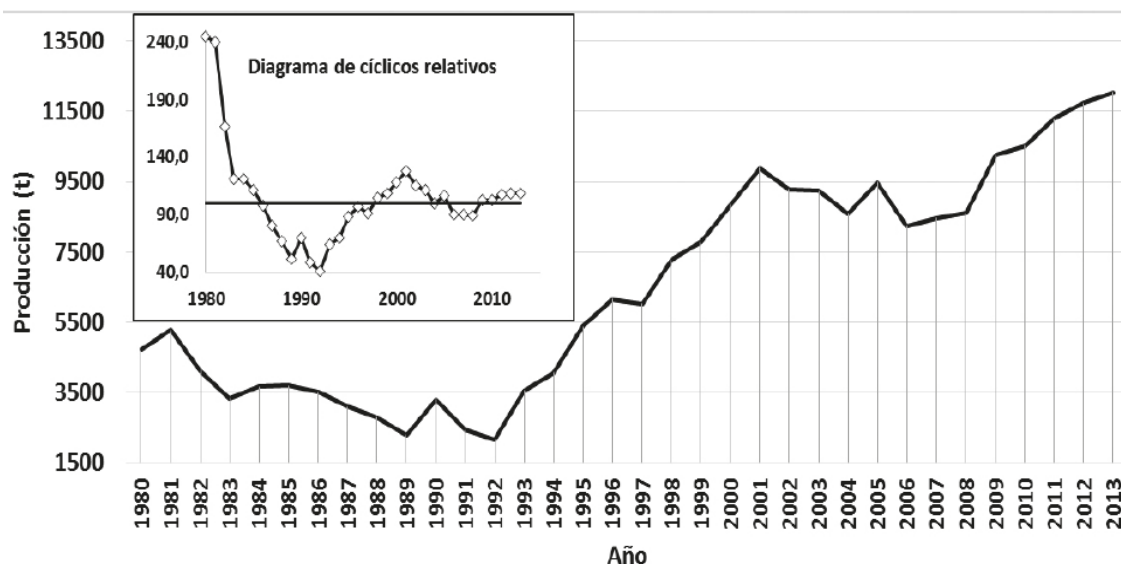


Figura 2: Producción de tarwi en el Perú

FUENTE: FAO (2015), citado por Suca & Suca (2015)

Investigaciones en más de 300 genotipos de tarwi muestran que su contenido de grasa está entre 14 a 24 % (Gross *et al.*, 1988; citado por Jacobsen & Mujica, 2006) predominando los siguientes ácidos grasos: oleico 40.4 %; linoleico 37.1 %; linolénico 2.9 % y palmítico 13 % (Tapia & Fries, 2007). Quispe (2015) reporta que el proceso de desamargado disminuye el extracto etéreo en lupino por la pérdida de fosfolípidos, pero finalmente se obtiene un aumento relativo a causa de la pérdida de materia seca.

Los carbohidratos totales en el *Lupinus mutabilis* varían entre 28 a 34 % en tarwi amargo y de 7 a 10 % para tarwi desamargado (Quispe, 2015) los cuales se encuentran mayormente en la cáscara que en el cotiledón. Baldeón (2012) indica que esta leguminosa presenta un mayor contenido de oligosacáridos frente al bajo contenido de sacarosa y almidón.

Sobre el porcentaje de fibra, este representa más del 6%, pues la cubierta seminal que está ligado al contenido de fibra abarca el 10 % del peso de la semilla (Allauca, 2005). El desamargado provoca un incremento porcentual de fibra cruda (Quispe, 2015), la cual al ser en mayor parte soluble se pierde en los lavados, causando esta se concentre finalmente.

En la Tabla 4, se presenta una comparación del análisis bromatológico del tarwi antes y después del desamargado.

Tabla 4: Composición proximal del tarwi

COMPONENTE	TARWI AMARGO	TARWI DESAMARGADO
Proteína (%)	47.8	54.05
Grasa (%)	18.9	21.22
Alcaloides (%)	3.26	0.03 - 0.01
Almidón total (%)	4.34	2.88
Fibra (%)	11.07	10.37
Ceniza (%)	4.52	2.54
Potasio (%)	1.22	0.02
Magnesio (%)	0.24	0.07
Calcio (%)	0.12	0.48
Fósforo (%)	0.6	0.43
Hierro (ppm)	78.45	74.25
Zinc (ppm)	42.84	63.21
Manganeso (ppm)	36.72	18.47
Cobre (ppm)	12.65	7.99

FUENTE: Lara (2003), citado por Allauca (2005)

Sobre sus minerales, el predominante es el calcio, que se localiza en la cáscara por lo que es recomendable consumir el tarwi en forma integral (sin pelar). Sigue en importancia el fósforo (Allauca, 2005) y el potasio de entre 1.1% - 1.4 %, de magnesio con un 0.2 - 0.3 % (Asociación Internacional de Lupino (1990), citado por Rodríguez (2009)). De los microelementos contenidos en el tarwi, sobresale el hierro.

2.1.5. DESAMARGADO DE TARWI

El desamargado de tarwi es un proceso mediante el cual se reducen los compuestos amargos de los granos, para emplearlos en la alimentación humana y animal. Este contenido de alcaloide de los granos de tarwi, puede ser minorado tanto por métodos fitotécnicos como

por métodos tecnológicos (Cutipa, 2014). Incluso, actualmente se cuenta con normativas respecto al nivel permitido de alcaloides, como la norma INEN 2390:2004 que indica un máximo de 0.02 a 0.07 %.

Una de las técnicas más difundidas es la del desamargado acuoso, la cual se basa en tres etapas básicas: remojo, cocción y lavado. En el Perú, el método es llamado “Tradicional” consistiendo en 12 horas de remojo materia prima: agua (1: 6), cocción de 1 hora con cambio de agua cada 30 minutos materia prima: agua (1: 3) y posterior un lavado de 5 días materia prima: agua (1:3) con cambio de agua de cada 6 horas (Jacobsen & Mujica, 2006).

Dentro del proceso del desamargado del tarwi, el remojo o hidratación consiste en el contacto de la semilla con agua a temperatura ambiente por un tiempo determinado para acondicionar la semilla, hidratando los tejidos para facilitar la salida de los alcaloides (FAO, 1982; citado por Quispe, 2015).

Respecto el proceso térmico de cocción, la etapa es necesario debido a (Tintaya, 2017):

- Destrucción del poder germinativo.
- Destrucción de las enzimas propias de la célula, tales como lipasa, que causan la descomposición de las grasas.
- Destrucción de microorganismos adheridos a las semillas, que pueden producir toxinas, así como causar la descomposición de sustancias nutritivas.
- Desintegración de las células de las semillas, mediante lo cual se facilita la extracción de alcaloides.
- Coagulación de las proteínas de las semillas con lo que se reduce la pérdida de proteínas durante el proceso de extracción.

En la etapa del lavado, el grano cocido permanece en agua en reposo con cambios de agua periódica o en agua en circulación, por un determinado tiempo a temperatura ambiente, para completar la salida de alcaloides por solubilización (Quispe,2015).

Finalmente, el chocho luego de pasar por el proceso de desamargado termina como un producto limpio, húmedo, de color blanco - crema, sabor y olor característico, libre de olores extraños y sabor amargo (Baldeón, 2012).

2.2. PROTEÍNAS

2.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Las proteínas son polímeros lineales construidos a partir de unidades monoméricas de aminoácidos. Aunque es importante mencionar que las funciones de cada proteína no dependen exclusivamente de la secuencia de aminoácidos que la constituyen. Los aminoácidos se enlazan unos con otros para formar proteínas a través de los grupos amida. Cada uno de estos grupos amida recibe el nombre de enlace peptídico cuando se ha formado mediante aminoácidos. Los enlaces peptídicos son producto de una reacción de condensación entre el grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido y el grupo amino (-NH₂) de otro aminoácido, como se observa en la Figura 3.

2.2.2. PROTEÍNAS EN LUPINO

Estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos de lupino muestran que el grano contiene entre 41- 51 % de proteína (Gross *et al.*, 1988; citado por Jacobsen & Mujica, 2006). Es así que, cuando se compara el tarwi con otras leguminosas, como la soya o frijol, es clara la diferencia en proteínas a favor del tarwi. Este aumento en el porcentaje de nutrientes es resultado del tiempo de remojo, cocción y lavado sobre el contenido de alcaloides y proteínas, encontrando un 48.2 % de proteína con tiempo de remojo de 12 horas, de cocción 30 minutos y lavado de 4 días (Palacios y Ortega, 1995; citado por Ojeda & Salazar, 2011).

La calidad proteica de una proteína puede medirse por su concentración, digestibilidad y por el contenido de aminoácidos esenciales que componen su estructura. Respecto a la proteína del grano de tarwi, cabe decir que es rica en globulinas y albúminas (Camarena *et al.*, 2012).

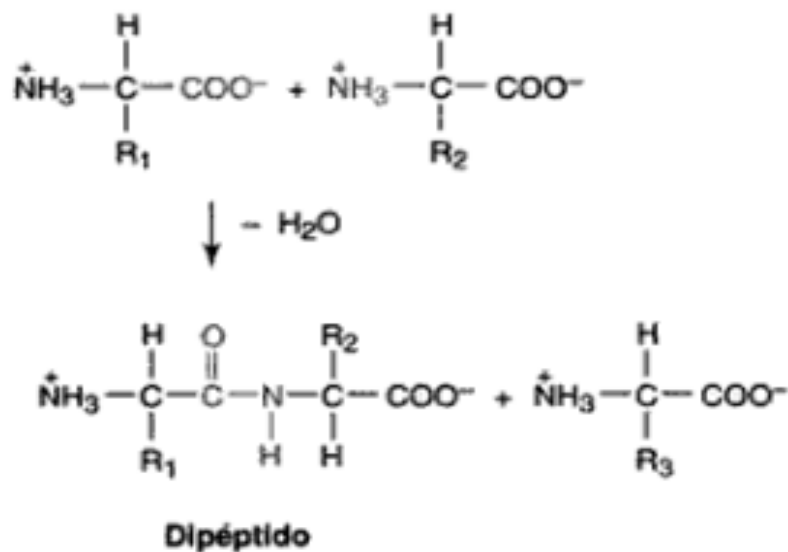


Figura 3: Formación del enlace peptídico

FUENTE: Devlin (1999)

En la Tabla 5 se muestra el contenido de los 9 de los aminoácidos esenciales que posee el tarwi, sin embargo, es deficiente al igual que la mayoría de leguminosas en cistina y metionina (aminoácidos azufrados), a excepción del triptófano que también presenta deficiencia en el grano (Tapia, 2000).

Tabla 5: Contenido de aminoácidos del tarwi

AMINOÁCIDOS	PATRÓN DE AMINOÁCIDOS (mg / g proteína)
Isoleucina	28
Leucina	66
Lisina	58
Metionina + cistina	25
Fenilalanina + tirosina	63
Treonina	34
Triptófano	11
Valina	35
Histidina	19

FUENTE: Tapia (2000)

Como primer indicativo de la disponibilidad de estos aminoácidos del tarwi, esta leguminosa cuenta con una digestibilidad alta (sobre 80 %), ya que la mayoría de leguminosas como arvejas y frijoles tienen valores por debajo de este porcentaje (Schoeneberger *et al.*, 1983).

2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS

2.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN

Entre los compuestos funcionales en alimentos, el grupo que actualmente está generando mayor interés es el de los compuestos fenólicos, también ampliamente denominados polifenoles, a pesar de su diversidad estructural (Balasundram *et al.*, 2006). Existen actualmente más de 8000 compuestos fenólicos de origen natural identificados, los cuales poseen una característica estructural en común, un grupo fenol (anillo aromático) con al menos un grupo hidroxilo (OH) como sustituyente (Peñarrieta *et al.*, 2014; Paliyath *et al.*, 2008), como se muestra en la Figura 4.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales para el regular desarrollo y como respuesta a condiciones de estrés (polución, radiaciones UV, temperaturas extremas, entre otras). La cantidad de compuestos fenólicos presentes en la planta depende de factores como la especie o variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, así como las condiciones de procesado y almacenamiento, entre otras (Nacz y Shahidi, 2006).

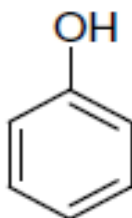


Figura 4: Estructura química del fenol

FUENTE: Peñarrieta *et al.* (2014)

Los compuestos fenólicos en las plantas no se han distribuido uniformemente a nivel de tejido, celular y subcelular; por lo que estas se han concentrado más en las capas exteriores. Incluso, los compuestos fenólicos insolubles se encuentran en las paredes celulares (enlazados a diversos compuestos que contribuyen a darle resistencia), mientras que los solubles se encuentran en vacuolas (Naczki y Shahidi, 2006; Pandey & Rizvi, 2009).

Los criterios para clasificar estos compuestos no están claramente establecidos; Harborne (1989), citado por Bravo (1998), indica que puede clasificarse acorde a la naturaleza y el número de carbonos de su estructura química básica. Por ello, los polifenoles pueden extenderse desde simples moléculas, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos.

En la Figura 5 se muestran las familias de los compuestos fenólicos, los cuales en la naturaleza suelen estar presentes como conjugados con mono y polisacáridos o como derivados funcionales como ésteres o metilésteres. De éstos, los ácidos fenólicos, los flavonoides y taninos son los principales compuestos fenólicos (Balasundram *et al.*, 2006).

En general, la biosíntesis de los compuestos fenólicos ocurre a través de diferentes rutas, por lo que se produce un grupo heterogéneo de compuestos. No obstante, las dos rutas principales son: la ruta del ácido shikímico y la ruta malónica (Paliyath *et al.*, 2008).

2.3.2. FUNCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

En las plantas, los compuestos fenólicos desempeñan importantes funciones morfológicas y fisiológicas (Cozzolino, 2015):

- Participan en el crecimiento y la reproducción (las semillas acumulan representativas cantidades de fenoles en sus cubiertas que filtran el oxígeno para que no alcance al embrión de la semilla lo que inhibe su germinación) (Bravo, 1998).

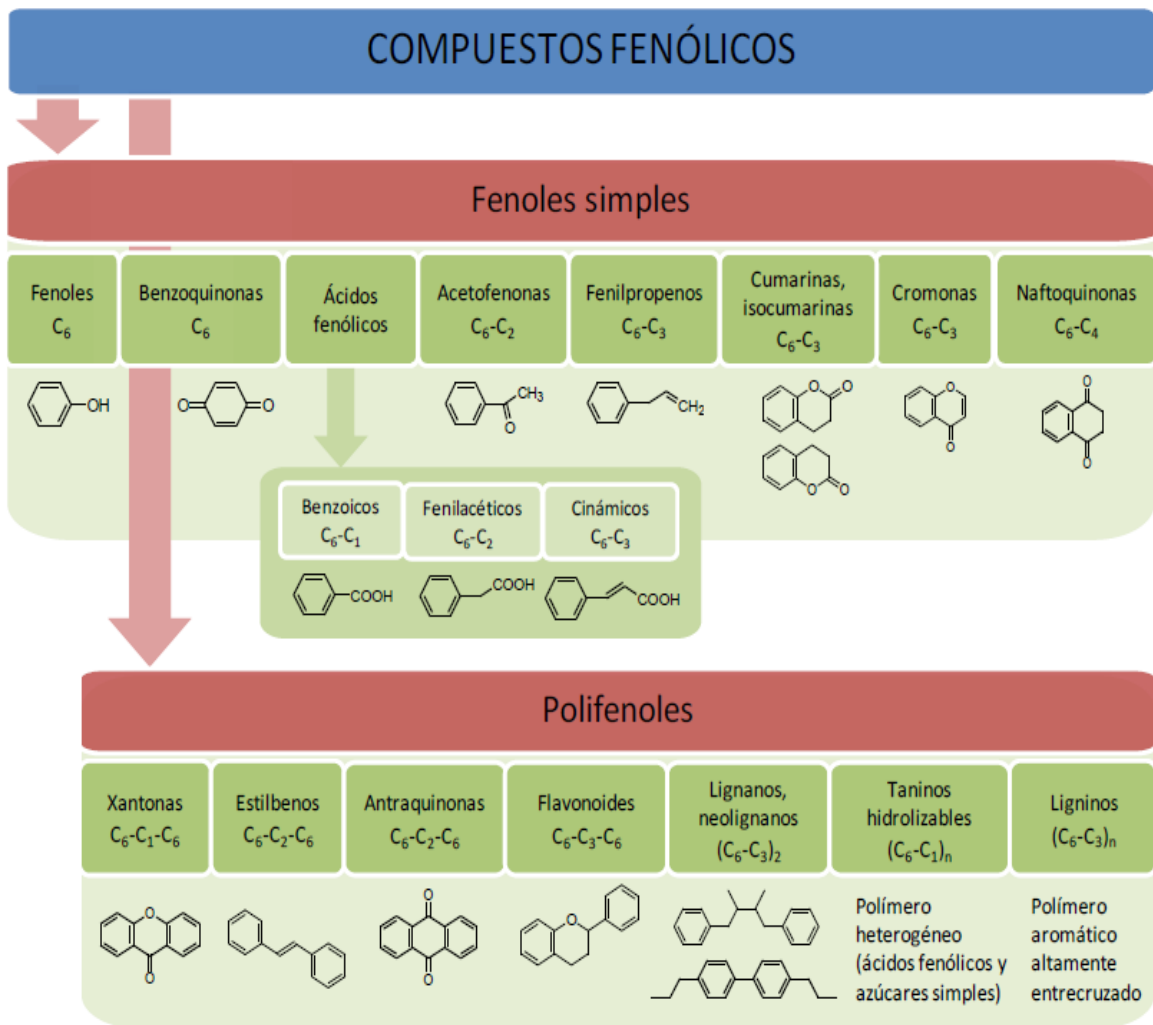


Figura 5: Clasificación de las familias de compuestos fenólicos

FUENTE: Gómez (2010)

- Protege de las radiaciones UV, ya que los polifenoles pueden absorber luz de cortas longitudes de onda, por ello se acumulan en las capas superficiales (Paliyath *et al.*, 2008).
- Establece relaciones químicas entre la planta y su entorno: son componentes de esencias y pigmentos de frutos, así como de sabores o texturas desagradables (Paliyath *et al.*, 2008).
- Los pigmentos como muchos de los polifenoles mitigan el estrés oxidativo (actividad antioxidante) y extienden la vida útil y dan firmeza a las frutas (Paliyath *et al.*, 2008).

Cheyrier (2005) y Ozcan *et al.* (2014) indican que los compuestos fenólicos son, uno de los principales responsables de las características organolépticas de los alimentos y bebidas procedentes de las plantas: en verduras, frutas, legumbres, cereales, granos y semillas. Además, contribuyen en su color (pigmentos amarillos, naranjas, rojos y azules), sabor (amargor y astringencia), olor y estabilidad oxidativa.

2.3.3. PROPIEDADES Y BENEFICIOS A LA SALUD

Los estudios epidemiológicos han mostrado repetidamente una asociación inversa entre el riesgo de enfermedades humanas crónicas y el consumo de la dieta rica en polifenoles, ello especialmente por su capacidad antioxidante (Pandey & Rizvi, 2009). El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos en los componentes celulares parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos (Porrás & López, 2009; Pandey & Rizvi, 2009).

De igual manera, investigaciones sugieren fuertemente efectos positivos contra enfermedades cardiovasculares, puesto que los polifenoles tienen efecto antiinflamatorio, antiplaquetarios y son potentes inhibidores de la oxidación de LDL (colesterol de baja densidad). Asimismo, se han identificado varios mecanismos de acción de los polifenoles, respecto a su efecto anticancerígeno al actuar en la detención del ciclo celular y regulando del sistema inmunológico (García *et al.*, 2009). En tanto, Youdim & Joseph (2001) denotan el impacto de flavonoides contra la neurodegeneración, mediante la protección de neuronas contra el estrés oxidativo, mejorando de la función neuronal existente o estimulando la regeneración neuronal.

Entre otros efectos beneficiosos de los polifenoles para la salud, esta su acción preventiva en el tratamiento del asma y diabetes y de protección contra el daño de la piel inducido por el sol. Así también, debido a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, se ha encontrado una actividad eficaz contra el envejecimiento (Pandey & Rizvi, 2009).

2.3.4. COMPUESTOS FENÓLICOS EN LUPINO

Según Oomah *et al.* (2006), las cantidades relativas de compuestos fenólicos presentes en lupino difiere significativamente entre genotipos y ubicaciones.

Estudios indican la presencia de compuestos fenólicos en lupino como los flavonoides y de taninos condensados (dímeros, oligómeros y polímeros de flavan-3-oles) o hidrolizados (ésteres de ácido gálico y derivados) en *L. albus* y *L. mutabilis* (Oomah *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 1994; Lampart *et al.*, 2003). En adición, Gálvez (2009) atribuye la potencialidad del *L. mutabilis Sweet* de Perú como antioxidante a la presencia de isoflavonas.

Por su ubicación, la capacidad antioxidante del lupino, la cual se relaciona con el contenido de fenólicos, que se muestra en la Tabla 6, se hace presente en un contenido significativamente mayor en el cotiledón (más del 80%) y el resto está distribuido entre la cáscara y el hipocotilo del tarwi (Gálvez *et al.*, 2009).

Tabla 6: Contenido de fenólicos totales en cultivares de tarwi de Perú

CULTIVAR	FENÓLICOS TOTALES (mg catequina equivalente / 100 g grano)			
	CÁSCARA	COTILEDÓN	HIPOCOTILO	SEMILLA ENTERA
H-6	449 ± 6	1167 ± 25	1325 ± 24	1102 ± 21
SCG-22	141 ± 3	1221 ± 20	1214 ± 10	1119 ± 15
Andares	137 ± 3	1106 ± 13	1140 ± 15	1021 ± 21
Yunguyo	137 ± 2	1067 ± 28	1125 ± 15	967 ± 7
SLP-1	169 ± 6	1196 ± 13	1238 ± 23	1095 ± 12
SLP-4	284 ± 4	1242 ± 29	1230 ± 16	1135 ± 31

FUENTE: Gálvez *et al.* (2009)

2.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

2.4.1. DESARROLLO HISTÓRICO

El primer antecedente asociado a la espectroscopia fue la llevada a cabo por Isaac Newton alrededor de 1665, cuando estudió la descomposición de la luz blanca en bandas de diferentes colores con el empleo de un prisma triangular (Hollas, 2004).

En el año 1800, el astrónomo William Herschel midió la temperatura de las bandas de luz producidas al descomponer la luz blanca, y se percató del aumento de temperatura conforme se pasaba del extremo azul del espectro al rojo. Más allá todavía, en la zona en la que el ojo humano no percibía color alguno, la temperatura continuaba en aumento. Denominó infrarrojo a esta parte del espectro, que está “más allá” del color rojo (latín *infra*). Así, Herschel había descubierto el infrarrojo cercano (Nielsen, 2008).

Respecto a los primeros espectrógrafos, en 1830, Leopoldo Nobili describe el termopar, cuyo principio de funcionamiento es fundamental en la espectroscopia infrarroja, se produce una corriente eléctrica debida al calor generado. Por otra parte, Langley construye en 1881 el primer bolómetro, dispositivo que detecta el calor producido por la radiación infrarroja al producir cambios en alguna propiedad física del material que lo constituye (Ventura, 2007).

La espectroscopia FTIR nació con la invención del interferómetro de Michelson. Él usó el interferómetro para medir exactamente la longitud de onda de la luz, lo que le valió el premio Nobel en Física en 1907. Michelson empleó esta invención para coleccionar varios interferogramas. Poco después, Rayleigh consiguió aplicar la transformación de Fourier al patrón de interferencia obteniendo un espectro (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2008).

Para la química analítica, el uso de técnicas instrumentales espectroscópicas surge desde finales del siglo XIX con los trabajos de Abney y Festing en 1881, quienes obtienen espectros infrarrojos de varias sustancias. En 1900 la espectroscopia IR se convirtió en una importante herramienta para la identificación y caracterización de compuestos y materiales químicos (Theophanides, 2012). Para 1940, la espectroscopia infrarroja ya se había

convertido en una gran herramienta en la identificación de grupos funcionales en los compuestos orgánicos (Nielsen, 2008). Estudios posteriores mostraron que la espectroscopia IR también podría usarse para estudiar moléculas biológicas, tales como proteínas, ADN y membranas siendo posible su empleo en biociencias (Theophanides, 2012).

En 1950, las primeras investigaciones acerca de las macromoléculas como las proteínas en alimentos realizadas por Elliot y Ambrose, demostraron la correlación entre la forma de las bandas de amida I y II y la estructura de polipéptidos. En la década de 1960, Miyazawa y Blout mostraron una evaluación detallada de la banda de amida I, en que cada tipo de estructura secundaria (hélice, hoja, y al azar) se asocia con una o más frecuencias características (Dufour, 2009).

Uno de los mayores avances en el campo de la computación de la transformada de Fourier ocurrió en 1965 con la invención del Fast Fourier Transform (FFT) del algoritmo de Cooley-Tukey. Este algoritmo incrementó la resolución mientras reducía el tiempo de análisis (Subramanian & Rodriguez-Saona, 2008).

Para 1970 fueron presentados los instrumentos comerciales de reflectancia del infrarrojo cercano (NIR), los cuales proporcionaron determinaciones cuantitativas rápidas en alimentos, como los cereales (Nielsen, 2008). A partir de ello, la investigación en el campo de la espectroscopia infrarroja prosigue con éxito (Ventura, 2007) hasta la actualidad.

2.4.2. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

Ventura (2007) conceptualiza a la radiación electromagnética como una forma de energía radiante que se propaga en forma de ondas transversales. Su vibración es perpendicular a la dirección de su propagación, lo cual imparte un movimiento ondulatorio a la radiación.

El espectro electromagnético abarca un gran intervalo de energías (frecuencias) y, por lo tanto, de longitudes de onda (distancia que ocupa un ciclo completo), siendo este último el criterio para dividir en regiones. Al recíproco de la longitud de onda se llama número de

onda, y es la cantidad de ondas que hay en una longitud unitaria, o sea la distancia por ciclo (Christian, 2009; Skoog *et al.*, 2015).

La relación entre longitud de onda y frecuencia es:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

donde λ es la longitud de onda (cm), ν es la frecuencia (Hz), y c es la velocidad de la luz (3×10^{10} cm/s). El número de onda se representa $\bar{\nu}$ en cm^{-1} (Christian, 2009):

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

La unidad de λ que se prefiere en las regiones UV-visible e infrarrojo cercano es el nanómetro (nm), y se prefiere el micrómetro (μm) para la región del infrarrojo medio (Christian, 2009; Dufour, 2009).

Cada uno de estos términos energéticos se corresponde con transiciones de niveles de energía en los que están implicados electrones, vibraciones, rotaciones y traslaciones de la molécula (Christian, 2009). Es así que, para la región del infrarrojo medio (MIR) (2500 - 25 000 nm o 4000 - 400 cm^{-1}) que retiene información para identificar moléculas orgánicas y caracterizar la estructura y la conformación de estas, tiene una absorción de un cambio de energía que oscila entre 2 y 10 kcal mol^{-1} (Dufour, 2009).

2.4.3. ESPECTROSCOPIA

La espectroscopia se ocupa de la producción, el registro y la interpretación de los espectros que se derivan de la interacción de la radiación electromagnética con la materia (Skoog *et al.*, 2015; Dufour, 2009).

La Figura 6 muestra las regiones del espectro electromagnético que son utilizadas para los análisis espectroscópicos y los tipos de transiciones atómica y molecular que resultan de las interacciones de la radiación con una muestra (Skoog *et al.*, 2015).

Los métodos espectroscópicos se diferencian según la naturaleza de las especies que se analiza (espectroscopia molecular y atómica), del tipo de interacción entre la radiación y la materia (tal como absorción, emisión o difracción) y de la región del espectro electromagnético utilizada en el análisis (frecuencia ultravioleta, visible, infrarrojo u ondas de radio), que se esquematiza en la Figura 6. Estos son muy informativos y ampliamente utilizados para los análisis, tanto los cuantitativos como los cualitativos (Nielsen, 2008).

Respecto a la espectroscopia de absorción, medimos la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda. Estas mediciones pueden brindar información cualitativa como cuantitativa acerca de una muestra (Skoog *et al.*, 2015).

Cabe señalar, que el número de formas en que una molécula puede vibrar está relacionado con el número de átomos y, por tanto, con el número de enlaces que estas contienen. Aun para la molécula más simple, el número posible de vibraciones es grande (Skoog *et al.*, 2015) como por ejemplo para una molécula de 5 átomos y con cuatro enlaces se pueden dar hasta 11 modos normales de vibración (Stuart, 2004).

2.4.4. ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO MEDIO

La espectroscopia de infrarrojo (IR) se basa en el estudio de transiciones vibracionales y rotacionales que provocan cambios en el estado de la molécula. Cabe indicar que, no suscita transiciones electrónicas, puesto que la energía dada por la radiación infrarroja es insuficiente para ello (Skoog *et al.*, 2015).

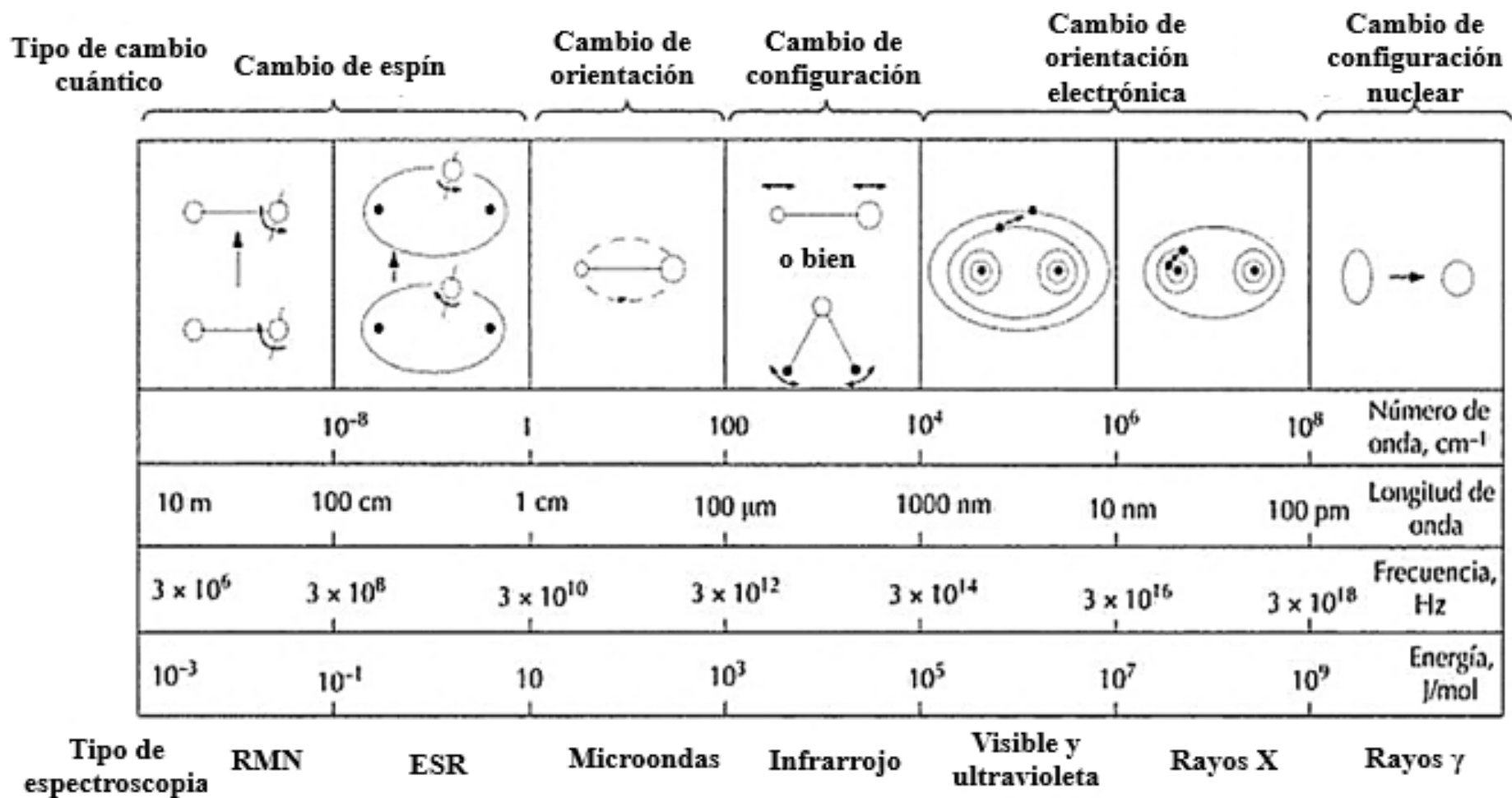


Figura 6: Regiones del espectro electromagnético

FUENTE: Skoog *et al.* (2015)

Ríos *et al.* (2012) señalan que la región infrarroja del espectro electromagnético se suele dividir en tres partes, como se indica en la Tabla 7, debido a las diferencias de energía y también al carácter de las transiciones involucradas en cada caso, así como la configuración de la instrumentación requerida para la obtención de los correspondientes espectros.

Tabla 7: Regiones del Infrarrojo

REGIÓN	LONGITUD DE ONDA (λ) μm	NÚMERO DE ONDA ($\bar{\nu}$) cm^{-1}
Cercana (NIR)	0,78 – 2,5	12800 a 4000
Media (MID)	2,5 – 50	4000 a 200
Lejana (FIR)	50 – 1000	200 a 10

FUENTE: Jurado (2012)

La región del infrarrojo medio comprende longitudes de onda correspondientes a las vibraciones rotacionales fundamentales (de baja energía hasta el primer estado excitado) mientras que sobretonos (excitación normal de vibración al segundo estado excitado o superiores) o bandas de combinación de la transición fundamental (excitación de dos o más modos de vibración) se asocian con la región del infrarrojo cercano, como se muestra en la Figura 7. Por su parte, el infrarrojo lejano aparece bandas de adsorción correspondientes a torsión a baja frecuencia y rotación interna y vibraciones. Para que ocurra es necesario que las moléculas sean polares o que se produzca una variación del momento dipolar de las mismas como consecuencias de cambios vibracional o rotacional al interaccionar con la radiación infrarroja (Ríos *et al.*, 2012; Jurado, 2012).

En el caso del estudio del espectro infrarrojo de muestras sólidas y líquidas sólo se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracionales (Osborne *et al.*, 1993; citado por Macho, 2002).

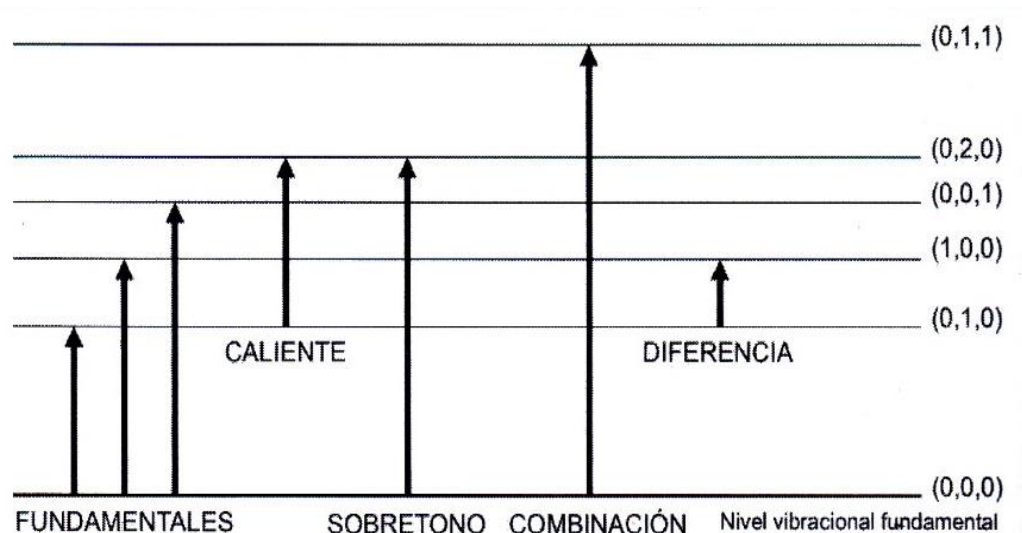


Figura 7: Tipos de transiciones de las bandas de absorción en el infrarrojo

FUENTE: Ríos *et al.* (2012)

Según Skoog *et al.* (2015), la espectroscopia de absorción infrarroja permite identificar compuestos orgánicos e inorgánicos puros porque, a excepción de las moléculas homonucleares, todas las especies químicas moleculares absorben radiación infrarroja.

Según Nielsen (2008), son las regiones del infrarrojo cercana y media del espectro, las más útiles para el análisis cuantitativo y cualitativo de los alimentos.

Los movimientos vibracionales de las moléculas se distinguen por la forma de los enlaces al desplazarse, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión (Figura 8). Las tensiones provocan un estiramiento o estrechamiento del enlace y las flexiones generan una deformación del enlace. Si el número de átomos que forman un enlace es de tres o más, los movimientos pueden ser simétricos si los enlaces se desplazan en direcciones contrarias, y asimétricos, cuando el movimiento es en la misma dirección o sentido (Barraza *et al.*, 2013).

2.4.5. ASIGNACIÓN DE BANDAS ESPECTRALES DEL INFRARROJO MEDIO

Actualmente, la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) obtiene información única sobre la estructura e interacciones proteína-proteína y proteína - lípido sin introducir perturbaciones (Dufour, 2009).

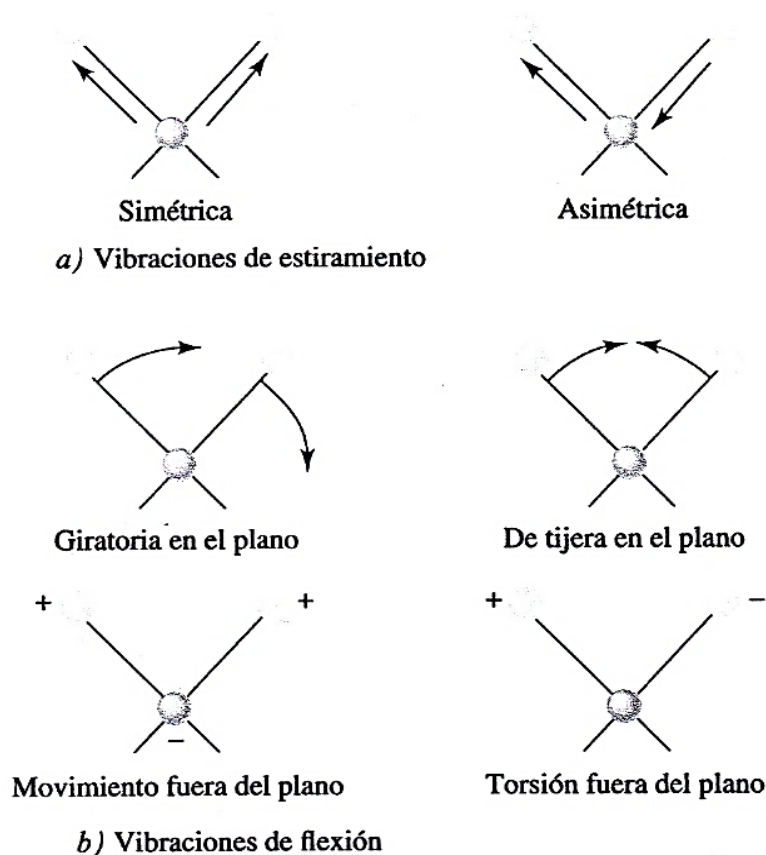


Figura 8: Tipos de vibraciones moleculares por absorción infrarroja

FUENTE: Skoog *et al.* (2015)

Las bandas de amida I, II y III son sensibles a la conformación adoptada por la cadena principal de la proteína. Las estructuras secundarias de proteínas se pueden deducir de sus espectros FTIR desde las correlaciones entre la banda de amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) y los niveles de α -hélice, β -hoja (Dousseau & Pézolet, 1990; citado por Dufour, 2009). Aunque los enlaces peptídicos son esencialmente responsables de la absorbancia de las proteínas, las cadenas laterales de varios aminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, arginina y tirosina) pueden contribuir a la señal en la región amida II (Goormaghtigh *et al.* 1990, citado por Dufour, 2009). La Figura 9 muestra las principales bandas de absorción características de las proteínas. La Tabla 8 indica las frecuencias y tipo de vibraciones correspondientes a las bandas relacionadas a la proteína (enlaces amida).

Cabe considerar que, el agua absorbe también algunas regiones correspondientes a las proteínas y ello puede afectar la interpretación de los espectros. El agua es un absorbente de infrarrojo muy fuerte con bandas prominentes centradas en 3360 cm^{-1} (banda de

estiramiento H-O), a 2130 cm^{-1} (banda de asociación de agua) y a 1640 cm^{-1} (la vibración de flexión H-O-H) (Safar et al., 1994; citado por Dufour, 2009).

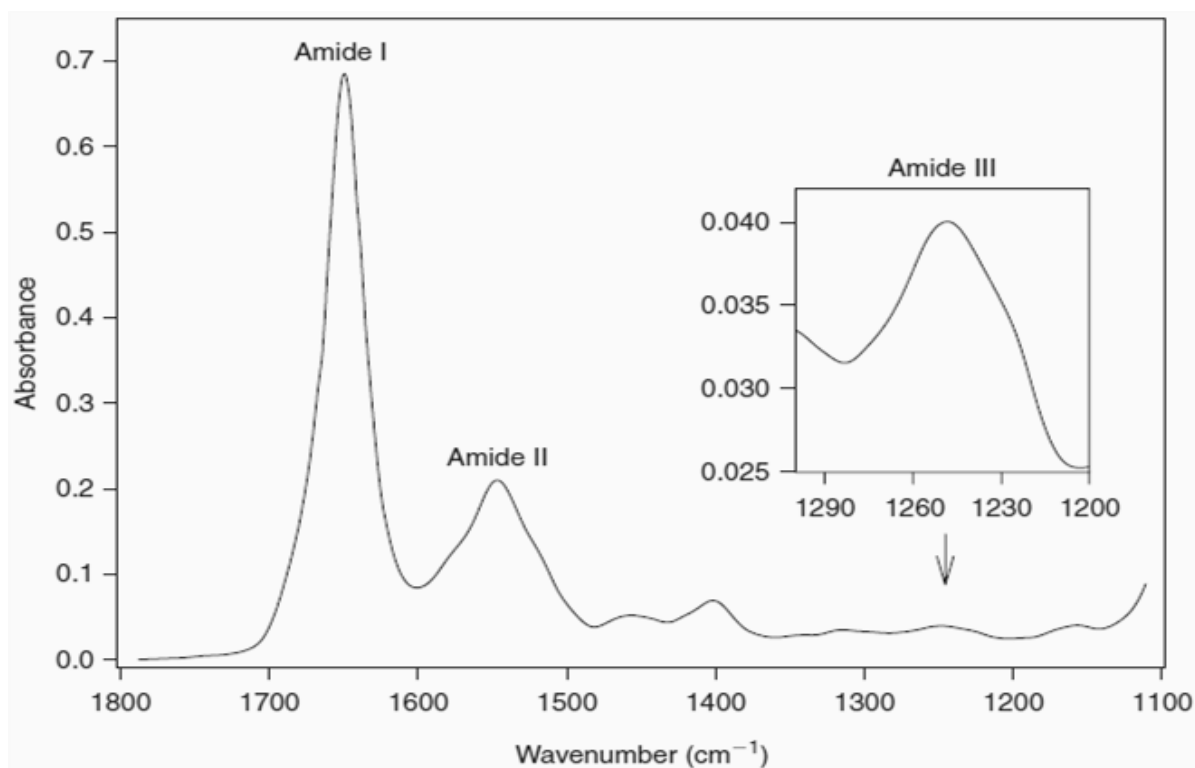


Figura 9: Espectro del infrarrojo medio de las bandas amida I, II y III

FUENTE: Dufour (2009)

Los carbohidratos son otras macromoléculas importantes que se encuentran en los productos alimenticios. Los espectros MIR de carbohidratos muestran cuatro zonas principales de absorbancia: aproximadamente 3220 cm^{-1} , una banda intensa resultante del estiramiento de la glucosa en enlace O - H; el enlace C - H muestra bandas de flexión asimétricas y simétricas a 1470 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} , respectivamente; bandas por las vibraciones C - O y C - C se observan a aproximadamente 1100 cm^{-1} y en la región cercana a 920 cm^{-1} dos vibraciones de estiramiento asimétrico C-O-C, correspondiente a α y β anómeros (Dufour, 2009).

Para los lípidos, las regiones espectrales de 3.000 - 2.800 cm^{-1} , 1.800 - 1.400 cm^{-1} y 1.200-500 cm^{-1} presentan en general un contenido de ácidos y grasas, remarcando la región de 1.800-1.650 cm^{-1} (C = O) y 1.650-1.380 cm^{-1} (C-H) (Oliveira et al., 2016).

Tabla 8: Bandas de las amidas en la región del infrarrojo medio

BANDA	TIPO DE VIBRACIÓN	FRECUENCIA (cm⁻¹)	
Amida I	Estiramiento C-O		
	Estiramiento C-N	~ 1655	1690 - 1600
	Flexión C-C-N		
Amida II	Agitación N-H		
	Estiramiento C-N		
	Agitación C-O	~ 1560	1575 - 1480
	Estiramiento C-C		
	Estiramiento N-C		
Amida III	Agitación N-H		
	Estiramiento C-C	~ 1300	1301 - 1229
	Estiramiento C-N		
	Agitación C-O		
Amida A	Estiramiento N-H	~ 3300	~ 3300
Amida B	N-H		~ 3100
Amida V	Torsión C-N	~ 660	800 - 640
	Agitación N-H		

FUENTE: Dufour (2009); Kong & Yu (2007) y Sjahfirdil *et al.* (2012)

Los carbohidratos son otras macromoléculas importantes que se encuentran en los productos alimenticios. Los espectros MIR de carbohidratos muestran cuatro zonas principales de absorbancia: aproximadamente 3220 cm⁻¹, una banda intensa resultante del estiramiento de la glucosa en enlace O - H; el enlace C - H muestra bandas de flexión asimétricas y simétricas a 1470 cm⁻¹ y 1380 cm⁻¹, respectivamente; bandas por las vibraciones C - O y C - C se observan a aproximadamente 1100 cm⁻¹ y en la región cercana a 920 cm⁻¹ dos vibraciones de estiramiento asimétrico C-O-C, correspondiente a α y β anómeros (Dufour, 2009).

Para los lípidos, las regiones espectrales de $3.000 - 2.800 \text{ cm}^{-1}$, $1.800 - 1.400 \text{ cm}^{-1}$ y $1.200 - 500 \text{ cm}^{-1}$ presentan en general un contenido de ácidos y grasas, remarcando la región de $1.800 - 1.650 \text{ cm}^{-1}$ (C = O) y $1.650 - 1.380 \text{ cm}^{-1}$ (C-H) (Oliveira *et al.*, 2016).

Los alcoholes y fenoles producen bandas infrarrojas características debido al estiramiento O - H y estiramiento C = O, que son ambos sensibles al enlace de hidrógeno. Para los fenoles la banda de estiramiento O - H, aparece entre $3550 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ (Stuart, 2004). Respecto a ello, Türker & Huck (2017) reportan a la misma banda entre $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$. Por otro lado, también está la banda de 1640 cm^{-1} , que puede ser debido a la vibración de estiramiento del enlace C = C de los flavonoides y la deformación del anillo aromático (Oliveira *et al.*, 2016).

En la región comprendida entre los 3.600 a 3.000 cm^{-1} , se observan absorbancias características de tensiones del enlace O - H (hidroxilo) y de N - H (amino), grupos funcionales que son muy variables en el momento del análisis espectral, debido a ello, a la cantidad de agua y a posibles enlaces y puentes de hidrógeno generados por resonancia, muchas veces se descarta esta región para el análisis (Oliveira *et al.*, 2016).

2.4.6. INSTRUMENTACIÓN PARA ESPECTROMETRÍA INFRARROJA

En los laboratorios modernos pueden encontrarse tres tipos de instrumentos infrarrojos (Skoog *et al.*, 2015):

a) Espectrómetros infrarrojo dispersivos

La obtención del espectro IR con un equipo dispersivo implica la dispersión de un haz de radiación procedente de una fuente mediante un prisma o una red de difracción. La longitud de onda de la radiación que atraviesa la muestra es seleccionada con un monocromador, que deja pasar una estrecha franja de radiación. Para obtener un espectro de absorción es necesario rotar el prisma o la red de difracción, de tal modo que la muestra reciba un estrecho haz de radiación de longitud de onda diferente para cada punto del espectro hasta completarlo. Este barrido de longitud de onda se traduce en unos tiempos de medida del orden de minutos para la adquisición de un único espectro (Ventura, 2007).

b) Espectrómetro de Transformada de Fourier

La técnica de la transformada de Fourier aprovecha la tecnología moderna de almacenamiento y procesamiento de grandes cantidades de datos mediante un ordenador. Esta técnica se ha impuesto como método estándar (Hesse *et al.*, 2005).

El principio básico es el registro simultáneo de todas las frecuencias del espectro infrarrojo (IR) por parte del detector, que hace superfluo el gran consumo de tiempo que se invierte en el barrido. Esto se consigue si la luz policromática de la fuente luminosa IR, con la misma intensidad y banda de frecuencias, se transforma en todo momento por medio de un interferómetro, en un interferograma, que no es una función de la frecuencia, sino del tiempo (es decir, transformación del dominio de frecuencias al dominio tiempos). Después del paso de la radiación “preparada” a través de la muestra, se vuelve a convertir el interferograma en un espectro mediante una operación matemática, la transformación de Fourier (es decir, se vuelve al dominio de frecuencias) (Hesse *et al.*, 2005).

Esta técnica requiere un diseño de aparato totalmente distinto. La parte fundamental es un interferómetro de Michelson. La radiación IR se dirige hacia él a través de una placa semitransparente (KBr o CsI recubierto con germanio) que funciona como separador de haz. La mitad del haz luminoso incide en un espejo fijo, la otra mitad incide sobre un espejo móvil, cuya distancia al interferómetro se puede variar. Ambos espejos reflejan la radiación hacia la placa, donde se produce la interferencia. En la Figura 10 se muestra el diagrama del equipo y la secuencia para realizar la lectura de un espectro por un espectrómetro de transformada de Fourier.

Cabe señalar que como la radiación IR es policromática, el interferograma obtenido es una superposición o suma de interferogramas correspondientes a todas las frecuencias individuales. A continuación, la radiación modulada atraviesa la muestra, donde esta se absorbe selectivamente, dependiendo de las vibraciones de excitación de la muestra. El detector registra la luz IR emergente que llega como interferograma, transforma las señales ópticas en eléctricas y las almacena en un ordenador. Éste convierte la información sobre las frecuencias, contenida en el interferograma mediante la transformación de Fourier, en frecuencias aisladas y produce así el interpretable espectro de bandas (Hesse *et al.*, 2005).

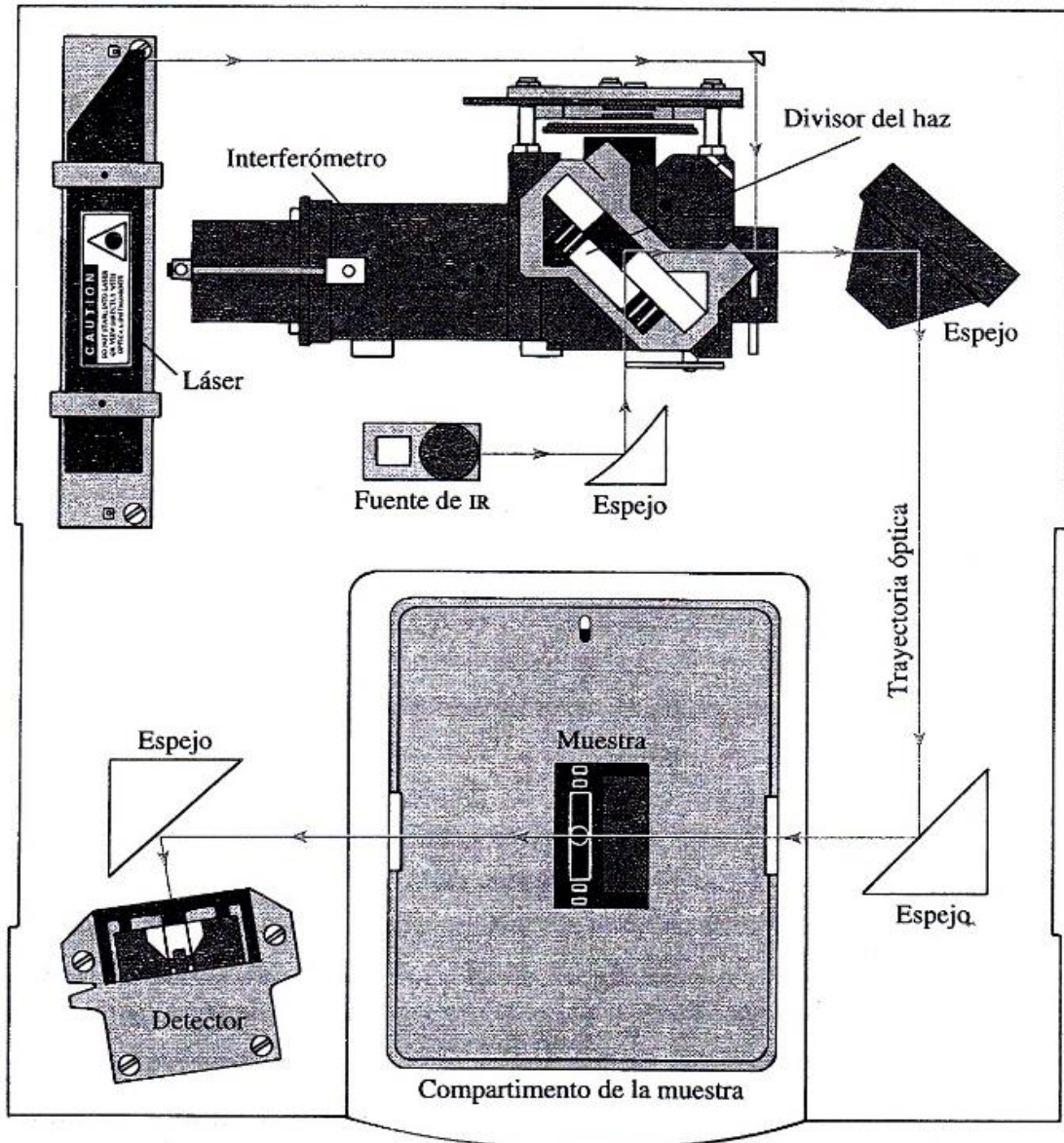


Figura 10: Diagrama del instrumento para un espectrómetro de transformada de Fourier

FUENTE: Skoog *et al.* (2015)

El interferograma de una radiación monocromática es una función sinusoidal, expresada como coseno. El interferograma de una radiación policromática equivale a la suma de las funciones coseno de cada radiación monocromática que la compone. Mediante la transformada de Fourier (FT) se consigue convertir esta función sinusoidal de señal frente a camino óptico en otra función sinusoidal de señal frente a longitud de onda o frecuencia (Spraggs, 2000), como se muestra en la Figura 11.

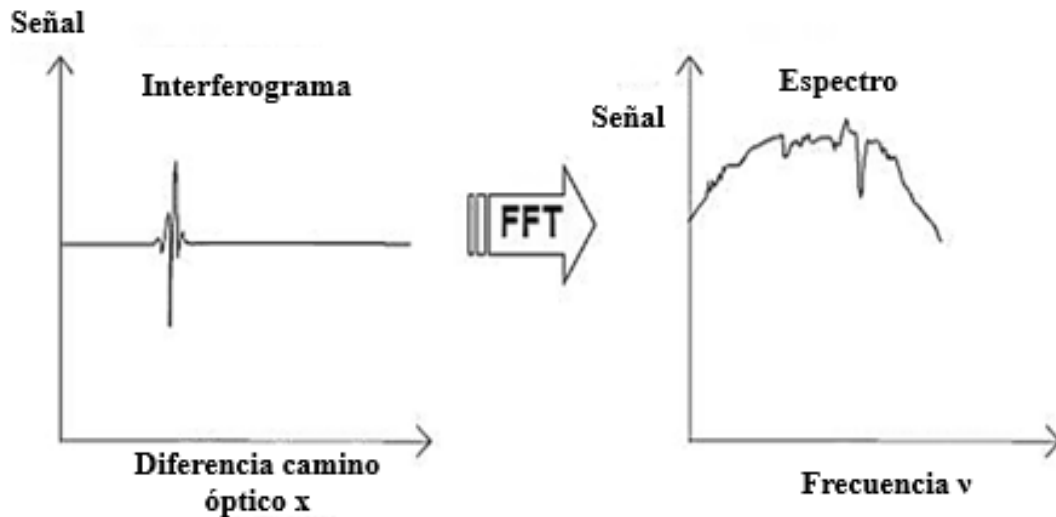


Figura 11: Esquema de la aplicación de la transformada de Fourier (FT) en la obtención de un espectro

FUENTE: Ventura (2007)

Este algoritmo matemático FFT (*Fast Fourier Transform*) fue desarrollado por Cooley y Turkey en 1965 y permite realizar la computación de la transformada de Fourier en un brevísimo lapso de tiempo (Spraggs, 2000).

Este algoritmo matemático FFT (*Fast Fourier Transform*) fue desarrollado por Cooley y Turkey en 1965 y permite realizar la computación de la transformada de Fourier en un brevísimo lapso de tiempo (Spraggs, 2000).

El intervalo de frecuencias que se pueden identificar a partir del interferograma depende de la longitud de éste, siendo necesarios al menos dos puntos por cada ciclo de la frecuencia mayor (*criterio Nyquist*). Si no se aplica este criterio no se pueden asignar los puntos inequívocamente a una única frecuencia, es decir, que la señal obtenida para una frecuencia es indistinguible de la obtenida para otra (Curbelo, 2000).

Por otra parte, la resolución del espectro depende del espaciado de las frecuencias proporcionado por la FT, que está determinado por el recorrido del interferómetro. Las frecuencias utilizadas en una FT son las que ajustan un número exacto de ciclos en la diferencia óptica máxima del interferómetro (Curbelo, 2000).

Las ecuaciones esenciales para una transformación de Fourier relacionan la caída de la intensidad en el detector $I(\delta)$, donde δ es la diferencia del camino óptico, a la densidad de potencia espectral en un número de onda en particular $\bar{\nu}$, dado por $B(\bar{\nu})$: (Stuart, 2004)

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\bar{\nu}$$

que es el medio par coseno de la transformada de Fourier, siendo este:

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\delta$$

Estas dos ecuaciones son interconvertibles y se conocen como transformada de Fourier par. El primero muestra la variación en la densidad de potencia como una función de la diferencia en el “*pathlength*”, que es un patrón de interferencia. El segundo muestra la variación en intensidad como función del número de onda. Cada uno puede convertirse en el otro por el método matemático de transformación de Fourier (Stuart, 2004).

2.4.7. VENTAJAS DEL ESPECTRÓMETRO DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Comparado con los instrumentos dispersivos; un espectrómetro con transformada de Fourier brinda una mejor relación señal/ruido para una determinada resolución, mayor exactitud de frecuencia, velocidad (ahorro de tiempo considerable) y posibilidades para incorporar procesamiento de datos. Esta mejora se debe principalmente a que el espectrómetro con transformada de Fourier usa la energía de todo el espectro, en lugar de analizar sucesivamente pequeñas bandas de onda procedentes del monocromador. La reproducción precisa de la posición del número de onda de un espectro al siguiente, propia de los espectrómetros con transformada de Fourier, permite promediar las señales de múltiples barridos, para mejorar aún más la relación señal / ruido. La precisión del número de onda y los bajos niveles de ruido permiten restar espectros que difieren poco entre sí, y utilizar estas pequeñas diferencias (Harris, 2012; Hesse *et al.*, 2005).

2.4.8. TÉCNICAS DE MUESTREO

Existen diferentes métodos de muestreo, teniendo cada técnica sus propias ventajas y limitaciones. Los métodos de transmitancia y reflectancia, son parte de aquellos que permiten su uso en ambas espectroscopias de FT- NIR y FT- MIR (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2008).

Las técnicas de reflectancia se pueden utilizar para muestras que son difíciles de analizar por métodos de transmitancia, pues la preparación de muestra es más fácil y rápida, no es destructivo y no está influenciado por el grosor de la muestra, por lo que, tiene un amplio uso en análisis de alimentos. Además, la profundidad de penetración en la muestra no se conoce con exactitud y la superficie de esta influencia los espectros más que el interior. Sin embargo, estas desventajas son normalmente ensombrecidas por la simplicidad y la velocidad de la técnica. Basado en el tipo de reflectancia de la muestra, la técnica incluye reflectancia especular, reflectancia difusa y reflectancia total atenuada (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2008).

La reflectancia total atenuada (ATR) es una de las técnicas comúnmente empleada. Cuando un rayo infrarrojo viaja desde un medio de alto índice de refracción (cristales de materiales como los mencionados en la Tabla 9) a un medio de bajo índice de refracción (muestra), cierta cantidad de luz se refleja nuevamente al medio de bajo índice, como se esquematiza en la Figura 12. En un ángulo de incidencia particular, casi todas las ondas de luz se reflejan hacia atrás. Este fenómeno se llama reflexión interna total. En esta condición, cierta cantidad de la energía de la luz escapa del cristal y se extiende una pequeña distancia (0.1 - 5 μm) más allá de la superficie en forma de olas. Esta ola invisible se llama ola evanescente. La intensidad de la luz reflejada se reduce en este punto. Este fenómeno se llama reflectancia total atenuada. Cuando la muestra se aplica sobre el cristal, la cantidad de radiación infrarrojo que penetra más allá del cristal es absorbida por la muestra. Esta absorbancia se traduce al espectro infrarrojo de la muestra. Sin embargo, esta técnica está limitada por la homogeneidad de la muestra características bien definidas (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2008).

Tabla 9: Materiales usados como cristales de ATR y sus propiedades

MATERIAL	RANGO (cm⁻¹)	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	PROPIEDADES
Yoduro de talio (KRS-5)	17 000 – 250	2.4	Soluble en bases, ligeramente soluble en agua, insoluble en ácidos, tóxico
Seleniuro de zinc (ZnSe)	20 000 – 500	2.4	Insoluble en agua, solventes orgánicos, ácidos y bases diluidas
Germanio (Ge)	5 000 – 550	4.0	Insoluble en agua, muy delicado

FUENTE: Stuart (2004)

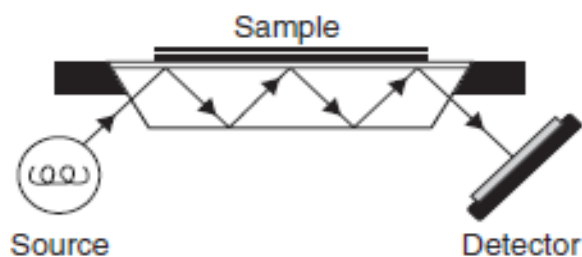


Figura 12: Diagrama de la técnica de muestreo por reflectancia total atenuada

FUENTE: Stuart (2004)

2.5. QUIMIOMETRÍA

La Quimiometría es la disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos óptimos y con ello obtener la máxima información química mediante el análisis de datos químicos (Ramis & García, 2001).

Dicha disciplina mejora el entendimiento de la información química y la correlaciona a parámetros de calidad o propiedades físicas de la información de un análisis instrumental. Con el avance de la tecnología en las computadoras, los métodos quimiométricos se han convertido en una importante herramienta pues son rápidos (Bansal *et al.*, 2014).

2.5.1. CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE

La calibración se define como el conjunto de operaciones que establecen, en las condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento de medida (la señal obtenida) y los valores conocidos correspondientes a la propiedad analítica que se pretende medir (Uribe, 2010). Para Muñoz (2013), la analogía matemática que relaciona la señal analítica con la concentración se denomina modelo o ecuación de calibración y la representación gráfica recibe el nombre de curva de calibración. La calibración multivariable es una de las más frecuentes herramientas de la quimiometría (Gezahegn, 2018).

Entre todas las técnicas quimiométricas existentes, la más utilizada por el sector industrial es la de la calibración multivariable, empleada para el análisis cuantitativo. Esta técnica permite correlacionar dos tipos de medidas aplicadas sobre una misma muestra, una medida obtenida de forma rápida, directa, económica y que proporciona múltiples variables a la vez, con otra más compleja de obtener, que suele ser más cara y/o laboriosa en su preparación o en el análisis que se requiere. Esta última es la que se toma como medida de referencia. Con ambos tipos de datos se pueden construir modelos de calibración que pueden predecir las concentraciones del analito de interés a través de la señal analítica registrada mediante la técnica rápida (Muñoz, 2013).

Por otro lado, no hay bibliografía sobre el número de muestras necesarias para una buena calibración, pero si se sabe que un gran número de muestras proporciona modelos confiables pues la regresión de Mínimos Cuadrados Parciales tiene la propiedad de que la precisión de los parámetros del modelo mejora con el número creciente de variables relevantes y observaciones (Porcel, 2001).

2.5.2. ETAPAS PARA CONSTRUIR UN MODELO DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE

Los pasos a tener en cuenta en un desarrollo de una calibración multivariable se encuentra perfectamente sistematizados en la norma ASTM E 1655-97 (*Standard Practices for Infrared, Multivariate, Quantitative Analysis*) y son las siguientes (Ríos *et al.*, 2012):

A) Selección del conjunto de calibración

El conjunto de calibración o de entrenamiento, es crucial para asegurar la fiabilidad del modelo. Las muestras de calibración deben contemplar todas las posibles fuentes de variación que posteriormente se van a encontrar en las muestras a analizar. De esta forma el efecto de los demás componentes de la muestra se modela y es posible la cuantificación de un analito. Por otra parte, deben cubrir un intervalo de concentración suficientemente grande de poder para poder construir un modelo fiable (Ríos *et al.*, 2012).

En el caso de muestras de origen natural (por ejemplo, alimentos), es necesario disponer de un conjunto muy grande que contemple tanto la variabilidad en concentración como la diferencia estacional o de origen o factores como el tipo de suelo, variedad conllevan a obtener un modelo de calibración más confiable. En este caso el problema reside en seleccionar un conjunto representativo de muestras (Ríos *et al.*, 2012; Zossi *et al.*, 2010).

B) Registro de los espectros

Una vez diseñado el conjunto de calibración deben obtenerse las señales analíticas sometiendo los distintos objetos al procedimiento instrumental. La obtención de la señal consiste en el registro de los respectivos espectros dentro de la región que se considere conveniente. Después de que el instrumento proporciona los datos, estos se almacenan y quedan disponibles para su posterior tratamiento (Uribe, 2010).

C) Selección del algoritmo de calibración

Para Martens & Naes (1989), construir un modelo de calibración consiste en aplicar una serie de herramientas matemáticas sobre la señal analítica que permitan establecer la relación entre ésta (concentración de un analito) y la propiedad o parámetro que se pretende determinar de la muestra, en caso el modelo sea por un análisis cuantitativo.

D) Aplicación del modelo a muestras desconocidas (Validación)

La validación consiste en el análisis de un grupo de muestras independiente al utilizado en la calibración (conjunto de validación) y comprueba que no existe un error sistemático entre las predicciones que realizan el modelo y los valores proporcionados por el método de referencia para un tipo dado de muestras. También se mide el grado de concordancia entre las predicciones del modelo y los valores del método de referencia (Macho, 2002; Uribe, 2010). Aunque si el número de muestras disponibles es limitado, la metodología a seguir es la denominada “validación cruzada”, la cual utiliza muestras del bloque de calibración para comprobar el modelo (Ríos *et al.*, 2012).

2.5.3. REGRESIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

El método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS, *Partial Least Squares*) es un método de calibración multivariante que es capaz de relacionar la concentración de elementos directamente con espectros medidos o porciones de ellos (Araujo *et al.*, 2005).

Este método es ideal para construir modelos predictivos cuando las variables son muchas, incluso mayor al número de observaciones, y son altamente colineales (Martínez & Barrios, 2016). Nótese que el énfasis está en predecir las respuestas y no en tratar de entender la relación existente entre las variables (Tobías, 1996; Araujo *et al.*, 2005).

Ríos *et al.* (2012) indican que si hay relación entre los espectros y los valores del parámetro que se cuantifica, la variación en Y debe ser a causa de la variación en X. Un modelo PLS intenta encontrar la dirección en el espacio de las X (variables espectrales) que explica la

máxima varianza en el espacio de las Y (matriz de concentraciones). Para ello descompone simultáneamente ambas matrices de forma que se maximiza la covarianza entre ambas. El modelo PLS puede considerarse como consistente de dos relaciones externas (matrices **X** e **Y**) y una relación interna (Araujo *et al.*, 2005). Cada una de las matrices se descompone, de forma que, simultáneamente se calculan:

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \end{aligned}$$

donde, si tenemos *n* muestras, *A* factores (variables latentes), *p* variables y *m* variables dependientes de la concentración, las matrices **T** y **U**, de dimensiones (*n* x *A*), son, respectivamente, las matrices de puntuaciones (*scores*) de los bloques **X** e **Y**. Las matrices **P^T** y **Q^T** son las matrices de cargas (*loadings*) de los bloques **X** e **Y**, con dimensiones (*A* x *p*) y (*A* x *n*), y **E** y **F** son las matrices residuales del bloque **X** y del bloque **Y**, respectivamente. El método PLS maneja el problema de colinealidad comprimiendo la matriz **X** de datos **X** = [*x*₁, *x*₂, . . . , *x*_{*p*}], en un número de *A* variables **T** = [*t*₁, *t*₂, . . . , *t*_{*A*}] (Ríos *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2005).

En esencia, la relación interna es un ajuste de mínimos cuadrados entre el bloque de scores **X** y el bloque de *scores* cuando todos los *scores* y *loadings* son calculados, el modelo PLS final queda como:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{BTQ}' + \mathbf{F}^*$$

en la cual la matriz **F*** es la matriz que contiene los residuales (variaciones no descritas por el modelo) y un coeficiente denominado **B** (Araujo *et al.*, 2005). En la Figura 13 se muestran gráficamente las relaciones expuestas en las ecuaciones mencionadas.

El método PLS comprime las variables originales en un número de factores o variables latentes. La primera variable latente tiende a describir la variancia sistemática en los datos (relación entre espectros y concentraciones) y en menor extensión el ruido. Cuando el número de factores se incrementa, la contribución del ruido se incrementa. Si este es el caso,

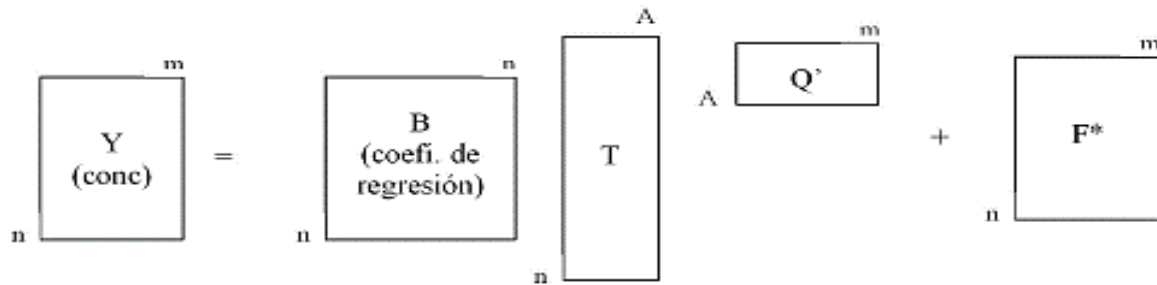
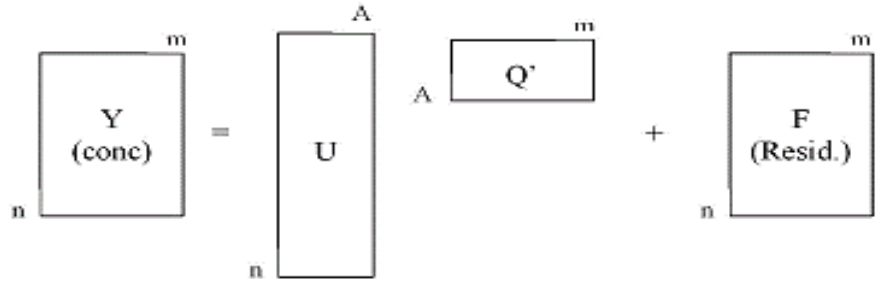
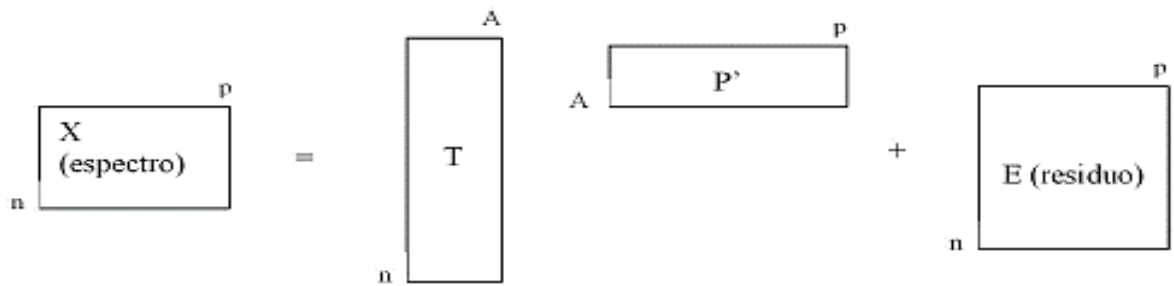
no se está modelando la variancia en los datos sino el ruido, lo que se conoce como un sobreajuste u *over-fitting*, obteniendo un modelo con baja capacidad de predicción. En consecuencia, obtener el número óptimo de factores un punto clave para la calibración (Araujo *et al.*, 2005; Martínez & Barrios, 2016; Tobías, 1996).

En adición, Porcel (2001) señala que para determinar el número óptimo de factores se debe realizar el método de validación cruzada o *cross validation*. Para lo cual, hay que calcular diferentes modelos con distinto número de factores y validando cada uno, asegurándose que al representar el valor de Error Estándar de Validación Cruzada (SECV, *Standard Error of Cross Validation*) sea el mínimo frente al número de factores (Infometrix, 2014; Ferré, 2006). Según se muestra en la Figura 14, el modelo predice mejor con 3 factores; puesto que con 1 o 2 factores estaría sub ajustado, es decir, estos pocos factores no son suficientes para modelar todas las variaciones relevantes de los espectros y no “afinan” la predicción. Los modelos con más de tres factores están sobreajustados, describen más ruido que información relevante, lo que empeora la predicción del modelo (Ferré, 2006).

La técnica de validación cruzada dejar-uno-afuera (LOOCV, *leave- one- out cross validation*) es generalmente utilizada cuando está disponible solamente un número limitado de muestras para construir y validar una calibración. Cada muestra es excluida del conjunto de datos y el modelo PLS es construido basado en las muestras restantes. Una vez construido el modelo de calibración, la muestra excluida es predicha y la desviación se almacena. Esto se realiza hasta que todas las muestras son excluidas una vez (Araujo *et al.*, 2005).

Por otra parte, Ríos *et al.* (2012) recomienda tomar en cuenta aspectos relevantes para la construcción del modelo como que:

- Muestras de calibración anómalas (*outliers*). La presencia de estas muestras (espectrales o de concentración) en el set de calibración reduce considerablemente la calidad del modelo, por lo que han de ser detectadas y eliminadas.



X: variables espectrales

Y: matriz de concentraciones

n: número de muestras

A: factores (variables latentes)

p: variables

m: variables dependientes de la concentración

T y **U**: matrices de las puntuaciones (*scores*) de los bloques **X** e **Y**.

P^T y **Q^T**: *loadings* de los bloques **X** e **Y**.

B: coeficiente de regresión

E: matriz residual del bloque **X**

F: matriz residual del bloque **Y**

Figura 13: Representación gráfica de las relaciones (matrices) del modelo PLS

FUENTE: Araujo *et al.* (2005)

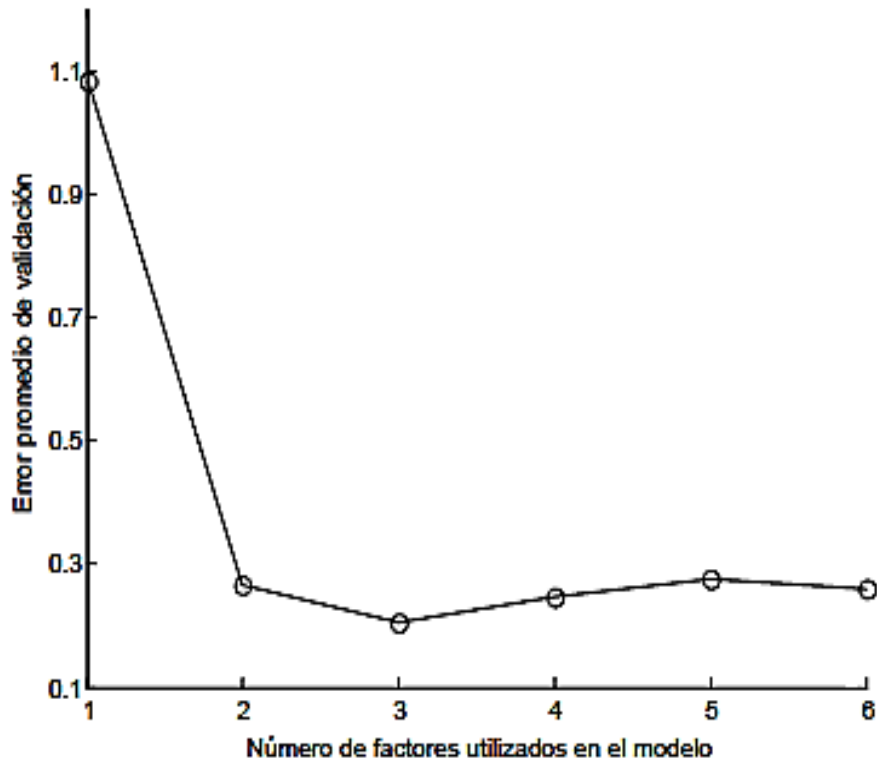


Figura 14: Error estándar de validación cruzada vs el número de factores de un modelo

FUENTE: Ferré (2006)

- Intervalo de longitudes de onda. Aunque es habitual utilizar todo el espectro, la eliminación de los intervalos en que el analito no absorbe, o en los que hay presente una mayor cantidad de ruido, mejora la precisión del modelo.
- Si en los datos espectrales existe una fuente de variabilidad muy grande no relacionada con la concentración del analito es posible que influya en la descomposición de matrices.

2.5.4. PRE TRATAMIENTO DE LOS ESPECTROS

El pretratamiento de los espectros tiene como finalidad mejorar la capacidad de predicción del modelo y eliminar o reducir los efectos o contribuciones no asociadas con la información buscada, las cuales afectan significativamente la precisión y exactitud de las predicciones

del modelo, su eficiencia en la reducción del ruido depende de su naturaleza y del método de pretratamiento usado (Campoverde, 2013).

Los métodos de pre procesamiento de datos se dividen en tres categorías:

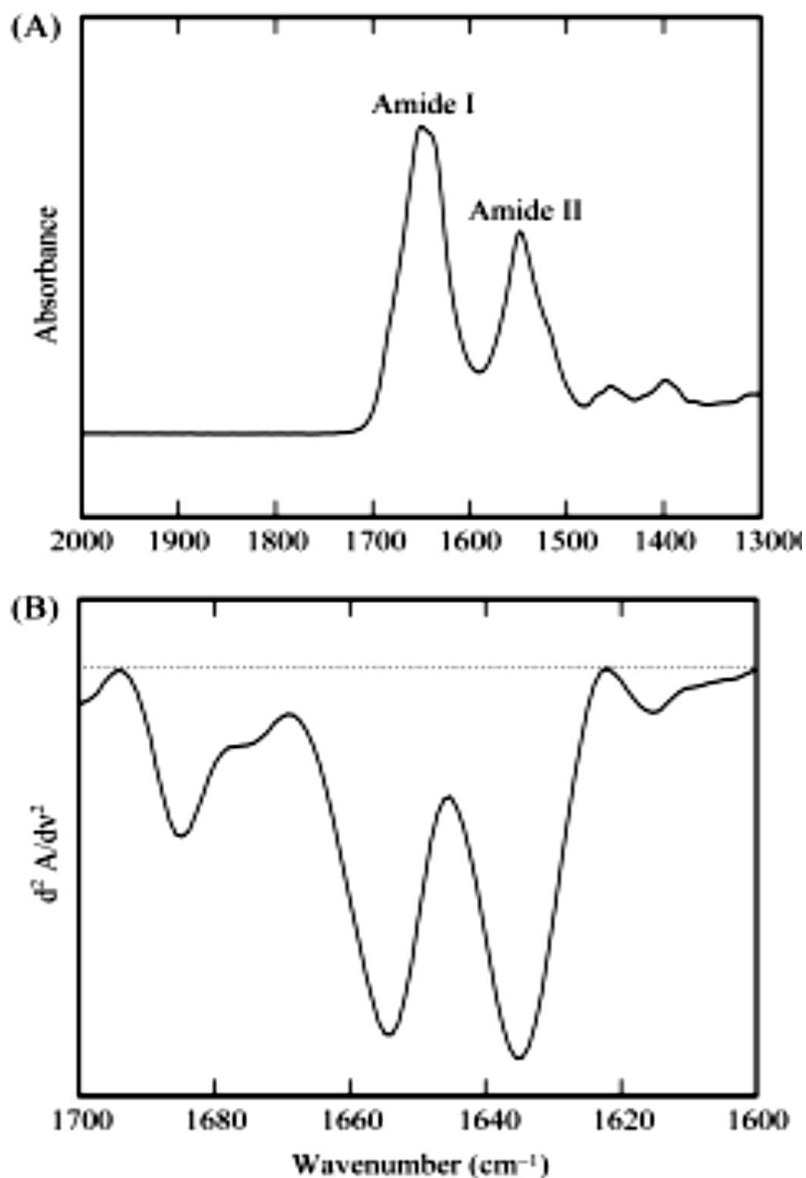
- Métodos para eliminación de ruido y filtrado: estos métodos no tienen supervisión y se aplican antes de la modelización, ayudan a eliminar la influencia de la variación aleatoria sin afectar la señal (Campoverde, 2013).
- Métodos clásicos para normalización espectral y la derivación (por ejemplo, la segunda derivada) que son métodos sin supervisión y se aplican antes de modelar sin considerar la respuesta (Campoverde, 2013).
- Métodos para la selección de variables y reducción de la dimensionalidad eliminando sistemáticamente la variación presente en X que no es importante para la predicción de Y (Campoverde, 2013).

La ventaja de la derivatización se aprecia más fácilmente para espectros más complejos y como muestra la Figura 15, el espectro cambia al usar la derivación para resolver y localizar picos (Riba, 2012). Las bandas se mejoran a expensas de las amplias y esto puede permitir la selección de un pico adecuado, incluso cuando hay una banda ancha debajo. Es decir, la segunda derivada proporciona un pico negativo para cada banda y hombro en el espectro de absorción (Stuart, 2004).

2.5.5. EVALUACIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

Acerca de la calidad de un modelo de calibración se tiene en cuenta los parámetros como: el Error Estándar de Calibración (SEC, *Standard Error of Calibration*) que tiene las mismas unidades de la variable dependiente, el Error Estándar de Validación Cruzada (SECV, *Standard Error of Cross Validation*) y el coeficiente de determinación de calibración (r_c^2) y

de validación (r_v^2) que nos indica la capacidad predictiva del modelo (Grijalva *et al.*, 2018; Shenk y Westerhaus, 1993, citado por Cozzolino, 2002).



(A) Espectro original (B) Espectro de la segunda derivada

Figura 15: Mejora de la resolución de un contorno de banda complejo de bandas infrarrojas superpuestas

FUENTE: Kong & Yu (2007)

Para calcular la segunda derivada de los datos espectrales se utiliza el algoritmo de Savitzky y Golay que no daña la relación señal-ruido (Riba, 2012).

Los modelos de calibración seleccionados se dan sobre la base de minimizar los parámetros estadísticos SECV, SEC (Cozzolino, 2002; Zossi *et al.*, 2010) y la cantidad de factores que optimiza el ajuste de los datos al observar la varianza (Gayo *et al.*, 2006; citado por Rohman *et al.*, 2011). Además, Sapienza *et al.* (2008) recomiendan que los valores SECV y SEC sean cercanos, puesto que si difieren significativamente el modelo de predicción es débil. Referente al coeficiente de determinación r^2 , es un valor adimensional que indica el mejor ajuste de los valores pronosticados frente a los valores de referencia asociados. Es así que un r^2 de 1 significa que el 100% de la varianza del analito se explica por la ecuación de predicción (Sapienza *et al.*, 2008; Martínez, 2005).

El error estándar de calibración se calcula como (Zossi *et al.*, 2010):

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

Donde:

y_i = valores de laboratorio usados en la calibración

Y_i = valores predichos del modelo

n = número de muestras

t = número de componentes principales

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó de enero del 2017 a marzo del 2018 en los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), siendo los siguientes:

- Laboratorio de Ingeniería de Alimentos: Lectura de espectros con el equipo portátil de espectroscopia infrarroja FTIR-ATR.
- Laboratorio de Biotecnología de Alimentos: Desgrasado y preparación de las muestras de tarwi molido amargo y desamargado.
- Laboratorio de Físico-química: Cuantificación de proteínas en las muestras de tarwi amargo y desamargado por el método Kjeldahl.
- Laboratorio de Microbiología de Alimentos: Cuantificación de fenólicos totales en las muestras de tarwi amargo y desamargado con el lector de micropozos.
- Laboratorio de Semillas del Programa de Leguminosas: Lectura de humedad y pesado de las muestras de tarwi amargo y desamargado.

3.2. MATERIA PRIMA

Para la realización de esta investigación, el Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas brindaron 150 gramos de semillas de 52 ecotipos diferentes de tarwi (*Lupinus mutabilis*), los cuales se encuentran listados en el Anexo 1. El número variable de unidades de muestra de cada región peruana fueron seleccionados de manera aleatoria.

La población considerada fueron los ecotipos de *Lupinus mutabilis* de las regiones de La Libertad, Junín, Cuzco, Ancash, Puno, Huánuco, Huancavelica, Apurímac y Cajamarca y Lima

3.2.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.2.2. MATERIALES

- Bureta de 25 mL (Pyrex, USA)
- Pipetas de 5 mL
- Gradilla
- Tubos ependorf de 1,5 mL (Simport, Cánada)
- Vasos beaker de 50 mL y 250 mL (Pyrex, USA)
- Fiolas de 50 mL y 10 mL (Pyrex, USA)
- Probeta graduada de 50 mL y 100 mL (MArienfeld)
- Micropipeta Rainin de 20 - 200 μ L (Mettler Toledo, USA)
- Micropipeta multicanal Rainin de 30-300 μ L (Mettler Toledo, USA)
- Micropipeta Rainin de 100-1000 μ L (Mettler Toledo, USA)
- Tips para micropipeta 200 μ L, 300 μ L y 1000 μ L (Deltalab, España)
- Micro plate de 96 pocillos (Corning, USA)
- Embudo Bushner
- Matraces de 250 ml (Pyrex, USA)
- Matraces Kitazato de 500 ml (Pyrex, USA)
- Bombilla
- Pizeta
- Papel filtro (filtración rápida)
- Balones de digestión Kjeldahl
- Tubos de destilación Kjeldahl (Velp Scientifica)
- Soporte universal

3.2.3. EQUIPOS

- Bomba de vacío
- Molino de laboratorio 3100 (Perten Instruments)
- Balanza analítica Pioneer Analytical (Ohaus)
- Balanza electrónica de precisión PA1602 (Ohaus)

- Balanza de Humedad BL-MB23 (Ohaus)
- Estufa Venticell (MMM)
- Centrifuga U-320R (Boeco)
- Baño de ultrasonido UCS-05 (Lab Companion)
- Agitador magnético ARE (Velp Scientifica)
- Espectrómetro portátil de Infrarrojo con transformación de Fourier (Tru Defender FT, Thermo Fisher Scientific)
- Lector de Micropozos Power Wave XS2 (Biotek)
- Destilador Kjeldahl UDK129 (Velp Scientifica)

3.2.4. REACTIVOS

- Folín Ciocalteau 2N (Merck)
- Carbonato de sodio (Merck)
- Ácido gálico (Merck)
- Alcohol etílico absoluto (Fermont)
- Hexano (Tedia)
- Ácido sulfúrico (J.T. Baker)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker)
- Rojo de metilo (Merck)
- Verde de bromocresol (Merck)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Ácido bórico (Merck)
- Naranja de metilo
- Fenolftaleína (Merck)
- Sulfato de cobre pentahidratado (Merck)
- Sulfato de potasio (Merck)
- Metanol (J.T. Baker)

3.2.5. SOFTWARES

- Varian Resolutions Pro (Versión 4.0)

- Gen 5 (Versión 1.09.8)
- Modelado Quimiométrico Integral Pirouette ® (Infometrix) (Versión 4.0)

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.3.1. CONTENIDO DE HUMEDAD

Se determinó la humedad por el método rápido de termobalanza (NMX-F-428-1982)

3.3.2. CONTENIDO DE PROTEÍNA

El análisis de proteínas se realizó por el método oficial de Kjeldahl AOAC 920.87 (2005).

3.3.3. CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La extracción de compuestos fenólicos se realizó según Quiroz *et al.* (2013), con ciertas modificaciones. La relación tarwi molido parcialmente desgrasado (g): solvente (ml) fue de 1:20. El solvente fue una solución etanol al 50%. La mezcla fue sonicada dos veces en un baño de ultrasonido, siendo cada período de 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior, se centrifugó a 3000 RPM por 15 minutos a 5°C.

La cuantificación del contenido fenólico se realizó por el método de Folin Ciocalteu de Swain y Hillis, reportado por Glorio (2010) para formato de micropozos. Para ello se requirió obtener una curva de calibración con ácido gálico, la que se realizó bajo el procedimiento del Anexo 2. Las curvas de calibración empleadas para la cuantificación de compuestos fenólicos se muestran en el Anexo 3 (tarwi amargo) y 4 (tarwi desamargado), las cuales están diferenciadas debido que se trabajaron en diferentes días como forma de considerar las mismas condiciones para un mismo grupo de muestra.

Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100 gramos de muestra (tarwi integral) en base seca. Por lo cual, para cada muestra se determinó

el contenido de humedad (Anexo 5) y los valores de reducción de grasa (Anexo 6), siendo este último añadido al contenido de materia seca del tarwi molido parcialmente desgrasado.

3.3.4. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

a) Preparación de muestras:

Se empleó para la calibración de proteínas, muestras integrales de tarwi molido amargo y desamargado. Por el contrario, las muestras para la calibración de fenólicos totales fueron extractos metanólicos. Para lo cual, se pesó 0.1 g de tarwi integral molido en tubos ependorf, se agregó 0.4 ml de metanol y se sonicó en un baño de ultrasonido por 15 minutos. Posterior, se centrifugó a 3000 RPM por 15 minutos a 5 °C. La lectura se realizó luego de esperar que se evaporará el solvente de los aproximadamente 20 µL del extracto muestreado, una vez ubicado sobre el sensor del equipo de infrarrojo FTIR-ATR.

b) Medición de espectros

Los espectros fueron obtenidos usando un espectrómetro portátil de infrarrojo con transformación de Fourier (Tru Defender™) (FTIR) con ATR (reflectancia total atenuada). Aproximadamente se dispondrá una mínima cantidad de muestra (molido o extracto) de cada uno de los 52 ecotipos por separado. El espectro fue escaneado por duplicado a temperatura ambiente en un rango de 4000 – 700 cm⁻¹ de número de onda. El procedimiento se indica en el Anexo 7. Se recolectaron espectros de tarwi amargo y desamargado con una resolución de 3 cm⁻¹ (región del infrarrojo medio, MIR) y a partir de 8 barridos para cada lectura. Previamente, se obtuvo el espectro del fondo o *background* del aire. Todas las repeticiones de los espectros se utilizaron para la Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR).

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.4.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

En la Figura 16 se observa la secuencia para la obtención de tarwi molido desgrasado de cada ecotipo, con las operaciones descritas a continuación:

- a. Selección: Se retiraron las impurezas de las muestras (piedrecillas, pajas, otros) y granos de tarwi que estaban dañados.
- b. Pesado: Se pesaron los granos de tarwi amargo para calcular la cantidad de agua a utilizar en el remojo.
- c. Remojo: El remojo o hidratación se realizó en la proporción materia prima: agua de 1:6 (w/v). Ello se realizó en recipientes de plástico. El tiempo de remojo fue en promedio de 12 horas a temperatura ambiente.
- d. Cocción: La muestra remojada y escurrida fue cocida 2 veces (cada vez por 30 minutos) en la proporción de materia prima: agua 1:3 (w/v). El registro de tiempo de cocción inició cuando el agua alcanzó la temperatura de ebullición.
- e. Lavado: La proporción de grano: agua fue de 1:3 (w / v). El lavado se realizó por 5 días a temperatura ambiente, donde cada 12 horas se hizo cambio de agua.
- f. Secado: Los granos fueron secados en estufa a 50 °C por 18 horas. Posterior, se almacenaron en bolsas de polietileno hasta su molienda.
- g. Molienda: Los granos secos fueron molidos en un molino de laboratorio.
- h. Desengrasado: En un matraz se pesó tarwi molido y se adicionó hexano en una relación de 1:35 (w/v), dicha mezcla se agitó durante 10 minutos con un agitador magnético (Nadal *et al.*, 2011). Se filtró al vacío para separar el solvente con grasa de la muestra molida parcialmente desgrasada, esta última se depositó en placas Petri dentro de la campana extractora para eliminar residuos de solvente. Se separó la grasa del sobrenadante usando el equipo Soxhlet, para luego cuantificar el peso de grasa de cada muestra.
- i. Envasado: Las muestras se envasaron en bolsas de polietileno y se cubrieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y se almacenó a temperatura de refrigeración.

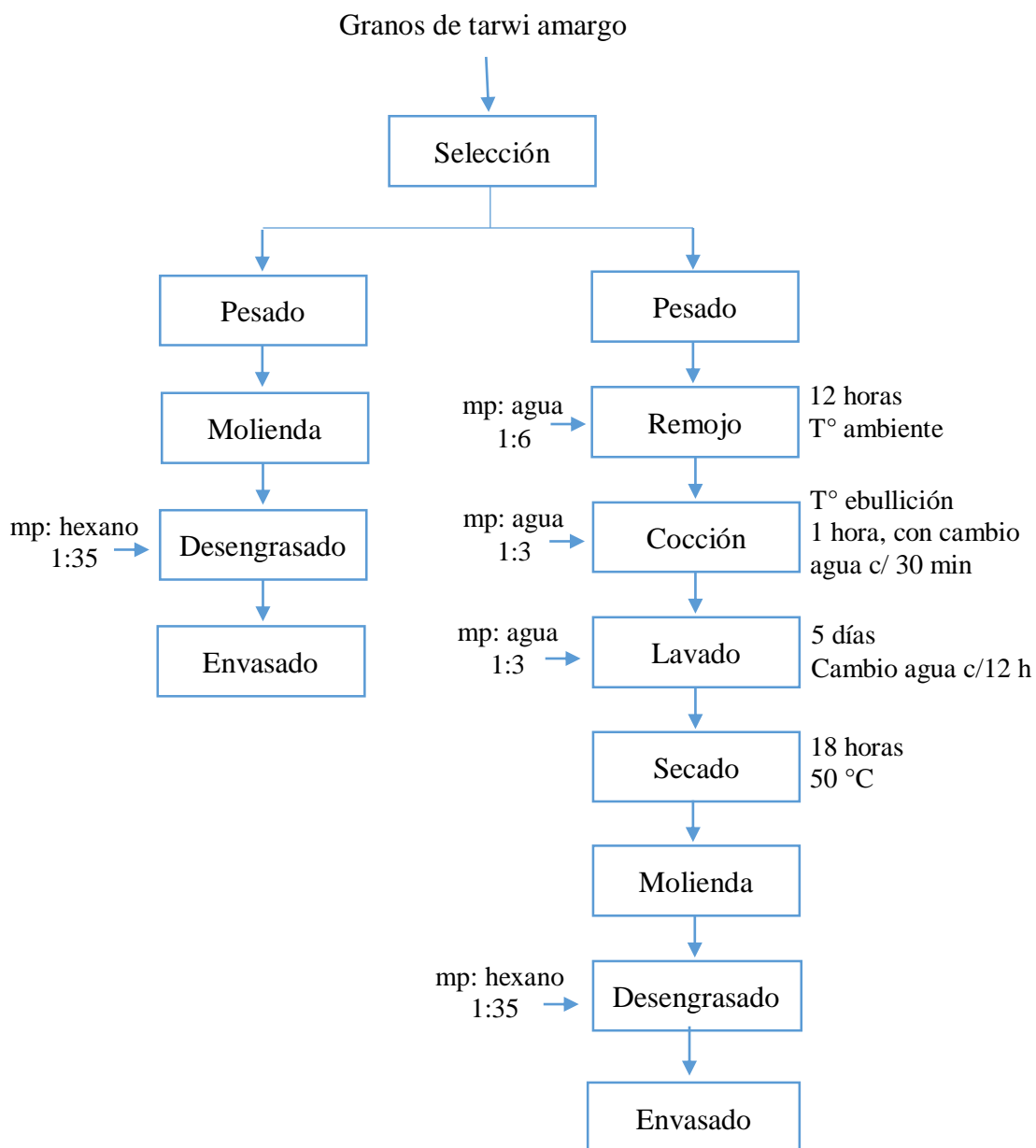


Figura 16: Flujo de operaciones para la obtención de tarwi molido parcialmente desengrasado

FUENTE: Adaptado de Mujica & Jacobsen (2006) y Nadal *et al.* (2011)

Para la obtención de las muestras molidas de tarwi amargo y desamargado requeridas para el análisis de proteínas, se siguió la secuencia de operaciones mostradas en la Figura 16, con excepción del proceso de desengrasado.

3.4.2. DESARROLLO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

De acuerdo al objetivo planteado, se desarrolló un modelo de calibración para el contenido de proteína y dos modelos independientes para el contenido de compuestos fenólicos totales, uno de tarwi amargo y otro de tarwi desamargado.

Se recibieron 52 ecotipos diferentes de tarwi, que fueron seleccionados por el Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas. Parte del contenido en grano de cada ecotipo, se desamargó como lo indica la Figura 16. Es así que, finalmente se tuvieron 104 unidades muestrales, las que fueron molidas para los análisis.

Para la calibración, primero se determinó el contenido de proteínas y compuestos fenólicos totales (en base seca) por métodos de referencia como Kjeldahl y Folin Ciocalteu, respectivamente. Posterior a ello, se registraron los espectros con el equipo portátil (FTIR-ATR) en el rango del infrarrojo medio (MIR) en todas las muestras molidas.

Para poder visualizar los espectros, codificarlos y convertirlos a un formato compatible (spc.) al programa estadístico se empleó el software Varian Resolutions Pro. Para el análisis estadístico con el software de Modelado Quimiométrico Integral Pirouette, se introdujeron los datos espectrales de las muestras por duplicado y se adicionaron los valores de proteína y de compuestos fenólicos totales correspondientes. Al correr varias veces la Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLSR) con todos los espectros, se observaron datos *outliers* que fueron excluidos y en algunos casos se retiraron también ciertas muestras para poder ajustar el modelo según los estadísticos recomendados y siguiendo los criterios de la Tabla 10. Además, fue necesario realizar un tratamiento matemático de los espectros (segunda derivada de la absorbancia respecto del número de onda ($d^2 A/d v^2$)). El programa Pirouette permitió realizar la validación cruzada que se ejecuta extrayendo un espectro con su respectivo contenido químico (sea proteína o de compuestos fenólicos) y probando su poder de predicción con el modelo creado de la data restante. Toda esta secuencia de actividades está diagramada en la Figura 17 para la calibración del contenido proteico y en la Figura 18, para los compuestos fenólicos totales.

Tabla 10. Estadísticos evaluados para la selección de modelos MIR

ESTADÍSTICO	PARÁMETRO	OBSERVACIÓN
n	El mayor número posible	El modelo debe tener la mayor cantidad de n
SEC	El menor posible	-
SECV	Cercano al valor SEC	Valores lejanos al SEC indica un modelo de predicción débil
r^2_{cal}	Cercano a 1	Indica alta confiabilidad en la predicción
r^2_{val}	Cercano a 1	No debe ser menor al r^2_{cal} , pues indica un set de calibración no homogéneo

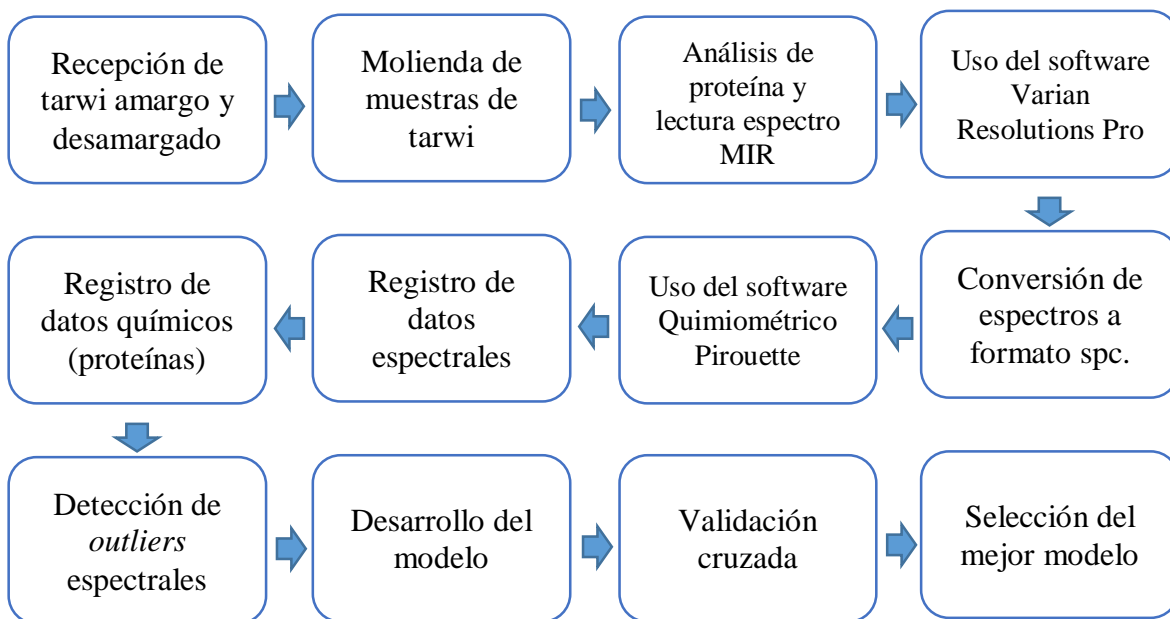


Figura 17. Protocolo para el desarrollo de la calibración del contenido de proteínas en tarwi

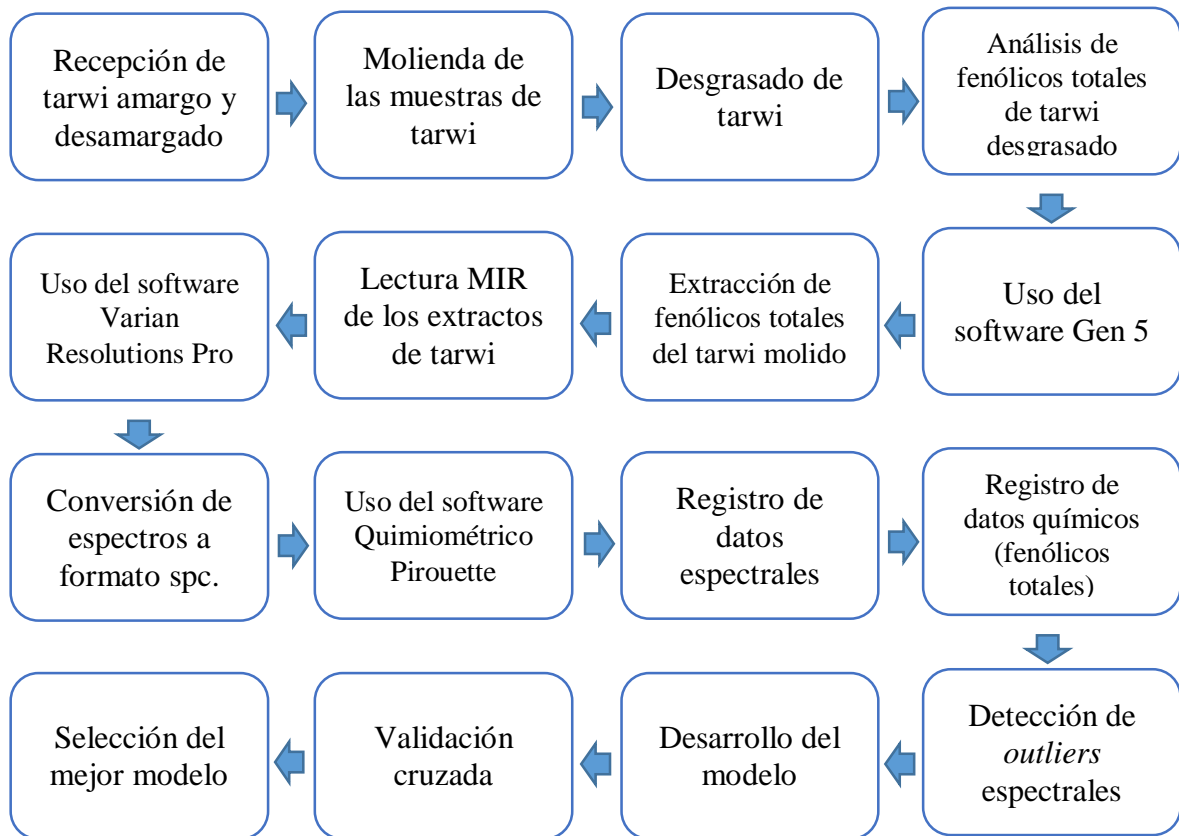


Figura 18. Protocolo para el desarrollo de la calibración del contenido de fenólicos totales en tarwi

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

La Tabla 11 indica las operaciones y análisis realizados en la presente investigación, el cual partió de la obtención de muestra hasta la calibración del contenido de proteínas y de compuestos fenólicos. Además, se muestra en la Tabla 12 la matriz de consistencia.

Tabla 11: Esquema del diseño experimental para la calibración de proteína y compuestos fenólicos totales

ETAPAS	PREPARACIÓN DE MUESTRAS				ANÁLISIS QUÍMICO (MÉTODO DE REFERENCIA)	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO	DESARROLLO DE MODELO ESTADÍSTICO (CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE)	VALIDACIÓN CRUZADA Y EVALUACIÓN
	RECEPCIÓN	DESAMARGADO	MOLIENDA	DESENGRASADO EXTRACCIÓN				
52 ECOTIPOS DE TARWI								
ANÁLISIS		Reducción de grasa			<ul style="list-style-type: none"> - Método Kjeldahl (proteínas) - Método Folin Ciolcateau (fenólicos totales) 	Espectrómetro ATR – FTIR	Regresión Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR)	<ul style="list-style-type: none"> - Número de factores - SEC - SECV - r_{cal}^2 y r_{val}^2

— Para la calibración de proteína

..... Para la calibración de compuestos fenólicos totales

Tabla 12: Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
<p>Actualmente existe un gran interés por desarrollar productos nutritivos, es así que el tarwi cuenta con un gran potencial como materia prima en nuestra región, sin embargo, requiere ser desamargado previo a su consumo. Dicho proceso acuoso genera no solo la pérdida de alcaloides sino de otros nutrientes.</p> <p>El problema es que no existen métodos rápidos</p>	<p>Desarrollar 3 modelos de calibración para determinar el contenido proteico y fenólico en 52 ecotipos de tarwi empleando espectroscopia infrarroja media y la regresión de Mínimos Cuadrados Parciales.</p> <hr/> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cuantificar el contenido de proteínas y de compuestos fenólicos totales en 52 ecotipos de tarwi amargo y desamargado por el método Kjeldahl y Folin Ciocalteu. 	<p>Es posible realizar modelos de calibración para realizar estimaciones rápidas de los contenidos de proteínas y fenólicos en tarwi.</p>	<p>Variable independiente: X (variables espectrales)</p> <p>Variable dependiente: Y (Contenido del analito)</p> <p>Unidad de Análisis: Cada ecotipo de tarwi (amargo y desamargado)</p> <p>Población: Ecotipos de <i>Lupinus mutabilis</i> de las regiones de La Libertad, Junín, Cuzco, Ancash, Puno, Huánuco, Huancavelica, Apurímac y Cajamarca.</p>	<p>Tipo de investigación: Experimental.</p> <p>Nivel de investigación: Descriptivo cuantitativo</p> <p>Diseño de Investigación: Cuantitativa.</p> <p>Técnicas de recolección de datos.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Método de Kjeldhal para el contenido proteico. - Método Folin Ciocalteu para el contenido de fenólicos. - Medición de espectros en el rango infrarrojo de 4000 a 700 cm⁻¹.

<p>y confiables que cuantifiquen ciertos compuestos como proteínas y fenólicos totales en tarwi antes y después de desamargar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Identificar las bandas relacionadas a proteínas y compuestos fenólicos totales en el espectro infrarrojo del tarwi amargo y desamargado. • Establecer un modelo de calibración al relacionar el contenido proteico con los espectros del tarwi amargo y desamargado. • Establecer dos modelos de calibración al relacionar el contenido de los compuestos fenólicos totales con los espectros del tarwi amargo y del desamargado. • Validar la solidez del modelo quimiométrico mediante parámetros estadísticos. 		<p>Muestra:</p> <p>Se seleccionó de modo aleatorio un número variable de unidades de muestra de cada región peruana. Se colectaron en total 52 ecotipos de tarwi.</p>	<p>Análisis de contrastación de hipótesis.</p> <p>Estadístico matemático (Mínimo Cuadrado Parciales)</p> <p>Parámetros estadísticos para evaluación del error y ajuste al modelo: SEC, SECV, r^2_{cal} y r^2_{val}</p>
--	--	--	--	---

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación, se logró establecer un modelo de calibración confiable para predecir el contenido de proteína de los 52 ecotipos peruanos de tarwi amargo y desamargado. En caso de los 2 modelos de calibración para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales en tarwi amargo y desamargado se logró una predicción de contenidos aproximados. Estas calibraciones (modelos quimiométricos) se obtuvieron relacionando contenidos químicos, determinados por métodos referenciales, con los espectros de tarwi en la zona del infrarrojo medio (MIR). Dichos modelos se trabajaron empleando análisis multivariado de Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR) fueron validados internamente y evaluados por los parámetros estadísticos del error que indican la confiabilidad de estos.

Considerar que, las muestras desgrasadas se emplearon en el análisis de compuestos fenólicos para evitar que los lípidos y sus productos de oxidación que se extraen también con soluciones alcohólicas, afecten los resultados de la determinación (Lampart *et al.*, 2003; Tsaliki *et al.*, 1999). Para el análisis de proteínas, se usaron las muestras de manera integral.

4.1. CONTENIDO DE PROTEINA EN TARWI

En el Anexo 8 y 9 se presentan los contenidos de proteínas y fenólicos totales, respectivamente; de las muestras molidas de 52 ecotipos de tarwi amargo y desamargado.

En la Figura 19 se presenta un histograma sobre el contenido de proteína en muestras molidas de tarwi amargo con barras de intervalo de 1.4 %. Además, se aprecia que las variedades con mayor nivel proteico, que se encuentran en un rango de 41.6 a 44.5 %, fueron: Altagracia, PLGO 3, Patón grande, Cholo fuerte y Yana tarwi y Yanamucllo PLGO, provenientes de las regiones de La Libertad, Ancash y Junín, como indica el Anexo 1. En el siguiente rango, entre 38.7 a 41.6 % de proteína se encuentran la mayoría de ecotipos amargos analizados.

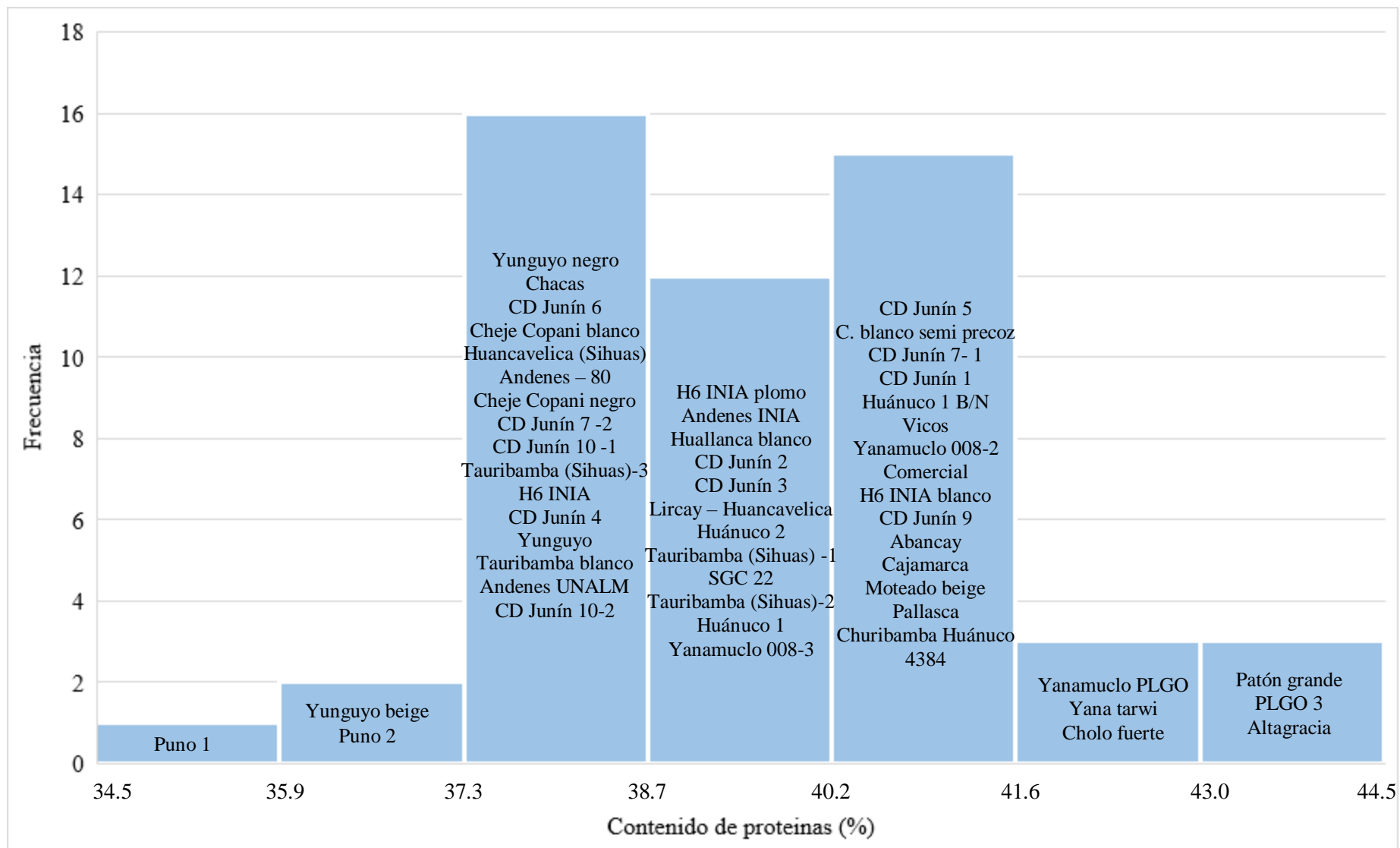


Figura 19. Histograma del contenido de proteínas en tarwi amargo (52 ecotipos)

Los ecotipos denominados Puno 2, Yunguyo beige y Puno 1, provenientes de la región Puno, fueron los que presentaron el menor contenido proteico.

Mediante la prueba estadística Chi cuadrado ($\alpha = 0.05$), se obtuvo que la población de muestra muestras de tarwi amargo respecto a su contenido de proteínas siguió una distribución normal, que se observa también en la Figura 19.

El histograma de la Figura 20 indica la cantidad de ecotipos de tarwi desamargado según sus contenidos proteicos, con intervalos de banda de 2.5 %. De manera decreciente, las variedades que mostraron contenidos más altos de proteína (55.4 a 57.9 %) fueron: Pallasca, Cajamarca y Yanamucllo PLGO, provenientes de las regiones Ancash, Cajamarca y Junín, respectivamente. Cabe señalar que, entre 45.5 a 55.4 % de proteína, se registraron la mayor cantidad de ecotipos de tarwi desamargado. Los ecotipos Lircay-Huancavelica, Compuesto blanco semi precoz, Puno 2, Cholo fuerte y H6 INIA blanco alcanzaron el menor porcentaje (40.5 a 45.5 %) que son de las regiones Huancavelica, Junín, Puno y Ancash. Además, la Figura 20 presenta los contenidos de proteínas del tarwi que se distribuyen normalmente desarrollado por la prueba estadística Chi cuadrado ($\alpha = 0.05$). Es decir, a pesar del cambio en la composición en el tarwi por el desamargado, los contenidos proteicos se encuentran dentro del rango determinado para una misma población.

4.2. CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI

En la Figura 21 se presenta la distribución de ecotipos según su contenido fenólico en el tarwi amargo (intervalos de 98.3 mg EAG / 100 g), y en la Figura 22, de los ecotipos desamargados (intervalos de 110.2 mg EAG / 100 g).

En la última banda de la Figura 21, se muestra las variedades de tarwi amargo que alcanzaron mayor contenido de fenólicos totales, correspondiente al rango entre 518.9 a 533.9 mg EAG / 100 g, los cuales fueron: Compuesto blanco semiprecoz, CD Junín 2, Andenes INIA, CD Junín 3, CD Junín 1, Moteado beige, provenientes de la región Cuzco y principalmente de Junín. Además, la mayor parte de los ecotipos analizados obtuvieron contenidos superiores

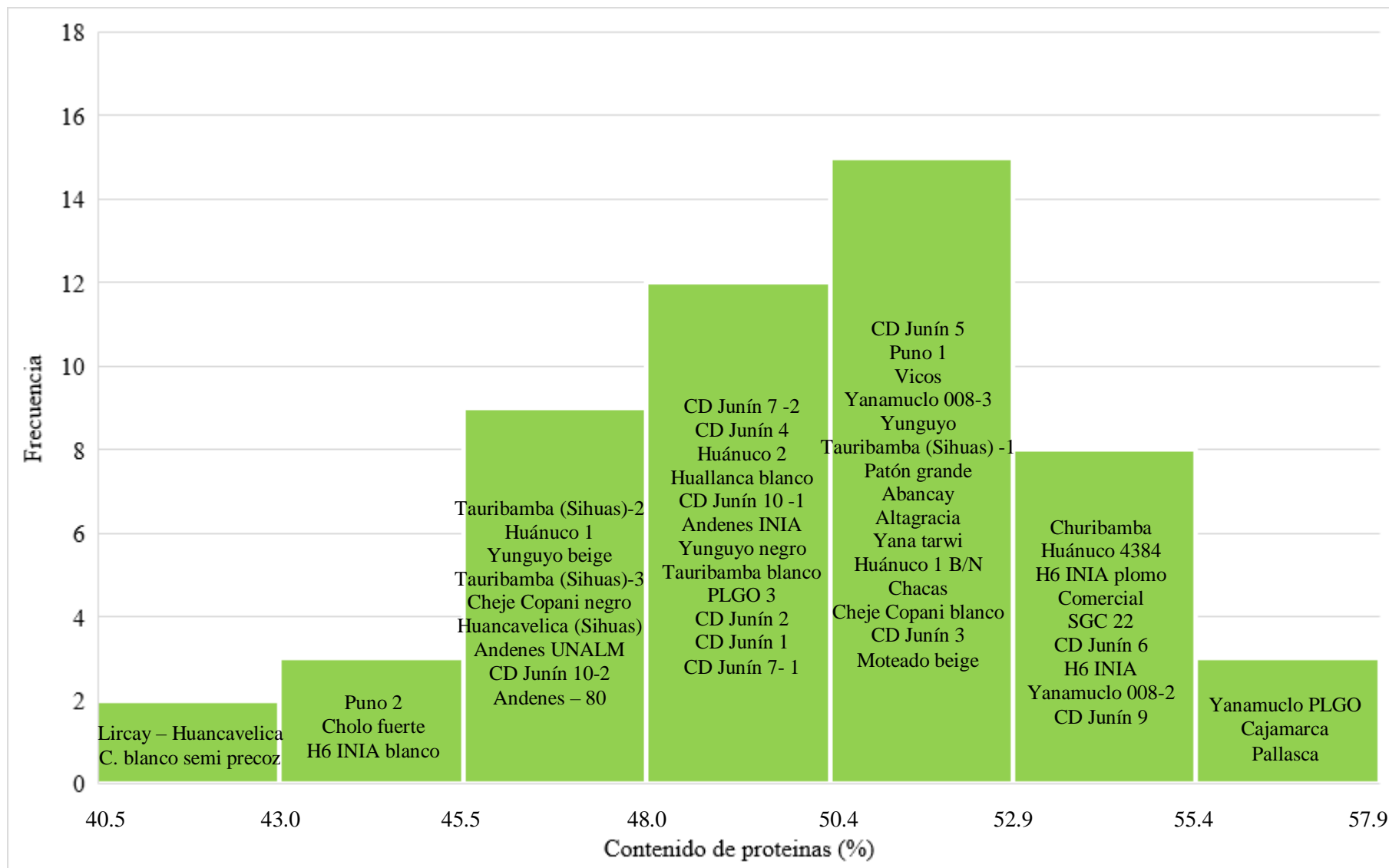


Figura 20. Histograma del contenido de proteínas en tarwi desamargado (52 ecotipos)

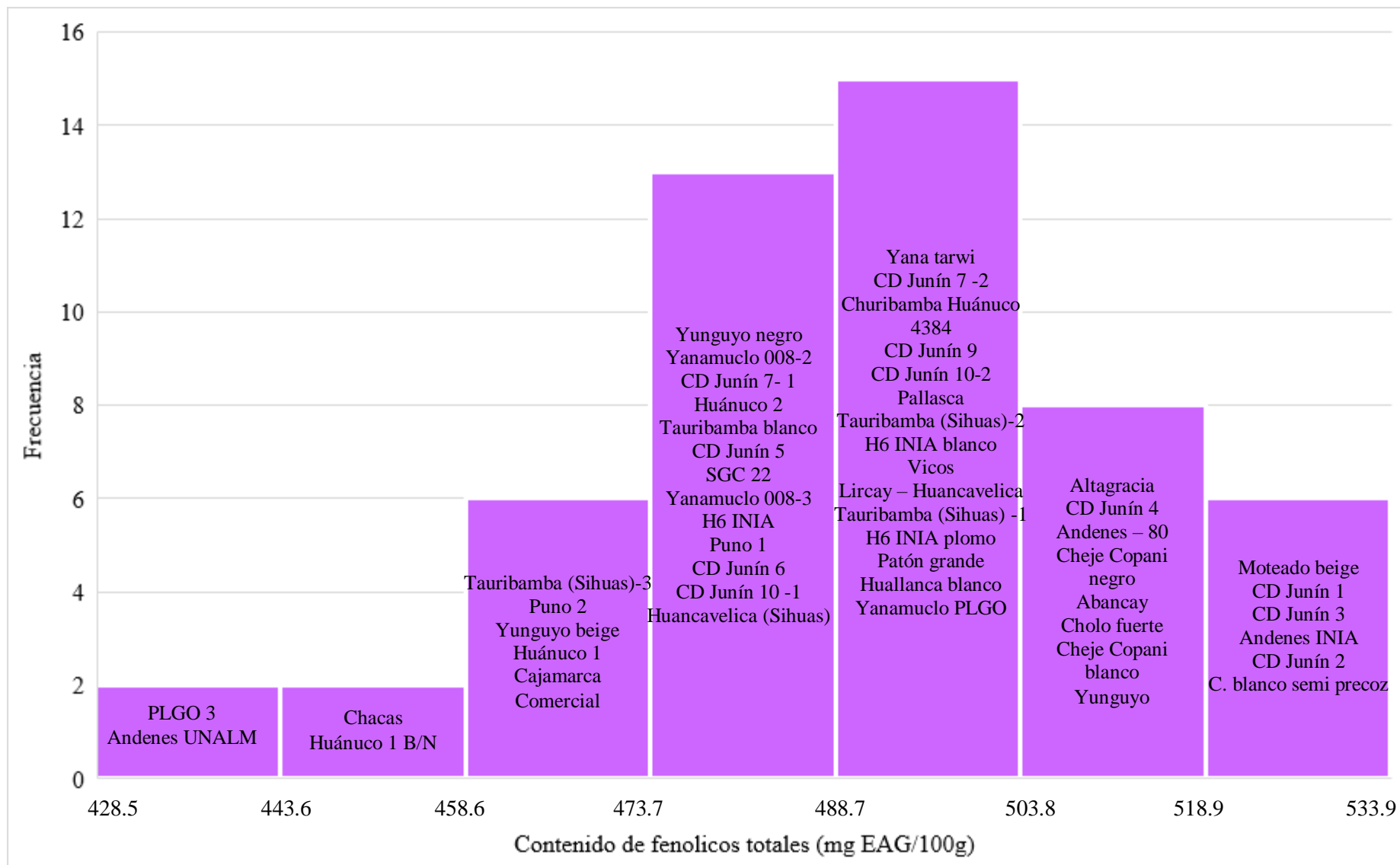


Figura 21. Histograma del contenido fenólico en tarwi amargo (52 ecotipos)

a 458.6 mg EAG / 100 g y solo 4 variedades (PLGO3, Andes UNALM, Chacas y Huánuco 1B/N) están por debajo de este contenido, pero hasta un mínimo de 428.5 mg EAG / 100 g.

Además, la distribución del contenido de compuestos fenólicos totales en tarwi amargo indican una distribución normal con un nivel de significación de 0.05 (Figura 19).

Cabe señalar que, los ecotipos reportados con mayor contenido de fenólicos totales fueron principalmente correspondientes a semillas sin pigmentación en el tegumento. Las variedades mencionadas de la Figura 21, tampoco indican alguna tendencia, pues los contenidos de los granos con tegumento oscuro, que se muestran en el Anexo 1, están divididos sin ningún orden en particular. Por tanto, no se evidencia ninguna relación entre el contenido de fenólicos totales y la coloración del tegumento en los ecotipos de tarwi estudiados. Ello puede ser debido a que, como muestra la Tabla 6, los ecotipos de tarwi presentan mayor contenido de fenólicos totales en el cotiledón que en la cáscara (Gálvez *et al.*, 2009). En contraste, Seczyk *et al.* (2019) señalan que las legumbres, como el frijol que cuenta con variedades altamente pigmentadas si contienen más compuestos polifenólicos.

Respecto al tarwi desamargado molido, los ecotipos con menor contenido de compuestos fenólicos contenían de 94.5 al 111.3 mg EAG/ 100 g. No obstante, la mayoría de los ecotipos estudiados reportaron contenidos entre 111.3 a 195.7 mg EAG / 100 g. El ecotipo Huallanca blanco obtuvo el mayor contenido de fenólicos (204.7 mg EAG / 100 g). Se realizó la prueba Chi cuadrado ($\alpha = 0.05$) que determinó que las muestras de tarwi molidas sobre su contenido de fenólicos totales pertenecen a una misma población, pese a la gran pérdida que se dio en el desamargado.

4.3. EFECTO DEL DESAMARGADO EN EL CONTENIDO DE PROTEINA

En la Tabla 13 se muestra el rango y promedio del contenido proteico y de compuestos fenólicos de las 52 muestras molidas de tarwi amargo y desamargado. Para el tarwi desamargado se obtuvo un contenido porcentual entre 40.5 a 56.8 % de proteína. Estos valores abarcan totalmente el rango de proteína cruda reportado por Quispe (2015), que fue de 43 a 53 % obtenido a partir de 10 ecotipos desamargados de *Lupinus mutabilis*.

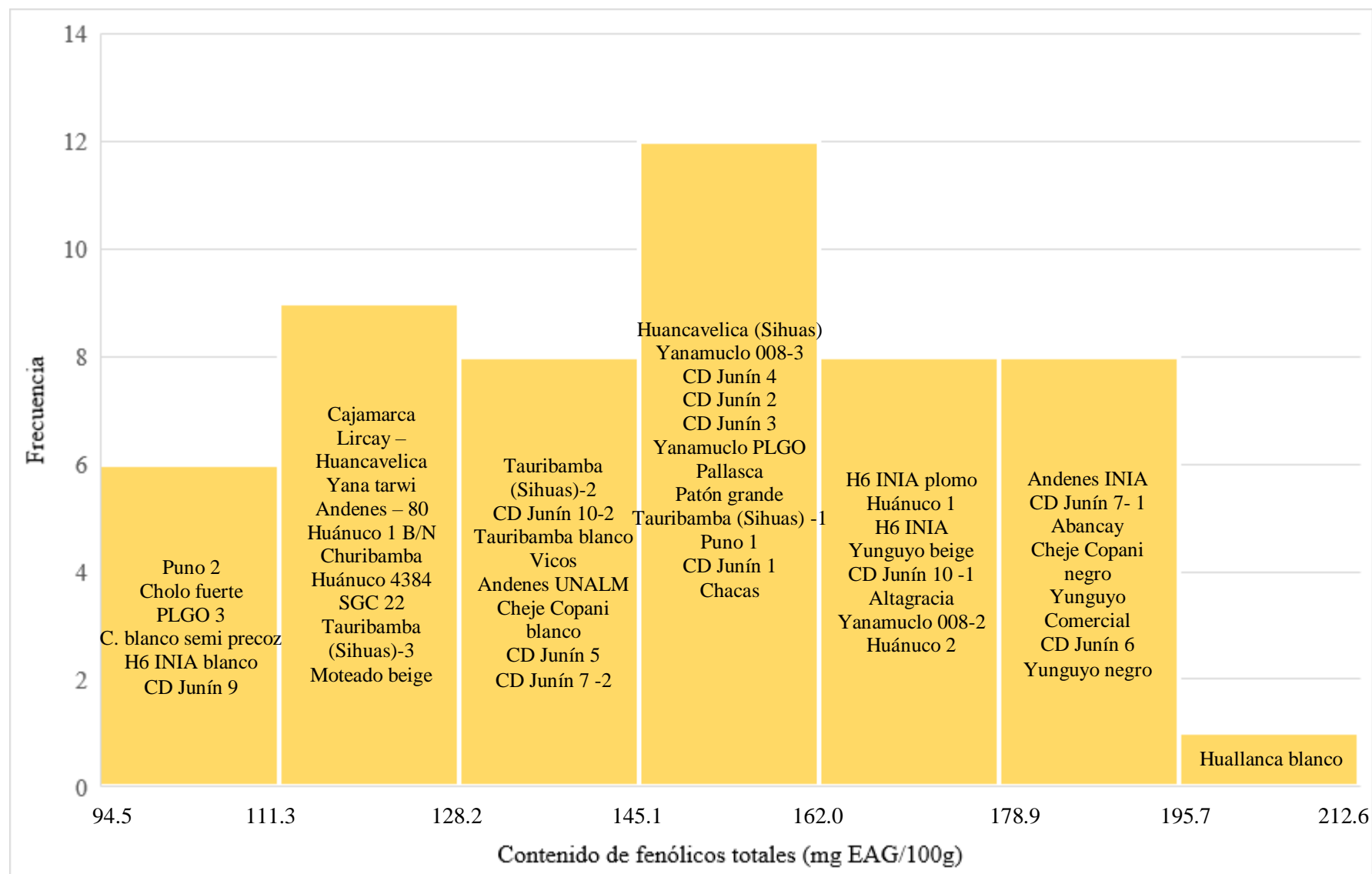


Figura 22. Histograma del contenido fenólico en tarwi desamargado (52 ecotipos)

Cabe indicar que, el presente estudio empleó una mayor variedad de ecotipos de tarwi, presentándose así una mayor diferencia en el contenido proteico. En promedio, el tarwi desamargado alcanzó un 50.13 % de proteína, siendo comparable al de la harina de tarwi de 49.6 %, reportado por Tapia (2000). Además, Palacios y Ortega (1995), citado por Ojeda & Salazar (2011), obtuvieron con un menor tiempo de cocción (30 minutos) y de lavado (4 días), un 48.2 % de proteína.

Tabla 13. Contenido de proteínas y compuestos fenólicos en tarwi

CONTENIDO	AMARGO		DESAMARGADO	
	PROTEÍNA (%)	FENÓLICOS (mg EAG/ 100g)	PROTEÍNA (%)	FENÓLICOS (mg EAG/ 100g)
Promedio	39.60	489.71	50.13	147.31
Mínimo	34.46	428.49	40.49	94.45
Máximo	43.76	526.80	56.75	204.67
Desviación estándar	1.92	21.66	3.44	28.61

n = 52. 2 repeticiones. Valores en base seca (b.s.)

mg EAG = miligramos equivalente de ácido gálico

Como se observa en la Figura 23, por efecto del proceso de desamargado acuoso se produjo un relativo incremento porcentual de proteína comparado al contenido inicial para todos los ecotipos evaluados. Este aumento aparente de proteína, es debido a que algunos compuestos del grano se concentran durante el proceso de desamargado, puesto que los compuestos solubles se separan por lixiviación en el agua de la etapa de lavado; como son los carbohidratos, oligosacáridos, minerales, alcaloides, fibra soluble, e incluso algunos lípidos (Quispe, 2015; Mostafa *et al.*, 2013). Este cambio en la composición de la materia seca explica el relativo incremento en el porcentaje de proteínas. Dichos incrementos relativos de proteína se dieron alrededor del 10 % y alcanzó hasta 40 %; siendo en la mayoría de los ecotipos, de 20 %. Estos valores son similares al cambio porcentual (alrededor de 20 a 10 %) reportado por Quispe (2015).

Cabe indicar también que los ecotipos de tarwi que alcanzaron mayor concentración de proteína luego del desamargado, no fueron los mismos del tarwi amargo; similar a lo acontecido en el estudio de Quispe (2015). Ello puede ser por particularidades de cada variedad, por diferencia del tamaño del grano o del tiempo de almacenamiento, pues se observó diferencia en el comportamiento de la semilla durante la hidratación. Tapia (2000) observó esta diferencia al hidratar semillas de tarwi de distintas variedades, que lo relacionó al efecto de tener tegumento endurecido (poco permeable).

Además, la Tabla 13 muestra el rango del contenido fenólico, tanto en las muestras de tarwi amargo como luego del desamargado. Según Oomah *et al.* (2006), la cantidad relativa de compuestos fenólicos en lupino difiere significativamente entre genotipos y lugar de origen. Sin embargo, como se observa en las Figuras 21 y 22, los contenidos no se han distribuido de manera homogénea para identificar una sola región con el mayor o menor contenido de fenólicos totales. Esta variación entre los ecotipos resultó en un amplio espectro del contenido de fenólicos totales en tarwi amargo que va desde 428.5 a 526.8 mg EAG / 100 g y, en el desamargado, de 94.5 a 204.7 mg EAG / 100g.

Con un promedio de 489.7 mg EAG / 100 g de tarwi amargo molido, resulta un contenido fenólico menor al reportado para *Lupinus mutabilis*, que es de 799.1 mg EAG / 100 g; sin embargo, este valor aun es cercano a otra variedad de lupino (*Lupinus angustifolius*) que presenta un contenido entre 535.1 - 578.4 mg EAG / 100 g) (Wang & Clements, 2008).

Posterior al proceso de desamargado, el promedio del contenido fenólico fue de 174.3 mg EAG / 100 g. Este valor es similar a otras leguminosas como la lenteja cocida que contiene 150 mg EAG / 100 g y de la soya con 150 - 180 mg EAG / 100 g (Rachel, 2012).

Debido al proceso de desamargado, se generó una gran pérdida de compuestos fenólicos respecto al contenido inicial en todos los ecotipos, como se observa en la Figura 24. Dicha reducción porcentual de fenólicos fue aproximadamente de 60 a 70 %. Esto es cercano a la disminución reportada sobre el contenido de fenoles en las leguminosas (73 %) por acción de la cocción (Barroga *et al.*, 1985; citado por Singh *et al.*, 2011) debido a la formación de complejos entre los polifenoles y otros compuestos orgánicos que se elimina

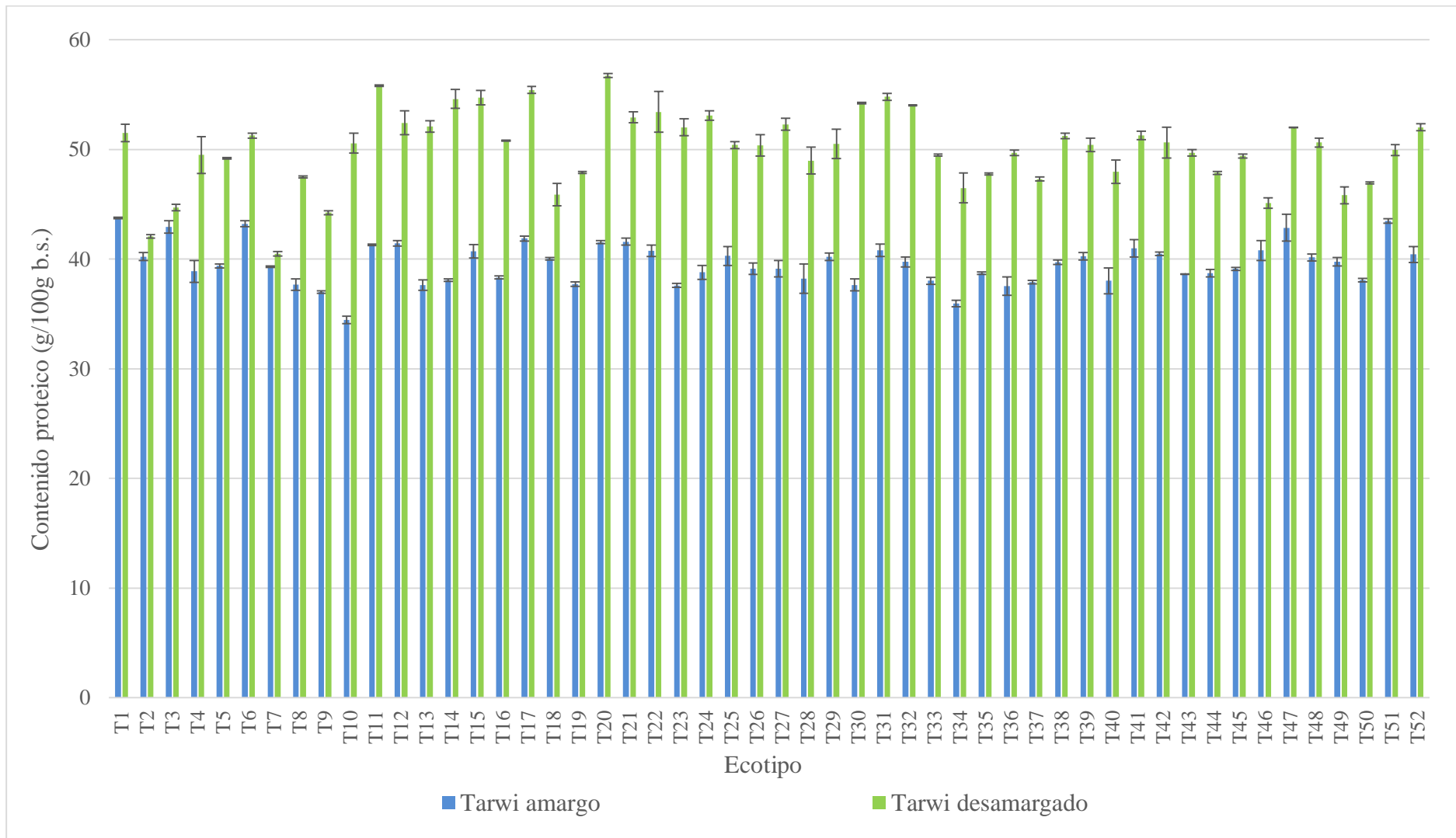


Figura 23. Contenido de proteínas (% b.s.) en tarwi

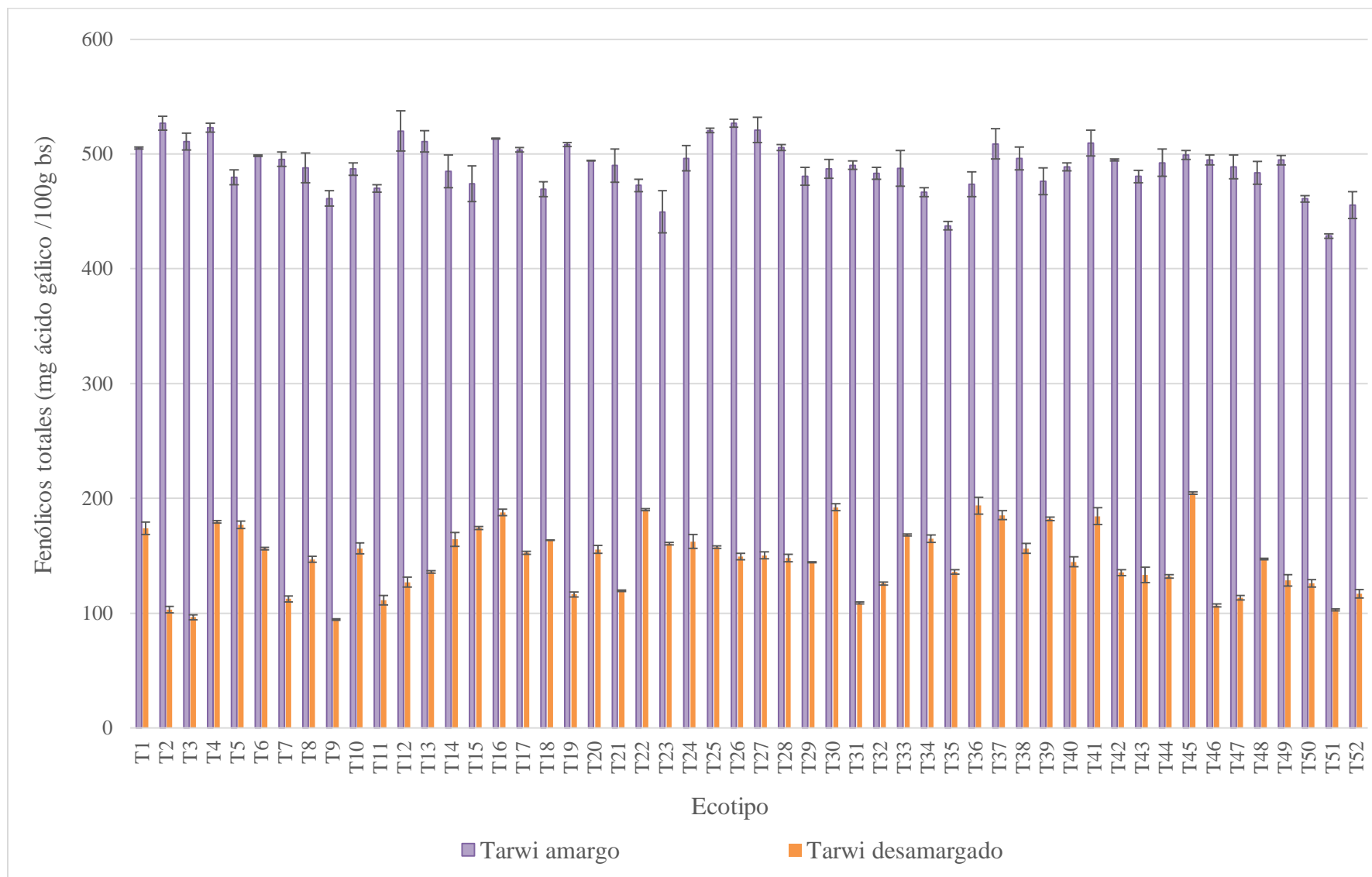


Figura 24. Contenido de fenólicos totales (mg EAG /100 g b.s.) en tarwi

en el agua (Helbig *et al.*, 2003) o a alteraciones en la estructura química de los polifenoles, dándose reacciones de polimerización o roturas estructurales, lo que repercute en la reacción necesaria para el método colorimétrico (Silva *et al.*, 2018; Bressani & Elías, 1979). Ello puede estar en relación con la pérdida de proteína luego del desamargado (Quispe, 2015) al interactuar con los polifenoles del tarwi. Además, Ali *et al.* (2012) determinó que el ácido fenólico de un solo anillo tiene una tendencia a la unión mucho mayor a las proteínas en comparación con la isoflavona de anillo multi aromático de la soya, las cuales están también presentes en el tarwi.

Además, se ha demostrado que la etapa de remojo por tiempos prolongados afecta significativamente el contenido de taninos, ácidos fenólicos y flavonoides, compuestos fenólicos en las leguminosas. En lupino específicamente, Tsaliski *et al.* (1999) reportan la pérdida de polifenoles y flavonoides. En adición, Khandelwal *et al.* (2010) explican que, en esta etapa, la pérdida puede ser simplemente por lixiviación o por la activación de la polifenol oxidasa que degrada a los polifenoles, todo ello considerando los 5 días de la etapa de lavado del tarwi.

4.4. ESPECTRO MIR DE TARWI AMARGO Y DESAMARGADO

La Figura 25 muestra la tendencia de los espectros ATR - FTIR de tarwi amargo y desamargado en un intervalo de número de onda de 4000 a 700 cm^{-1} . Se observan claramente bandas de absorción comunes en ambas curvas, aunque con variación en el contenido de sus componentes reflejado en la absorbancia, descritos en la Tabla 14.

Los picos en $\sim 3280 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a tarwi amargo y desamargado, fueron debido al estiramiento del enlace O-H relacionado generalmente al agua, como lo reportan Türker & Huck (2017) en un rango de 3500 a 3200 cm^{-1} y Berthomieu & Hienerwadel (2009) entre 3600- 3100 cm^{-1} . Cabe indicar que, el agua es un compuesto que se absorbe fuertemente en la región MIR (Dufour, 2009) lo que es corroborado en la Figura 25, donde la primera banda del espectro de tarwi abarca un amplio rango.

En el Anexo 5 se reporta los contenidos de humedad de los 52 ecotipos de tarwi. Estos porcentajes muestran que los ecotipos de tarwi amargo son más húmedos que los de tarwi desamargado. Esta variante en el contenido de agua en el tarwi se pudo observar gráficamente en la primera banda del espectro en la Figura 25.

Cercano a la banda correspondiente al agua, se observa un pequeño pico ubicado en los $\sim 3007\text{ cm}^{-1}$, el cual está asignado a vibraciones simétricas de extensión = C-H de los alquenos (enlace olefínico) debido a los ácidos grasos insaturados (Muneategui *et al.*, 1992; Chiplunkar & Pratap, 2016; Castorena *et al.*, 2011). Para los siguientes picos de ~ 2922 y $\sim 2853\text{ cm}^{-1}$, se dieron vibraciones intensas de estiramiento simétrico ($\sim 2850\text{ cm}^{-1}$) y asimétrico ($\sim 2920\text{ cm}^{-1}$) de CH_2 en las cadenas de acilo de los lípidos (Dufour, 2009; Garidel & Schott, 2006). Además, la banda centrada en $\sim 1744\text{ cm}^{-1}$ relacionada también a los lípidos, se dio por el estiramiento del enlace C=O éster carbonilo presente en los triglicéridos y fosfolípidos (Castorena *et al.*, 2011; Stuart, 2004). Como se observa en la Figura 23, los niveles de grasa relacionadas a vibraciones a ~ 2922 , ~ 2853 y $\sim 1744\text{ cm}^{-1}$, incrementaron luego del desamargado por efecto de la concentración de sus compuestos.

Debido a la remoción de alcaloides con el proceso de desamargado, se generó diferencia entre las absorbancias alcanzadas en las bandas con estiramientos de enlaces N - H (3237 cm^{-1}), C - H (2925 cm^{-1}), C = O (1640 cm^{-1}), C - N (1322 cm^{-1}) dadas en alcaloides (Fachriyah *et al.*, 2017; Schulz & Baranska, 2007) y que son posibles en las estructuras de la lupanina y esparteína, alcaloides quinolizidinos predominantes en lupino (Resta *et al.*, 2008). Relacionado a dichas bandas, pueden ser los picos a ~ 2922 , ~ 1630 y $\sim 1312\text{ cm}^{-1}$ en los espectros de tarwi estudiado; sin embargo, contrario a una reducción se observa el aumento de la absorbancia que puede estar relacionado, a la concentración de compuestos mayoritarios, ya que Quispe (2015) señala que los alcaloides totales se reducen significativamente.

La región entre 1400 y 750 cm^{-1} muestra que puede estar relacionada con las vibraciones de estiramiento de C - H, C - O, y C - C y de flexión C - H que constituyen el esqueleto químico de los carbohidratos, polifenoles y ácidos orgánicos (Anguebes *et al.*, 2016).

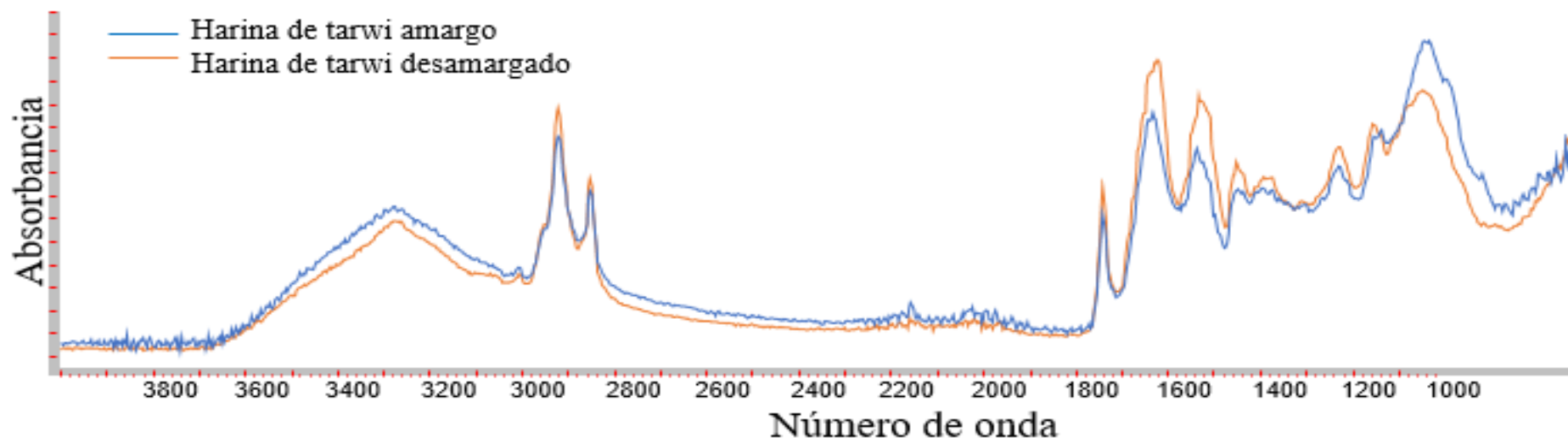


Figura 25. Espectro FT - MIR del tarwi (*Lupinus mutabilis*)

Tabla 14. Bandas (cm⁻¹) en el espectro MIR del tarwi (*Lupinus mutabilis*)

Amargo	3280	3008	2921	2853	1744	1630	1539	1458	1397	1312	1236	1142	1055
Desamargado	3279	3007	2923	2853	1744	1630	1532	1458	1397	1311	1233	1158	1045

Absorciones a 1055 y 1142 cm^{-1} , corresponden a la vibración de estiramiento simétrico del enlace C - C y C - O planteados dentro de 950 - 1200 cm^{-1} , dado por los carbohidratos (Wiercigroch *et al.*, 2017; Ibrahim *et al.*, 2006; Nikonenko *et al.*, 2002). Ello estaría relacionados a la presencia de almidón, ya que la región de 1075 - 1020 cm^{-1} es característica de polisacáridos como la amilosa (Enríquez *et al.*, 2013). Puntualmente para la banda en 1142 cm^{-1} existe la vibración del enlace glicosídico de las unidades galactosilo (Wiercigroch *et al.*, 2017), las cuales estarían relacionadas a los galactósidos que son los oligosacáridos mayoritarios en tarwi (Baldeón, 2012).

4.4.1. BANDAS MIR ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS

Según Cuellar *et al.* (2011), los enlaces peptídicos que son de tipo amida, son los responsables de la absorbancia de polipéptidos y proteínas ocurrida entre 1700 y 1500 cm^{-1} . Por consiguiente, los picos 1532, 1539 y 1630 cm^{-1} del espectro de la Figura 25, están relacionados a la proteína presente en el tarwi. Es así que las bandas en esta región muestran variación en su absorbancia, es decir, en su contenido proteico.

El pico a 1630 cm^{-1} se encuentra dentro de lo reportado para la banda amida I, la que resulta de la vibración de estiramiento del grupo carbonilo peptídico C = O entre 1700 - 1600 cm^{-1} (Haris, 2013; De Campos & Mello, 2011; Rieppo *et al.*, 2012).

Las bandas en 1532 y 1539 cm^{-1} , son resultado de la flexión de N - H y el estiramiento en C - N en la región entre 1575 - 1480 cm^{-1} relacionado a la amida II (Sjahfirdil *et al.*, 2012).

Mata *et al.* (2017) reportan que bandas a 1396 cm^{-1} se deben a las vibraciones de extensión COO- de las cadenas laterales de aminoácidos. La absorción en 1312 cm^{-1} , corresponde a la vibración de agitación de N - H y C - O, y estiramientos de C - C y C - N que vibran a ~ 1300 cm^{-1} o en la región de 1347 a 1280 cm^{-1} que están relacionadas a las amidas tipo III (Dufour, 2009; Gezahegn, 2018). Además, Castorena *et al.* (2011) indica que a 1237 cm^{-1} se da la vibración de las extensiones asimétricas del grupo fosfato de la amida III, la cual estarían relacionadas a las bandas 1233 y 1236 cm^{-1} en el espectro de tarwi.

4.4.2. BANDAS MIR ASOCIADAS A LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Las vibraciones dadas en 1233 cm^{-1} y 1236 cm^{-1} corresponderían al doblamiento del enlace O - H, del estiramiento de C - C de los fenoles que absorben a $1260\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$ y del estiramiento C - O que produce bandas en la región $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein *et al.*, 2005).

La banda de 1532 , 1539 y 1458 cm^{-1} que está dentro del rango de 1584 a 1450 cm^{-1} , relacionado a la vibración de la estructura aromática de pueden ser de grupos fenólicos (He *et al.*, 2007) así como a la vibración de flexión de C - H en CH_3 y CH_2 , en anillos aromáticos y flavonoides (Delgado *et al.*, 2015). En adición, Danciu *et al.* (2017) señalan bandas de absorción características de algunos ácidos fenólicos provenientes de lupino; alrededor de 1600 cm^{-1} por el estiramiento simétrico y asimétrico en C = O; entre $1430 - 1580\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento en el anillo (C -C); y en el rango $1030 - 1180\text{ cm}^{-1}$ por la deformación plana del anillo (C - H).

4.5. CALIBRACIÓN PLS DE TARWI

Los modelos de calibración para determinar el contenido de proteína y fenólicos totales fueron seleccionados sobre la base de minimizar los estadísticos de error, como el error estándar de la validación cruzada (SECV), el error estándar de la calibración (SEC) (Cozzolino, 2002; Zossi *et al.*, 2010) y el número de factores (Gayo *et al.*, 2006; citado por Rohman *et al.*, 2011). Para ello, se delimitaron ciertas regiones del espectro MIR considerando las bandas relacionadas a las vibraciones generadas por grupos amida y por fenoles. Asimismo, se empleó como pre procesamientos la segunda derivada y se retiraron muestras *outliers* lo que permitió un mejor ajuste de los modelos.

De igual manera, se consideró la forma del vector de regresión, ya que si parece ruidoso o muy irregular indica que el modelo está sobre ajustado. En la gráfica de este vector es importante las variables (bandas) con altos coeficientes que contribuyen significativamente en el modelo de regresión para predecir (Infometrix, 2014).

4.5.1. CALIBRACIÓN PLS DE PROTEÍNA

La calibración de proteína del tarwi amargo y desamargado se trabajaron en la región MIR de 1734 a 1432 cm^{-1} , abarcando en total 106 variables (números de onda) y considerando todas las muestras integrales molidas ($n = 104$, 52 de tarwi amargo y 52 del desamargado). En este caso, la segunda derivada de la absorbancia respecto del número de onda ($d^2 A/d v^2$) mejoró la resolución de la amida I que suele consistir en un número de bandas sobrepuestas (Winnicki *et al.*, 2019).

Los modelos PLS consisten principalmente en un vector de regresión, el cual se considera como la suma ponderada de las cargas o pesos en el modelo. Variables con coeficientes cercanos a cero no contribuyen significativamente a la predicción (Infometrix, 2014). El vector de regresión de la Figura 26 muestra las bandas luego del tratamiento de los datos, en donde algunas son negativas, pues se han formado de cada banda y hombro del espectro de absorción original que suelen aparecer superpuestos (Fabian & Mantele, 2006). Los picos observados fueron a: 1458 cm^{-1} que se debe al estiramiento del enlace C - C, 1507 y 1550 cm^{-1} correspondiente a la banda amida II por la vibración C = O (Haris, 2013) y 1691 cm^{-1} por la flexión de N - H y el estiramiento en C - N de la amida I (Sjahfirdil *et al.*, 2012).

Como se ve en la regresión PLS de proteína en tarwi de la Figura 27 y cuya ecuación se describe en el Anexo 10, indica que se obtuvo un buen ajuste ($r^2_{\text{cal}} = 0.95$) de los datos que relaciona el contenido proteico medido con la predicción que se estima a partir del espectro. Este mismo valor también se reporta para el coeficiente de correlación de validación. Es decir, que las ecuaciones generadas del modelo con estos altos coeficientes de determinación indican una alta confiabilidad en la predicción (Molano *et al.*, 2016).

El número de factores óptimo de este modelo fue de 4 como se indica en la Tabla 15, a través de la relación con el SECV que se muestra en el Anexo 11, obtenido por el método de validación cruzada *leave-one-out*. Los parámetros estadísticos SEC y SECV fueron 2.11 % y 2.17 %, respectivamente; los cuales son bajos y similares entre sí como lo recomiendan Sapienza *et al.* (2008) y Vivar (2009). Además, este número de factores explica ampliamente a la varianza en un 99.92%. En un estudio sobre forrajes de leguminosas y gramíneas se

obtuvo un buen ajuste del modelo en la región del infrarrojo cercano (NIR) para proteínas con los parámetros R^2_{cal} y R^2_{val} altos (0.99 y 0.83, respectivamente) y bajos valores del error expresado en el SEC (0.8 %) y SECV (0.9%) (Molano *et al.*, 2016). Al comparar, es recomendable valores menores al error obtenido; sin embargo, aún son aceptables considerando que parte de las muestras han pasado por un proceso de desamargado que generó la variación en su composición en general.

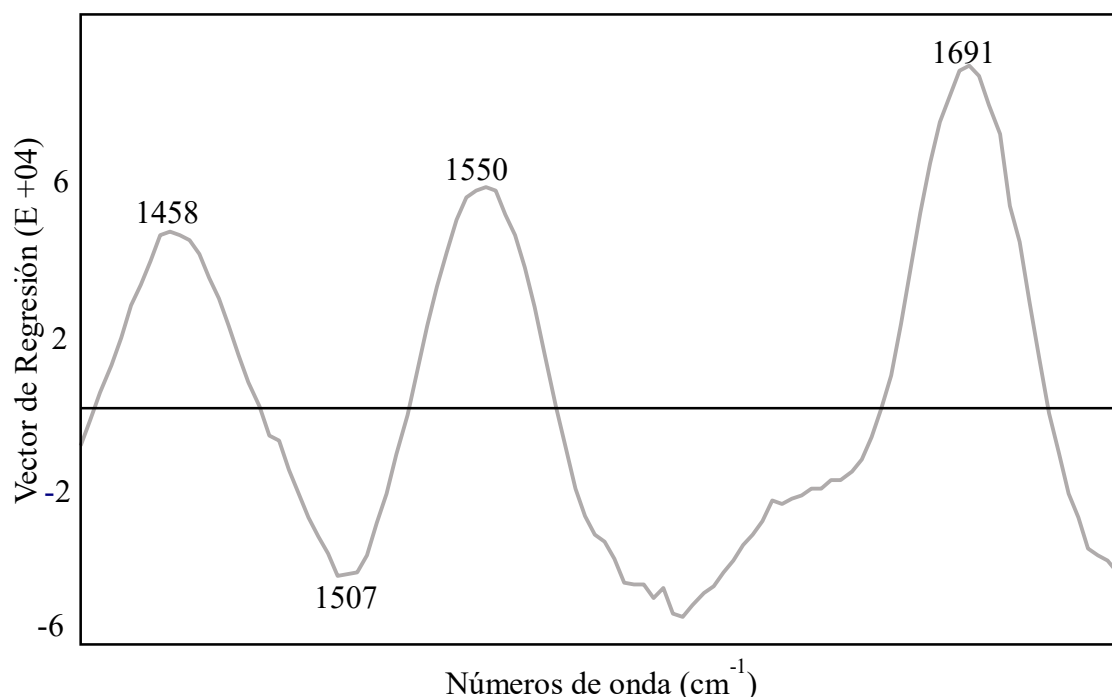


Figura 26. Vector de Regresión de la calibración de proteína en tarwi

Tabla 15. Resumen del análisis estadístico multivariado para proteína en tarwi

ESTADÍSTICO	
Número de muestras	104
Factores	4
SEC ^a	2.11 %
SECV ^b	2.17 %
r^2_{cal} ^c	0.95
r^2_{val} ^d	0.95

^a Error estándar de calibración ^b Error estándar de validación cruzada ^c Coeficiente de determinación de calibración ^d Coeficiente de determinación de validación

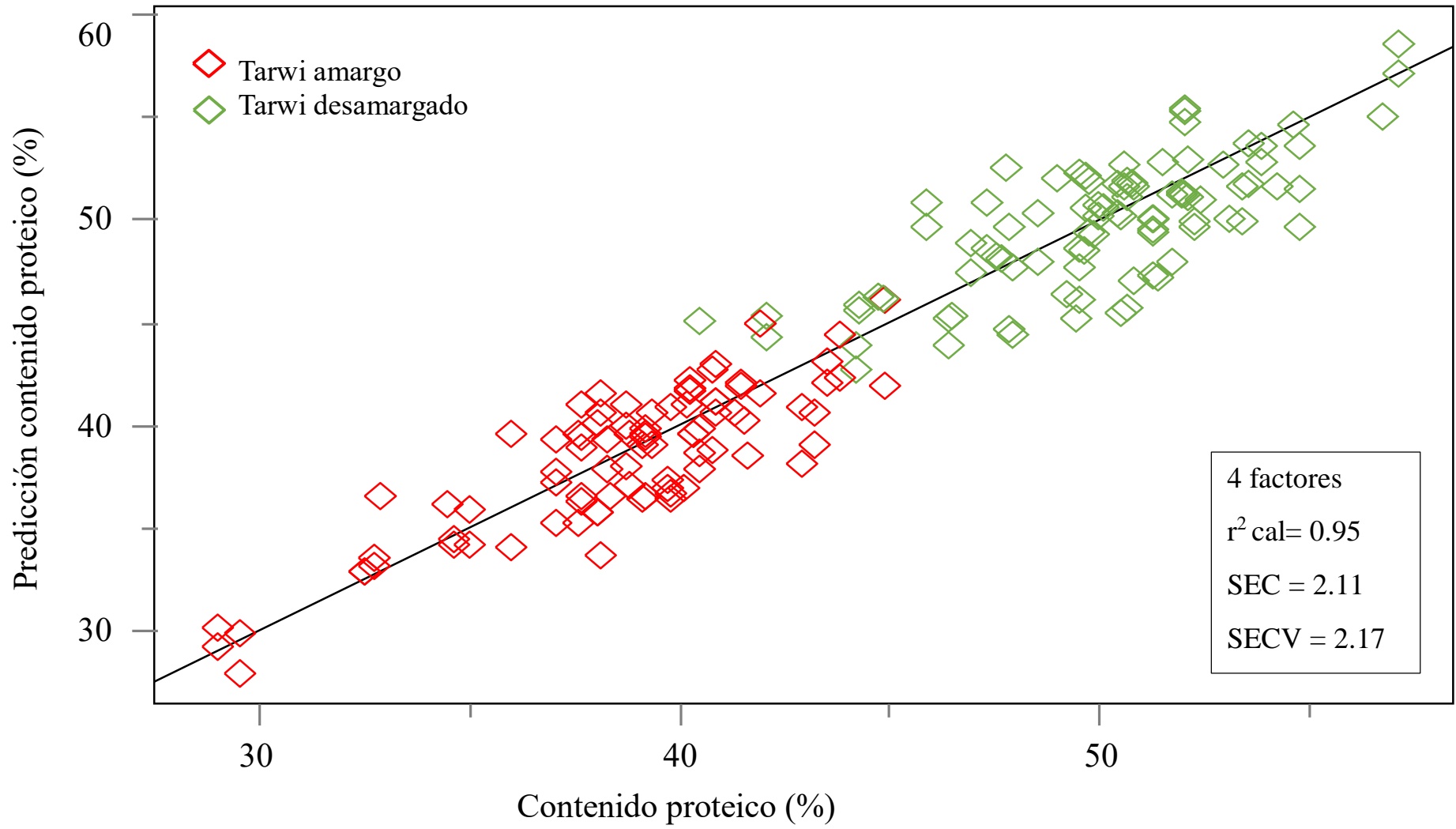


Figura 27. Predicción del contenido de proteína de tarwi

Por tanto, este modelo de calibración de proteína es confiable pues es posible determinar con alta precisión el contenido de proteína por espectroscopia FTIR e incluso discriminar entre una muestra de tarwi amargo y desamargado.

4.5.2. CALIBRACIÓN PLS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Para la calibración de los compuestos fenólicos se emplearon las regiones del infrarrojo entre 1751 – 1602 y 1501 – 1401 cm^{-1} abarcando 89 variables (números de onda) en total, como se muestra en la Figura 26.

Como se muestra en el Anexo 12, los contenidos de fenólicos totales en tarwi amargo y desamargado no se distribuyeron en toda la recta, sino solo en los extremos de esta debido a la gran diferencia del contenido fenólico antes y después de desamargar. Al no contar con una distribución adecuada, se trabajaron modelos independientes, uno para tarwi amargo y otro para desamargado considerando las 52 muestras iniciales.

Las bandas sobresalientes para la calibración del contenido fenólico (Figura 28) en tarwi amargo de la región mencionada, fueron a 1450 y 1654 cm^{-1} y, en tarwi desamargado se obtuvo una curva irregular (bandas a 1447, 1490, 1665, 1688 cm^{-1}) que puede deberse a un sobre ajuste del modelo (Infometrix, 2014). Dichas bandas están relacionadas a la vibración de la estructura aromática de grupos fenólicos y flavonoides que se dan entre 1455 a 1450 cm^{-1} por la vibración C - H de grupos CH_2 y CH_3 y del anillo aromático (Delgado *et al.*, 2015; He *et al.*, 2007) y al estiramiento del carbonil C = O (1760 - 1600 cm^{-1}) que se caracteriza también por la presencia de flavonoides (Raja *et al.*, 2011). Las ecuaciones para el modelo de calibración de fenólicos totales del tarwi amargo se detalla en el Anexo 13 y para tarwi desamargado se indica en el Anexo 14.

Por otro lado, se observa en la Figura 29 y 30, los datos están relativamente dispersos comparado a la regresión PLS obtenida para la calibración de proteína, lo que se refleja en los valores medios de los coeficientes de determinación en la calibración (amargo: 0.82, desamargado: 0.79) y validación (amargo: 0.78, desamargado: 0.74) como muestra la Tabla 16. Cabe resaltar que, los valores r^2 de validación cruzada son menores en comparación a

los r^2 de calibración, lo que indica que el set de muestras de tarwi empleadas para la calibración no es homogéneo, no obstante, se podría mejorar añadiendo espectros y valores de referencia de muestras adicionales (Bonierdale *et al.*, 2009). Es así que, comparado a un modelo trabajado con 287 muestras de sorgo que si se alcanza un buen ajuste (r^2_{cal} y r^2_{val} de 0.97 y 0.95, respectivamente) y alto poder de predicción para determinar compuestos fenólicos, el modelo obtenido solo puede darnos predicciones aproximadas sobre el contenido de fenólicos totales debido a que su r^2 está entre 0.66 y 0.81 (Molano *et al.*, 2016).

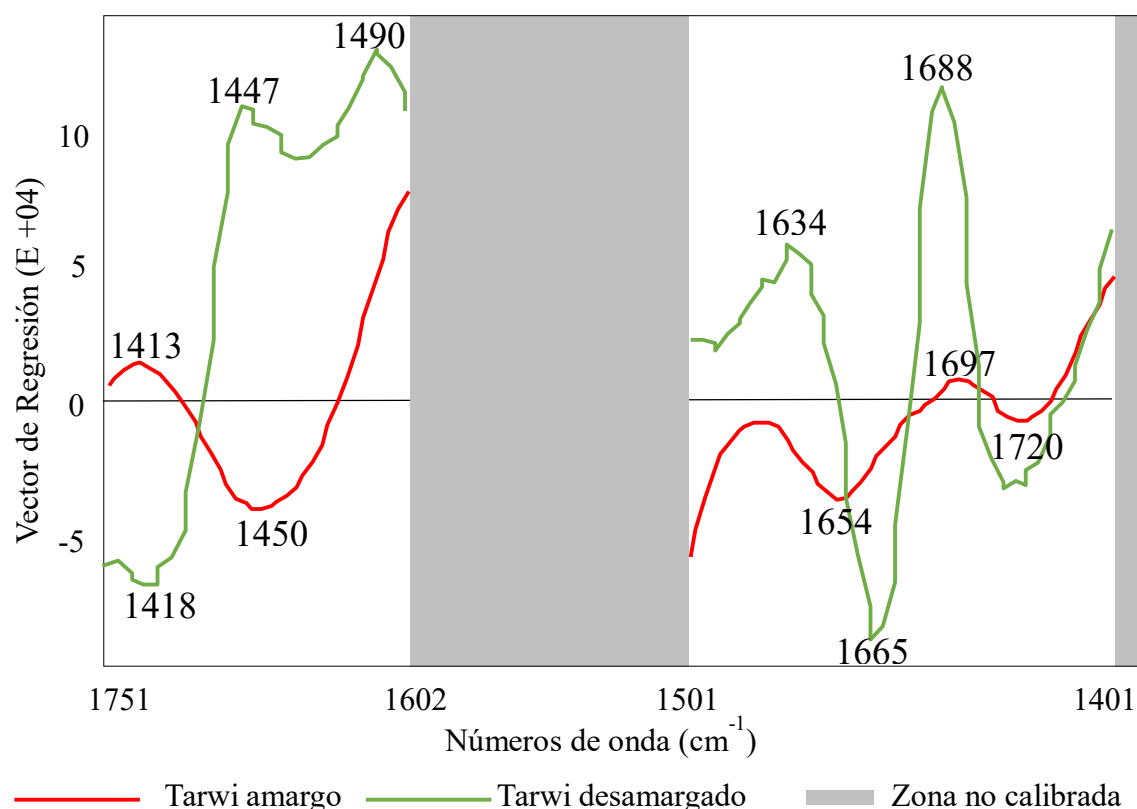


Figura 28. Vector de Regresión de la calibración de fenólicos totales en tarwi

Para la regresión PLS para fenólicos en tarwi amargo se obtuvo un SEC de 10.80 y SECV de 11.60 mg EAG / 100 g empleando 5 factores (Anexo 15); lo que explica el 99.80 % de la varianza. No obstante, ello solo se obtuvo con una parte de las muestras iniciales (n=37) las cuales se mencionan en el Anexo 16. Para el modelo de tarwi desamargado, se obtuvo mayores valores de los parámetros SEC (16.05 mg EAG / 100 g) y SECV (16.98 mg EAG/ 100 g) con un número óptimo de 6 factores (Anexo 17), lo que explica 99.91 % de la varianza de 40 muestras, las cuales se mencionan en el Anexo 18. Al comparar con investigaciones

como la de Dykes *et al.* (2014) realizada en sorgo, los parámetros del error obtenidos para el tarwi son muy superiores (sorgo: SEC 1.03 y SECV 1.41 mg EAG / 100 g).

De acuerdo a esto, los modelos deberían ser mejorados aumentando el número de muestras, ya que el tarwi presenta diferentes compuestos que son detectados en el espectro MIR y dificulta la correlación debido a la superposición de bandas (Danciu *et al.*, 2017).

Tabla 16. Resumen del análisis estadístico multivariado para fenólicos totales

COMPUESTO	NÚMERO MUESTRAS	FACTORES	SEC ^a	SECV ^b	r ² cal ^c	r ² val ^d
Fenólicos totales en tarwi amargo	37	5	10.80	11.60	0.82	0.78
Fenólicos totales en tarwi desamargado	40	6	16.05	16.98	0.79	0.74

^a Error estándar de calibración ^b Error estándar de validación cruzada ^c Coeficiente de determinación de calibración ^d Coeficiente de determinación de validación

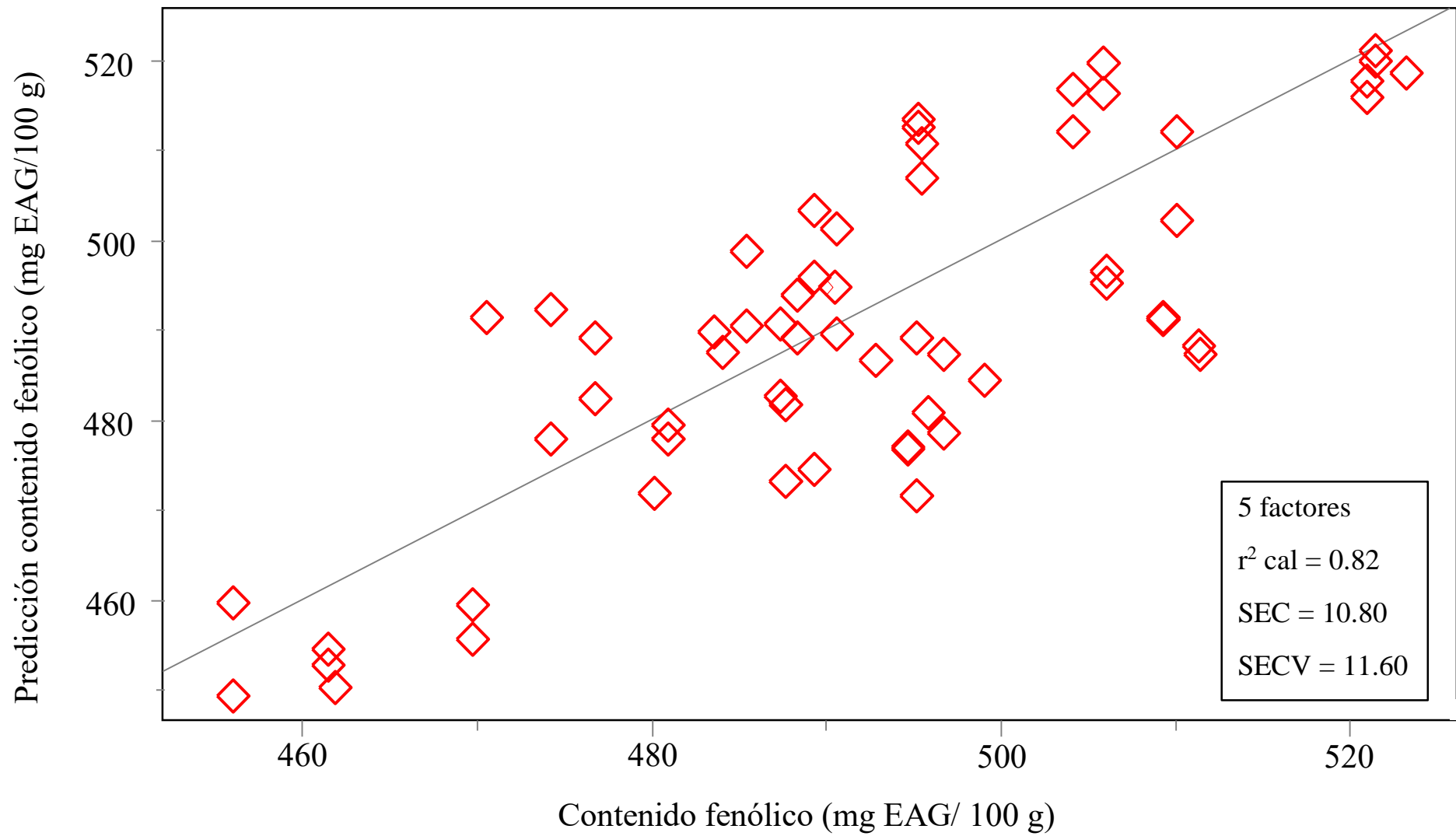


Figura 29. Regresión PLS del contenido de fenólicos totales de 37 ecotipos de tarwi amargo

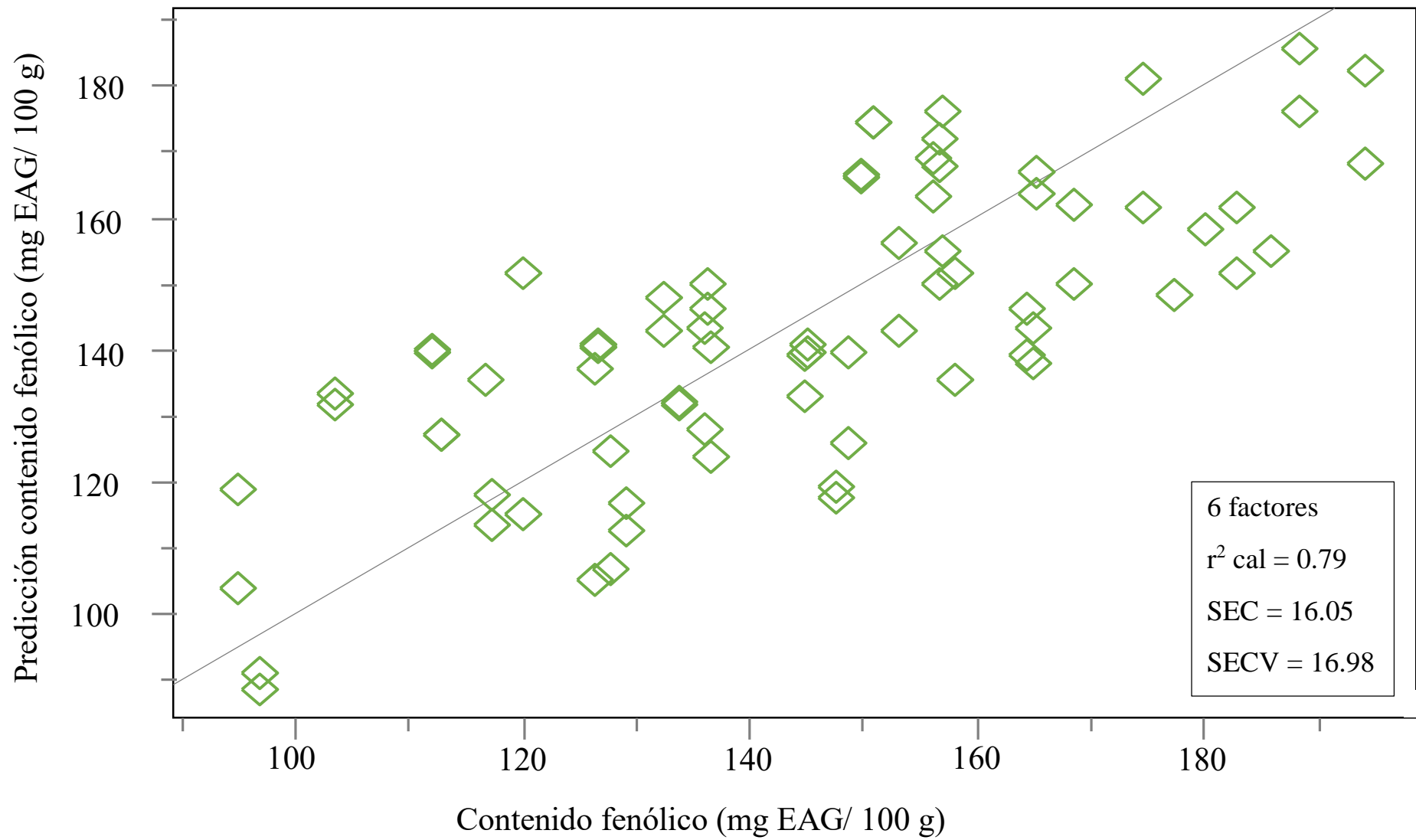


Figura 30. Regresión PLS del contenido de fenólicos totales de 40 ecotipos de tarwi desamargado

V. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un solo modelo de calibración PLS que determina el contenido de proteínas en tarwi amargo y desamargado y 2 modelos independientes (uno de tarwi amargo y otro del desamargado) que predicen el contenido de compuestos fenólicos totales.
2. El colectivo de los 52 ecotipos de tarwi amargo presentó contenidos entre 34 a 44 % de proteína y entre 428 a 527 mg EAG/ 100g para fenólicos totales, mientras que el tarwi desamargado tuvo un incremento relativo de proteína (40 a 56 % de proteína) y una reducción que alcanzó entre 94 a 205 mg EAG /100g para fenólicos totales, todo reportado en base seca.
3. Las bandas del infrarrojo medio relacionadas a las proteínas en tarwi fueron las del grupo amida II (1507 y 1550 cm^{-1}) y amida I (1691 cm^{-1}) y respecto a los compuestos fenólicos involucraron la vibración del anillo aromático (1450 cm^{-1}) y del grupo carbonil por la presencia de flavonoides (1690 cm^{-1}).
4. El modelo PLS de proteína obtenido con los 52 ecotipos para tarwi amargo y desamargado obtuvo altos coeficientes de determinación (0.95) y bajos valores de SEC y SECV (< 2.3 %), por lo que se considera un modelo confiable para la predicción de proteína con la lectura en el espectrómetro portátil FTIR.
5. Los modelos del contenido de fenólicos totales para tarwi molido amargo (n = 37) y para el desamargado (n = 40), obtuvieron valores medios de coeficientes de determinación (< 0.83) y relativamente altos respecto al error (entre 10 a 17 mg EAG/ 100 g), por lo que solo brinda contenidos aproximados.

VI. RECOMENDACIONES

- La ejecución de los análisis por los métodos de referencia y la lectura de espectros deben realizarse lo más pronto posible a la obtención de la muestra para evitar modificaciones de su composición en el tiempo.
- Se podría optimizar los modelos con espectros obtenidos de un espectrómetro de infrarrojo más sensible como un equipo de mesa.
- Se sugiere analizar un mayor número de muestras para determinar un modelo confiable respecto al contenido de fenólicos totales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, H.; Alli, L.; Ismail, A.; Kermasha, S. (2012). Protein - Phenolic Interactions in Food (Tesis de maestría, McGill University). Recuperada de <http://www.eurasianjournals.com/Protein-Phenolic-Interactions-inFood,79635,0,2.html>
- Allauca C., V.V. (2005). Desarrollo de la tecnología de elaboración de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) germinado fresco para aumentar el valor nutritivo del grano. (Tesis doctoral). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. Recuperado de http://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=_38zAQAAMAAJ&oi=fnd&pg=PA76&dq=inactivacion+de+las+lectinas+en+el+tarwi&ots=FDOP0CSYf&sig=JYD1sQ5CYAGbJkE1 y25X_KKyHBk#v=onepage&q&f=false
- Anguebes, F.; Pat, L.; Ali, B.; Guerrero, A.; Cordova, V.; Abatal, M.; Garduza, J.P. (2016). Application of multivariable analysis and FTIR-ATR spectroscopy to the prediction of properties in Campeche honey. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016: 1-14. doi: 10.1155/2016/5427526
- Araujo A., C.; Campos C. I.; Martinez, J.R.; Ortega Z., G.; Ruiz, F. (2005). Modelo de predicción basado en análisis multivariante para la determinación de concentración de azúcar en solución. *Revista Mexicana de Física*, 51 (2): 67–73. Recuperado de https://rmf.smf.mx/pdf/rmf-e/51/2/51_2_67.pdf
- Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.). (2005). Official Methods of Analysis. Protein (Total) in flour. AOAC 920.87. EUA.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic Compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- Baldeón S., P.E. (2012). Procesamiento del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para la obtención de leche y yogurt como alimentos alternativos de consumo humano. (Tesis de maestría). Universidad de Guayaquil. Ecuador. Recuperado de http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1928/1/TESIS_CHOCHO_PDF.pdf

- Bansal, A.; Chhabra, V.; Rawal, R.K.; Sharma, S. (2014). Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. doi: 10.1016/j.jpha.2013.12.001
- Barraza G., G.; De La Rosa, L.A.; Martínez M., A.; Castillo M., H.; Cotteb, M.; Álvarez P., E. 2013. La microespectroscopia de infrarrojo con Transformada de Fourier en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3): 125-148.
- Berthomieu, C. & Hienerwadel, R. 2009. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101: 157-170. doi: 10.1007/s11120-009-9439-x
- Bonierdale, M.; Gruneberg, W. Amoros, W. Burgos, G. Salas, E. Porras, E. Felde, T. (2009). Total and individual carotenoid profiles in *Solanum phureja* cultivated potatoes: Development and application of near- infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibrations for germoplasm characterization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 509-516.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional significance. *Nutrition Review*, 56 (11): 317-333. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
- Bressani, R. & Elías, L.G. (1979). The Nutritional role of polyphenols in beans. Polyphenols in cereals and legumes: 61-68. Recuperado de: <https://idl-bnc-idrc.dspace.direct.org/bitstream/handle/10625/20583/IDL-20583.pdf?sequence=1>
- Camarena, F.; Huaranga, A.; Jiménez, J.; Mostacero, E. (2012). Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*). Lima, Perú: CONCYTEC.
- Campoverde M., M.S. (2013). Detección de Adulteración por aguados en leche cruda mediante espectroscopía de infrarrojo medio para el Cantón Cuenca. (Tesis de maestría, Universidad del Azuay). Recuperada de <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/2526>
- Castorena G., J.H.; Delgado M., R.; Robles D., R.R. (2011). Análisis de Pulpa y Aceite de Aguacate con Espectroscopia Infrarroja. *Conciencia Tecnológica*, 42:5-10. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=944/94421442002>
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*: 223-229. doi: 10.1093/ajcn/81.1.223S

- Chiplunkar, P.P.& Pratap, A.P. (2016). Utilization of sunflower acid oil for synthesis of alkyd resin. *Progress in Organic Coatings*, 93: 61–67. doi: 10.1016/j.porgcoat.2016.01.002
- Chirinos A., M. (2014). Andean Lupin (*Lupinus mutabilis Sweet*) a plant with nutraceutical and medicinal potential. *Revista Bio Ciencias*, 3 (3): 163-172. doi: 10.15741/revbio.03.03.03
- Christian, G.D. (2009). *Química Analítica*. México. McGraw Hill.
- Cozzolino, D. (2002). Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia*, 6 (2): 25-32. doi: 10.4067/S0365-28072003000400007.
- Cozzolino, D. (2015). Infrared Spectroscopy as a Versatile Analytical Tool for the Quantitative Determination of Antioxidants in Agricultural Products, Foods and Plants. *Antioxidants*, 4: 482-497. doi: 10.3390/foods3040605
- Cuéllar G., J.A.; Coronado R., S.M.; Arrubla Q., R.C. (2011). Diferenciación de especie micobacteriana por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. *Acta Biológica Colombiana*, 16 (2): 109-120. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028008009>
- Curbelo, R. (2000). *Fourier Transformation and Sampling Theory*. Academic Press: 632-636.
- Cutipá H., W. (2014). Efecto de la adición de harina de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) en sustitución parcial de harina de trigo (*Triticum aestivum*) en la elaboración del pan. (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano). Recuperado de <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3421>
- Da Silva, R.; Laureano, O.; Belrao D.C.; M. L. (1994). Total phenol and proanthocyanidin evaluation of Lupins species. *Biochemistry and Physiology*: 250-254.
- Danciu, C.; Zinuca Pavel, I.; Babuta, R.; Ersilia, A.; Suciú, O.; Pop, G.; Soica, C.; Dehelean, C.; Radulov, I. (2017). Total phenolic content, FTIR analysis, and antiproliferative evaluation of lupin seeds harvest from western Romania. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 24 (4): 726–731.
- De Campos V., B. & Mello, M.L.S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* 42: 283-289. doi: 10.1016/j.micron.2010.09.010
- Delgado A.; M. De L.; Andrade O., J.A. Ramirez B.; C.A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6 (28): 74-87. Recuperado de Disponible

en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200006&lng=es&nrm=iso

- Devlin, T.M. (1999). Bioquímica. Reverté. Cuarta Edición.
- Dufour, É. (2009). Principles of infrared spectroscopy. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*: 3-27.
- Dykes, L. Hoffmann Jr., L. Portillo-Rodriguez, O. Rooney, W.L. Rooney, L.W. (2014). Prediction of total phenols, condensed tannins, and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. *Journal of Cereal Science*: 1-4. Recuperado de <http://digitalcommons.unl.edu/intormilpubs/44>
- Enríquez C., M.; Velasco M., R.; Fernandez Q., A. (2013). Caracterización de almidones de yuca nativos y modificados para la elaboración de empaques biodegradables. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2: 21-30. Recuperado de <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/1222>
- Fabian, H. & Mantele, W. (2006). Infrared Spectroscopy of Proteins. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. doi: 10.1002/0470027320.s8201
- Fachriyah, E. Ghifari, M.A. Anam, K. (2017). Isolation, identification, and xanthine oxidase inhibition activity of alkaloid compound from *Peperomia pellucida*. *IOP Conference Series Materials Science Engineering*, 349: 1-6. doi: 10.1088/1757-899X/349/1/012017
- Ferré, J. (2006). Calibración multivariante en análisis cuantitativo: El modelo inverso. *Técnicas de Laboratorio*, 310: 262 - 266. Recuperado de: http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/AD_TL_Calibracisn%20Multivariant e.%20El%20modelo%20inverso.pdf
- Gálvez R., L.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. (2009). Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 397-404. doi: 10.1016/j.jfca.2008.06.011
- Garay C., O. B. (2015). El tarwi alternativa para la lucha contra la desnutrición infantil. Edición INIA.
- García L. A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, M.; Martínez, J. (2009). Flavonoids as antiinflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Journal of Inflammation Research*, 585: 37-52. doi: 10.1007/s00011-009-0037-3.
- Garidel, P. & Schott, H. (2006). Fourier-Transform mid-infrared spectroscopy for analysis and screening of liquid protein formulations. *BioProcess International*: 48-55.

Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/68ef/3e5d196d0802437829535d5b7db00bf0dd73.pdf>

- Gezahegn, T.L. (2018). Fourier Transform Infrared Spectroscopy Combined with Partial Least Squared Regression and Standard Addition-Net Analyte Signal Method for Quantification of Chitin in Insect-based Fish Feeds. (Tesis de maestría, University of Bergen). Recuperado de http://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/18676/MSc-Thesis--University-of-Bergen-_Tsegu-Gezahegn.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gómez R., M. (2010). Desarrollo y Evaluación de Estrategias Analíticas para la caracterización de Compuestos Bioactivos en Alimentos Funcionales. (Tesis doctoral. Universidad de Granada). Recuperado de <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/15467/19697508.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Glorio P., P. (2010). Técnicas Modernas de Investigación en Ciencia de Alimentos. Recuperado de : [http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/ UNALM/1745](http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1745)
- Grijalva V., C.; Hernández M., M.; Meza M., O.G.; Gallardo V., T.; Osorio R., G. (2018). FT-MIR spectroscopy and multivariate analysis for determination of bioactive compounds and antioxidant capacity in Cabernet Sauvignon wines. *Cyta Journal of Food*, 16 (1): 561–569. doi 10.1080/19476337.2018.1428224
- Haris, P. I. (2013). Probing protein–protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 2265–2271. Doi: 10.1016/j.bbamem.2013.04.008
- Harper, C.A.; Bates, G.E.; Hansbrugh, M.P.; Gudlin, M.J.; Gruchy, J.P.; Keyser, P.D. (2007). Native Warm-Season Grasses. University of Tennessee. 189 p. Recuperado de http://mrmpros.com/wp-content/uploads/2012/07/Native_Warm-Season_Grasses_Identification_Establishment_Management.pdf
- Harris, D. C. (2012). Análisis Químico Cuantitativo. Reverté.
- He, J. Rodríguez-Saona, L.E. Giusti, M.M. (2007). Midinfrared spectrosocopy for juice authentication – Rapid differentiation of Commercial Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/jf062715c
- Helbig, E. Costa D., A. Da Silva Q., K. Machado R., S.M.P. (2003). Effect of soaking prior to cooking on the levels of phytate and tannin of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) and the protein value. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 49: 81-86. doi 10.3177/jnsv.49.81
- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. (2005). Métodos espectroscópicos en Química Orgánica. Síntesis S.A.

- Hollas, J. M. (2004). *Modern Spectroscopy*. Editorial John Wiley.
- Ibrahim, M.; Alaam, M.; El-Haes, H.; Jalbout, A.F.; De Leon, A. (2006). Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclética Química*, 31(3): 15-21. doi 10.1590/S0100-46702006000300002
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2004). Leguminosas. Grano desamargado de chocho. NTE INEN 2 390. Ecuador.
- INFOMETRIX. 2014. *Pirouette Multivariate Data Analysis Software*. Version 4.5.
- Jacobsen, S. & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*: 458-482. Recuperado de <https://beisa.au.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>
- Jurado C., L. (2012). Estudio del Grado de Madurez y/o Conservación de tomates empleando Técnicas Espectroscópicas Moleculares. (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo. Recuperado de http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/4196/6/TFM_LauraJuradoCapel.pdf
- Khandelwal, S.; Udipi, S.; Ghugre, P. (2010). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43: 526-530. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.036
- Kong, J. & Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (8): 549–559.
- Lampart S., E.; Korczak, J.; Nogala K., M.; Zawirska W., R. (2003). Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chemistry*, 83: 279-285. doi:10.1016/S0308-8146(03)00091-8
- Macho A., S. (2002). Metodologías analíticas basadas en espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariante. Aplicación a la industria Petroquímica. (Tesis doctoral, Universitat Rovira I Virgili). Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8981/tesismacho.pdf?sequence=1>
- Martens, H. & Naes, T. (1989). *Multivariate Calibration*. Jhon Wiley & Sons.
- Martínez R., E. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escorialense* 38: 315 - 332.
- Martínez, J.L. & Barrios, H. (2016). Selección del número de factores latentes apropiados en PLSR con capacidad predictiva. XXVI Simposio Internacional de Estadística (2016, Sucre, Colombia). Sucre, Colombia. 5 p.
- Mata M., M.; Guerrero R., C.I.; Rojas L., M.; Delgado M., R.J.; González D., C.A.; Sánchez M., V.; Pérez I., D.G.; Vásquez Z., G.J. (2017). Componentes Principales mediante

- Espectroscopia FTIR como Técnica de caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre pluripotentes a células pancreáticas. *Revista Mexicana De Ingeniería Biomédica*, 38 (1): 225-234. doi 10.17488/RMIB.38.1.17
- Mayhua M., F. (2012). Adaptación y Comparativo de Rendimiento de la variedad Andenes 90 y siete líneas de tarwi (*Lupinus mutabilis* S.) en condiciones de Pampachacra-Huancavelica. (Tesis Ingeniería). Universidad Nacional del Centro del Perú, Jauja-Perú. Recuperado de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/545>
- Ministerios de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2008). Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú.
- Molano, M.L.; Cortés, M.L.; Ávila, P. Martens, S.D. Muñoz, L.S. (2016). Ecuaciones de calibración en espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 4 (3):139–145. doi 10.17138/TGFT(4)139-145
- Mostafa, A.A.; Awad-Allah.; Elkatry, H. (2013). Effect of debittering process on characterization of egyptian lupine seeds oil (*Lupinus albus*). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 7 (2): 728-734. Recuperado de https://pdfs.semanticscholar.org/6c2c/cf64182291fa626e8f6febacc7b3b735bf82.pdf?_ga=2.9722748.839758680.1596259133-124159983.1596259133
- Muneategui, S.; Paseiro, P.; Simal, J. (1992). Medida del grado de insaturación de aceites y grasas comestibles por espectroscopia infrarroja y su relación con el índice de yodo. *Revista del Consejo Superior de Investigaciones Científicas* 43 (1): 1-5. doi 10.3989/gya.1992.v43.i1.1188
- Muñoz M., G. (2013). Cuantificación rápida de productos de la Fermentación en un Biorreactor Anaerobio productor de Hidrógeno. (Tesis de maestría) Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Naczka, M.; Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and análisis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523 –1542. doi 10.1016/j.jpba.2006.04.002
- Nadal, P.; Canela, N.; Katakis, J.; O’Sullivan, C. (2011). Extraction, Isolation, and characterization of globulin proteins from *Lupinus albus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2752–2758. doi 10.1021/jf104062d
- Nielsen, S.S. (2008). *Análisis de los Alimentos*. España: Editorial Acribia. 657 p.
- Nikonenko, N.A.; Buslov, D.K.; Sushko, N.I.; Zhbakov, R.G. (2002). Analysis of the structure of carbohydrates with use of the regularized deconvolution method of

- vibrational spectra. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4 (6): 13-16. Recuperado de <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/228377>
- Oliveira, R.N.; Mancini, M.C.; Oliveira, F.C.S.; Passos, T.M.; Quility, B. Thiré, R.M.S.; Mcguiness, G.B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Revista Materia*, 21 (3): 767-779. doi 10.1590/S1517-707620160003.0072
- Ojeda Y., L.C. & Salazar B., J.A. (2011). Efecto de la Suplementación con harina de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) en el comportamiento productivo de cuyes (*Cavia porcellus*) en la fase de levante y engorde. (Tesis de maestría). Universidad de Nariño, Colombia. Recuperado de <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/85109.pdf>
- Oomah B.D.; Tiger, N.; Olson, M.; Balasubramanian, P. (2006). Phenolics and antioxidative Activities in Narrow-Leafed Lupins (*Lupinus angustifolius L.*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 61: 91-97. doi: 10.1007/s11130-006-0021-9
- Ortega D., E.; Rodriguez, A.; David, A.; Zamora B., A. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59 (1): 111-118. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/14094
- Ozcan, T.; Akpinar B., A.; Yilmaz E., L.; Delikanli, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5 (5): 393-396. doi: 10.7763/IJCEA.2014.V5.416
- Paliyath, G.; Murr, D.; Handa, A.; Lurie, S. (2008). *Postharvest Biology and Technology of fruits, vegetables and flowers*: Wiley-Blackwell. 497 p.
- Pandey, K.B. & Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (5): 270-278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498
- Peñarrieta, J.M.; Tejada, L.; Mollinedo P.; Villa J.; Bravo, J.A. (2014). Phenolic Compound in Food. *Revista Boliviana Química*, 31(2):68-81. doi: 10.13140/RG.2.1.5018.1840
- Porcel, M. (2011). Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético – espectrofotométricos de análisis. (Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona).
- Porras L., A.P. & López M., A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3 (1): 121-134.
- Pushkar, K. (2001). *Ecological Concept of Species and Individuals*.

- Quiroz R., C.N.; Aguilar M., M.A.; Ramírez O., M.E.; Ronquillo D., E. (2013). Estudio comparativo entre las técnicas de ultrasonido y maceración para la extracción de polifenoles del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*). Revista Mexicana de Ingeniería Química, 12 (1): 11-18. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382013000100002&lng=es&nrm=iso
- Quispe S., D. (2015). Composición nutricional de diez genotipos de lupino (*L. mutabilis*) desamargados por proceso acuoso. (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina). 215 p.
- Rachel S., T. (2012). Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades hipoglucémicas y tecno-funcionales de leguminosas. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid). 269 p. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10486/12817>
- Raja K., R.R.; Arumugam, R. Anantharaman, P. (2011). Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Seagrass Polyphenols. Current Bioactive Compounds, 7: 118-125. doi: 10.2174/157340711796011142
- Ramis, G. & García, AC. (2001). Quimiometría. España: Editorial Síntesis. 238 p.
- Resta, D.; Boschin, G.; Dágostina, A.; Arnoldi, A. (2008). Evaluation of total quinolizidine alkaloids content in lupin flours, lupin-based ingredients, and foods. Molecular Nutrition Food Research, 52: 490 – 495. doi: 10.1002/mnfr.200700206
- Riba, J.R. (2012). Identificación de muestras de papel mediante espectrometría IR y métodos multivariados. Afinidad LXIX 558: 87-94. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4095245>
- Rieppo, L.; Saarakkala, S.; Närhi, T.; Helminen, H.J.; Jurvelin, J.S.; Rieppo, J. (2012). Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of Fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. Osteoarthritis and Cartilage, 20: 451-459. doi: 10.1016/j.joca.2012.01.010
- Ríos C., A.; Cruz M., M.; Simonet S., B. M. (2012). Técnicas espectroscópicas en química analítica. Volumen I. España: Editorial Síntesis S.A. 458 p.
- Rohman, A.; Che Man, Y. B.; Ismail, A.; Puziah. H. 2011. FTIR spectroscopy combined with multivariate calibration for analysis of cod liver oil in binary mixture with corn oil. International Food Research Journal 18: 757-761. doi: 10.1016/j.vibspec.2010.10.001

- Sapienza S., D.; Berzagui, P.; Martin. N.; Taysom, D.; Owens, F.; Mahanna, B.; Sevenich, D.; Allen, R. (2008). Near Infrared Spectroscopy for forage and feed testing. Recuperado de https://www.foragelab.com/Media/nirs_white_paper.pdf
- Schoeneberger, H.; Gross, R.; Cremer, H.D.; Elmadfa, I. (1983). The protein quality of lupins (*Lupinus mutabilis*) alone and in combination with other protein sources. *Plant Foods for Human Nutrition*, 32: 133 - 43. doi: 10.1093/jn/112.1.70
- Schulz, H. & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43: 13-25. doi: 10.1016/j.vibspec.2006.06.001
- Seczyk, L.; Swieca, M.; Kapusta, I.; Gawlik-Dziki, U. (2019). Protein–phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. *Molecules*, 24 (408): 1-24. doi: 10.3390/molecules24030408
- Silva, M.A.; Brigide, P.; Toledo, N.M.V.; Canniatti B., S.G. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris L.*) submitted to cooking. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21: 1-8. doi: 10.1590/1981-6723.7216
- Silverstein, R.M.; Webster, F.X. Kiemle, D.J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. Seventh Edition: Jhon Wiley & Sons. 502p.
- Singh G.H.; Angurala, M.; Sharma, P.; Singh, J. (2011). Phenolic content and antioxidant activity of germinated and cooked pulses. *International Journal of Food Properties*, 14:1366 – 1374.
- Skoog, D.A.; West, D.M. Holler, F.J.; Crouch, S.R. (2015). *Fundamentos Química Analítica*. México. Cengage Learning. 958 p.
- Spraggs, R. A. (2000). IR Spectrometers (en línea). Academic Press. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*: 1048-1057. Recuperado de <https://kundoc.com/pdf-ir-spectrometers-.html>
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*: Editorial Wiley. 203p.
- Subramanian, A. & Rodríguez-Saona, L. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Dublin, Ireland, *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*: Elsevier Inc. 145–178. Doi 10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9
- Suca A., G.R. & Suca A., C.A. (2015). Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) como futura fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18 (2): 55-71. Recuperado de





- https://pdfs.semanticscholar.org/12af/88774821ced0ccee434f1f81fa1fe57285a1.pdf?_ga=2.7171323.839758680.1596259133-124159983.1596259133
- Sjahfirdi, L. Nasikin, M. Nasikin, M. (2012). Protein identification using Fourier transform infrared (FTIR). *International Journal of Recent Research and Applied Studies* 10 (3): 418-421.
- Tapia, M. E. (2000). Cultivos andinos sub explotados y su aporte a la alimentación (en línea). Segunda Edición. FAO. Santiago, Chile. Recuperado de http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/home10.htm
- Tapia, M.E.& Fries, A.M. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. Perú. Editorial FAO y ANPE. Recuperado de https://www.academia.edu/34873981/GU%C3%8DA_DE_CAMPO_DE_LOS_CULTIVOS_ANDINOS.pdf
- Theophanides, T. (2012). Introduction to Infrared Spectroscopy. *Materials Science, Engineering and Technology*, 1-10. Doi 10.5772/49106
- Tintaya C., E.M. (2017). Determinación de las propiedades físicas, químicas y nutricionales de harina instantánea de tarwi (*Lupinus tomentosus*). (Tesis de Ingeniería, Universidad Peruana Unión). 89 p.
- Tobias, R.D. (1996). An Introduction to Partial Least Squares Regression. Institute Inc., Cary, 1-8.
- Tsaliski, E.; Lagouri, V. Doxastakis, G. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus ssp. Graecus*). *Food Chemistry*,65:71-75. Doi 10.1016/S0308-8146(98)00172-1
- Türker K., S. & Huck, C.W. (2017). A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis. *Molecules*, 22 (168): 1-20. Doi 10.3390/molecules22010168
- Uribe H., K. (2010). Obtención de aguacate en polvo seco por aspersión y seguimiento de parámetros de calidad utilizando FTIR y análisis multivariable. (Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional). 108 p. Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/10392/330.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ventura G., J. F. (2007). Desarrollo de Métodos Analíticos Medio ambientalmente Sostenibles por Espectrometría FTIR. (Tesis doctoral, Universitat de Valencia). 232p. Recuperado de <http://roderic.uv.es/handle/10550/14964>

- Vivar V., V.M. (2009). Creación de un programa de mejoramiento de ecuaciones de calibración NIR y análisis de la información obtenida mediante el uso de esta tecnología. (Tesis Ingeniería, Universidad Austral de Chile). 53 p. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fav855c/doc/fav855c.pdf>
- Wang, S. & Clements, J. (2008). Antioxidant Activities of Lupin Seeds. Proceedings 12th International Lupin Conference. 14-18 sept. 546-550.
- Wiercigroch, E.; Szafraniec, E.; Czamara, K.; Pacia, M.Z.; Majzner, K.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M.; Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185: 317–335. Doi 10.1016/j.saa.2017.05.045
- Winnicki, K.; Ciereszko, I.; Lesniewska, J.; Dubis, A.T.; Basa, A.; Zabka, A. Holota, M.; Sobiech, L.; Faligowska, A. Skrzypczak, G.; Maszewski, J. Polit, J.T. (2019). Irrigation affects characteristics of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius L.*) seeds. *Planta*, 249:1731–1746. Doi 10.1007/s00425-019-03091-9
- Youdim, K.A. & Joseph, J.A. (2001). A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, 30: 583-594. Doi 10.1016/S0891-5849(00)00510-4
- Zozzi, S.; Ruiz, R.M.; Sorol, N.; Sastre, M. (2010). Espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS). Su aplicación en análisis de jugos de caña de azúcar. Tomo 87. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, (1): 1-6.









VIII. ANEXOS

ANEXO 1









CARACTERISTICAS DE 52 ECOTIPOS DE TARWI

Foto									
Código	Nombre	T1	Altagracia	T2	Compuesto blanco semi precoz	T3	Cholo fuerte	T4	Andenes INIA
Región de origen		La Libertad		Junín		Ancash		Cuzco	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)	

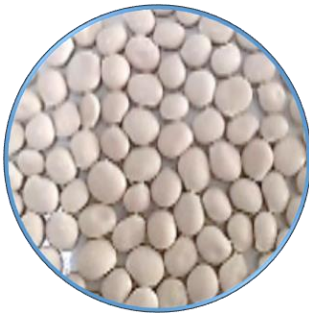







<<Continuación>>

Foto									
Código	Nombre	T5	Huánuco 2	T6	Patón grande	T7	Lircay – Huancavelica	T8	Huancavelica (Sihuas)
Región de origen		Huánuco		La Libertad		Huancavelica		Huancavelica	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)	
Foto									
Código	Nombre	T9	Puno 2	T 10	Puno 1	T 11	Cajamarca	T 12	Moteado beige
Región de origen		Puno		Puno		Cajamarca		Junín	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Beige (1)	









<<Continuación>>

Foto									
Código	Nombre	T 13	Cheje Copani blanco	T 14	H6 INIA	T 15	Yanamuclo 008-2	T 16	Yunguyo
Región de origen		Puno		Junín		Junín		Puno	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)	
Foto									
Código	Nombre	T 17	Yanamuclo PLGO	T 18	Huánuco 1	T 19	Andenes - 80	T 20	Pallasca
Región de origen		Junín		Huánuco		Ancash		Ancash	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Beige (1)	









<<Continuación>>

Foto									
Código	Nombre	T 21	Churibamba Huánuco 4384	T 22	Comercial	T 23	Chacas	T 24	H6 INIA plomo
Región de origen		Huánuco		-		Ancash		Junín	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Plomo (1)	
Foto									
Código	Nombre	T 25	CD Junín 1	T 26	CD Junín 2	T 27	CD Junín 3	T 28	CD Junín 4
Región de origen		Junín		Junín		Junín		Junín	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)	


<<Continuación>>

Foto									
Código	Nombre	T 29	CD Junín 5	T 30	CD Junín 6	T 31	CD Junín 9	T 32	SGC 22
Región de origen		Junín		Junín		Junín		Cuzco	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Beige (1)	
Foto									
Código	Nombre	T 33	CD Junín 10 -1	T 34	Yunguyo beige	T 35	Andenes UNALM	T 36	Yunguyo negro
Región de origen		Junín		Puno		Lima		Puno	
Color de cáscara		Crema		Beige		Crema		Negro	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Crema (3)	

<<Continuación>>

Foto									
Código	Nombre	T 37	Cheje Copani negro	T 38	Tauribamba (Sihuas) -1	T 39	CD Junín 7- 1	T 40	CD Junín 7 -2
Región de origen		Puno		Ancash		Junín		Junín	
Color de cáscara		Negro		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Crema (3)		Negro (1 y 3)		Ausente (0)		Negro (1)	
Foto									
Código	Nombre	T 41	Abancay	T 42	Vicos	T 43	Tauribamba blanco	T 44	CD Junín 10-2
Región de origen		Apurímac		Ancash		Ancash		Junín	
Color de cáscara		Crema		Crema		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Negro (1)	

<<Continuación>>

Foto									
Código	Nombre	T 45	Huallanca blanco	T 46	H6 INIA blanco	T 47	Yana tarwi	T 48	Yanamuclo 008-3
Región de origen		Ancash		Junín		Ancash		Junín	
Color de cáscara		Crema		Crema		Negro		Crema	
Color secundario (valoración)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)		Ausente (0)	
Foto									
Código	Nombre	T 49	Tauribamba (Sihuas)-2	T 50	Huánuco 2	T 51	PLGO 3	T 52	Huánuco 1 B/N
Región de origen		Ancash		Huánuco		La Libertad		Huánuco	
Color de cáscara		Crema		Negro		Crema		Crema	
Color secundario (valoración)		Beige (1, 3 y 9)		Ausente (0)		Ausente (0)		Negro (1 y 9)	

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Preparación de soluciones

1. **Solución Folin Ciocalteau 0,25 N.** Tomar 1,25 mL de Folin Ciocalteau y enrasar a 10 mL con agua destilada en una fiola.
2. **Solución de Ácido Gálico.** Pesar 25 mg de ácido gálico y enrasar a 100 mL con agua destilada, de esta solución tomar 2 mL y enrasar a 10 mL.
3. **Solución de Carbonato de Sodio al 20%.** Tomar 2g de carbonato de sodio y agregar agua destilada hasta enrase de 10 mL en una fiola, agitar y calentar a 70°C y 80°C hasta disolución y enfriar.

Curva estándar

1. En tubos ependorf de 1,5 mL, añadir solución de ácido gálico.
2. Añadir 100 µL de solución de Folin Ciocalteau, agitar y reposar por 5 minutos.
3. Añadir 50 µL de solución de carbonato de sodio a cada tubo ependorf, agitar y enrasar con agua destilada hasta 1250 µL homogenizar y reposar 2 min.
4. Leer en el espectrofotómetro a 726 nm.

Preparación del extracto fenólico

1. La relación de de tarwi molido desgrasado (g): solvente (ml) fue 1:20; siendo el solvente una solución de etanol al 50%.
2. La mezcla fue sonicada dos veces en un baño de ultrasonido, siendo cada período de 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Posterior, se centrifugó a 3000 RPM por 15 minutos a 5°C. Separar el sobrenadante del extracto del sólido en tubos.

Cuantificación en el extracto de la muestra

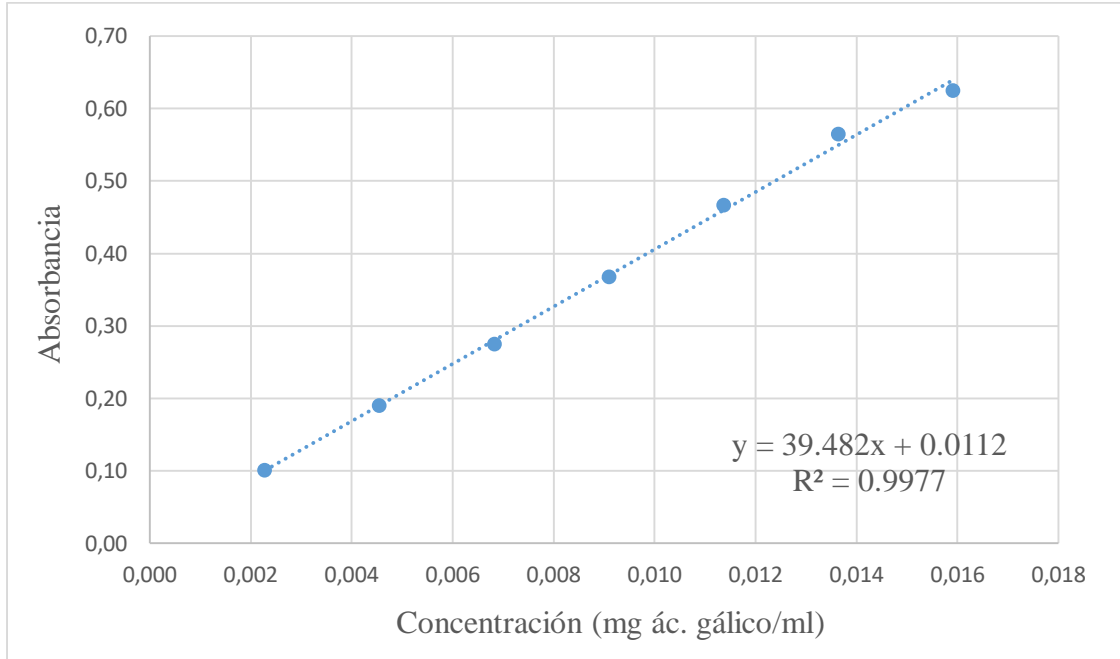
1. Tomar 400 μL del sobrenadante del extracto y enrasar a 100 μL .
2. Tomar 300 μL de la dilución y colocar en tubo ependorf.
3. Añadir 100 μL de solución de Folin Ciocalteau, agitar y reposar 3 minutos.
4. Añadir 50 μL de solución de carbonato de sodio al 20%, agitar, y reposar por 7 minutos.
5. Enrasar adicionando 800 μL de agua destilada y homogenizar.
6. Dejar reposar por 20 minutos.
7. Depositar cuidadosamente 200 μL de muestra y/o estándar en cada pocillo y programar la lectura en el espectrofotómetro a 726 nm.

Tabla 17. Composición de las soluciones para la curva estándar de fenólicos totales en micropozos

Tubo	Extracto de muestra (μL)	Solución de Ácido gálico (μL)	Solución de Folin Ciocalteau (μL)	Solución de Carbonato (μL)	Agua destilada (μL)	Total (μL)
1	-	50	100	50	1050	1250
2	-	100	100	50	1000	1250
3	-	150	100	50	900	1250
4	-	200	100	50	800	1250
5	-	250	100	50	700	1250
6	-	300	100	50	600	1250
Blanco	-	-	100	50	1100	1250
Muestra	300	-	100	50	800	1250

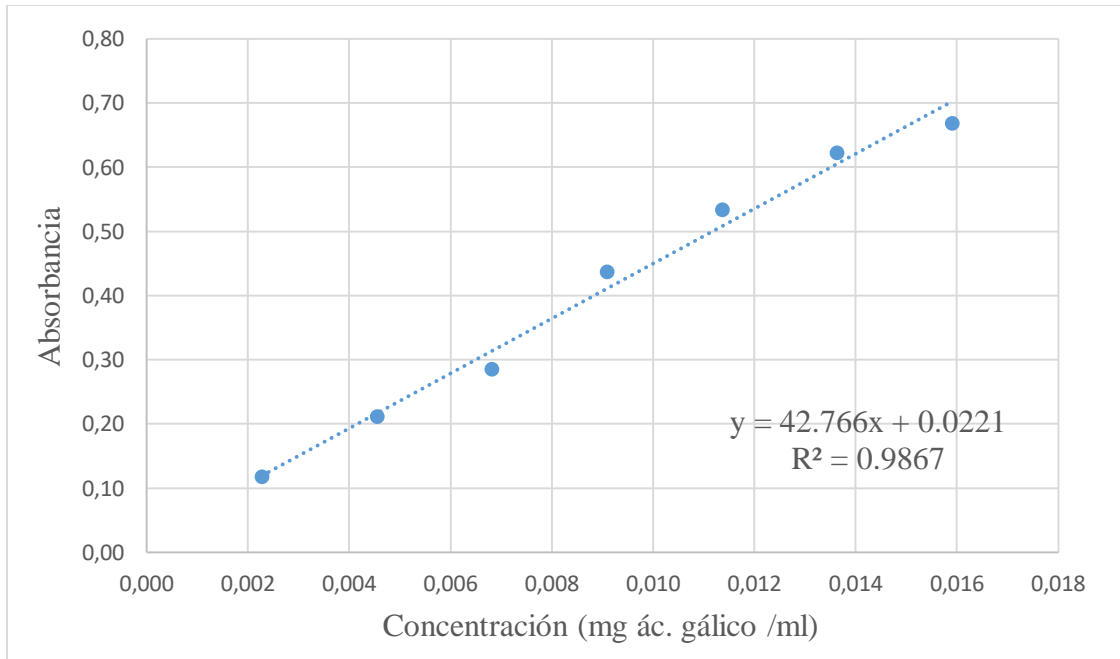
ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO



ANEXO 4

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN TARWI DESAMARGADO



ANEXO 5

CONTENIDO DE HUMEDAD DE LOS 52 ECOTIPOS DE TARWI

CÓDIGO	NOMBRE DE ECOTIPO	HUMEDAD (%)	
		Ecotipo amargo	Ecotipo desamargado
T 1	Altagracia	8.44 ± 0.10	7.23 ± 0.04
T 2	Compuesto blanco semi precoz	7.46 ± 0.11	8.58 ± 0.03
T 3	Cholo fuerte	8.98 ± 0.11	8.33 ± 0.23
T 4	Andenes INIA	8.47 ± 0.06	7.63 ± 0.25
T 5	Huánuco 2	9.01 ± 0.11	8.22 ± 0.33
T 6	Patón grande	8.39 ± 0.12	6.77 ± 0.05
T 7	Lircay –Huancavelica	8.08 ± 0.23	8.38 ± 0.23
T 8	Huancavelica (Sihuas)	8.36 ± 0.16	6.49 ± 0.28
T 9	Puno 2	8.40 ± 0.07	8.81 ± 0.43
T 10	Puno 1	8.25 ± 0.07	7.34 ± 0.49
T 11	Cajamarca	8.01 ± 0.45	7.86 ± 0.08
T 12	Moteado beige	8.34 ± 0.02	7.68 ± 0.45
T 13	Cheje Copani blanco	8.31 ± 0.26	6.16 ± 0.37
T 14	H6 INIA	8.35 ± 0.28	5.90 ± 0.14
T 15	Yanamuclo 008-2	8.07 ± 0.13	7.85 ± 0.21
T 16	Yunguyo	8.88 ± 0.37	7.90 ± 0.14
T 17	Yanamuclo PLGO	8.00 ± 0.14	5.55 ± 0.21
T 18	Huánuco 1	8.39 ± 0.19	7.75 ± 0.07
T 19	Andenes – 80	8.55 ± 0.35	6.00 ± 0.0
T 20	Pallasca	8.75 ± 0.14	7.65 ± 0.21
T 21	Churibamba Huánuco	7.55 ± 0.35	6.76 ± 0.32
T 22	Comercial (mezcla)	8.15 ± 0.49	7.82 ± 0.25
T 23	Chacas	9.80 ± 0.28	6.99 ± 0.12
T 24	H6 INIA plomo	7.70 ± 0.0	5.60 ± 0.13
T 25	CD Junín 1	8.27 ± 0.52	4.77 ± 0.07
T 26	CD Junín 2	9.13 ± 0.35	7.00 ± 0.08
T 27	CD Junín 3	8.87 ± 0.04	8.28 ± 0.54
T 28	CD Junín 4	8.79 ± 0.18	5.19 ± 0.04

<<Continuación>>

T 29	CD Junín 5	8.58 ± 0.45	5.06 ± 0.13
T 30	CD Junín 6	8.72 ± 0.04	6.33 ± 0.40
T 31	CD Junín 9	7.70 ± 0.0	7.80 ± 0.0
T 32	SGC 22	7.90 ± 0.14	5.60 ± 0.28
T 33	CD Junín 10-1	8.40 ± 0.57	7.70 ± 0.42
T 34	Yunguyo beige	7.65 ± 0.49	5.65 ± 0.02
T 35	Andenes UNALM	7.60 ± 0.28	8.00 ± 0.0
T 36	Yunguyo negro	7.60 ± 0.28	7.55 ± 0.35
T 37	Cheje Copani negro	8.65 ± 0.23	6.00 ± 0.0
T 38	Tauribamba (Sihuas) -1	9.60 ± 0.28	5.24 ± 0.03
T 39	CD Junín 7- 1	9.90 ± 0.14	5.90 ± 0.0
T 40	CD Junín 7 -2	8.11 ± 0.16	7.85 ± 0.21
T 41	Abancay	7.65 ± 0.13	5.47 ± 0.28
T 42	Vicos	7.75 ± 0.07	5.90 ± 0.0
T 43	Tauribamba blanco	7.73 ± 0.20	5.65 ± 0.21
T 44	CD Junín 10-2	8.60 ± 0.18	7.85 ± 0.21
T 45	Huallanca blanco	7.78 ± 0.26	5.90 ± 0.14
T 46	H6 INIA blanco	8.35 ± 0.49	6.90 ± 0.28
T 47	Yana tarwi	7.75 ± 0.07	6.40 ± 0.09
T 48	Yanamuclo 008-3	8.50 ± 0.85	5.95 ± 0.07
T 49	Tauribamba (Sihuas)-2	7.51 ± 0.26	7.70 ± 0.0
T 50	Tauribamba (Sihuas)-3	8.09 ± 0.23	7.50 ± 0.0
T 51	PLGO 3	9.60 ± 0.28	7.60 ± 0.28
T 52	Huánuco 1 B/N	7.90 ± 0.14	5.70 ± 0.0

*2 repeticiones. Promedio ± Desv. estándar

ANEXO 6





PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE GRASA EN TARWI MOLIDO

CÓDIGO	REDUCCIÓN DE GRASA (%)		CÓDIGO	REDUCCIÓN DE GRASA (%)	
	Amargo	Desamargado		Amargo	Desamargado
T 1	13.42	11.42	T 27	13.24	10.92
T 2	14.07	17.84	T 28	14.55	19.98
T 3	12.78	18.63	T 29	13.96	16.13
T 4	13.58	12.31	T 30	13.06	16.38
T 5	11.01	8.27	T 31	13.69	9.72
T 6	12.33	16.56	T 32	15.67	18.72
T 7	15.10	14.6	T 33	10.56	19.91
T 8	12.26	13.12	T 34	14.24	16.43
T 9	14.01	18.83	T 35	12.12	19.51
T 10	16.03	16.16	T 36	11.60	17.46
T 11	13.74	11.07	T 37	14.00	12.16
T 12	14.51	16.96	T 38	12.37	17.87
T 13	14.20	15.03	T 39	13.23	16.32
T 14	16.03	21.41	T 40	14.13	14.48
T 15	13.99	17.94	T 41	10.41	14.06
T 16	14.17	16.48	T 42	14.13	14.96
T 17	9.77	16.60	T 43	13.10	10.78
T 18	11.08	18.78	T 44	13.50	17.63
T 19	15.94	13.87	T 45	10.04	18.37
T 20	12.58	11.89	T 46	14.56	19.95
T 21	13.95	20.02	T 47	13.12	12.77
T 22	13.43	13.31	T 48	12.81	15.95
T 23	13.63	17.29	T 49	13.83	20.10
T 24	11.57	8.58	T 50	15.61	15.71
T 25	11.09	16.54	T 51	11.14	20.07
T 26	12.65	16.69	T 52	11.63	15.66

ANEXO 7
MEDICIÓN EN EL INFRARROJO CON EL ESPECTRÓMETRO PORTÁTIL
(TRU DEFENDER FT)



Figura 31. Equipo portátil ATR-FTIR

1. Encender el equipo con el botón  (ON/OFF)
2. Del menú inicial seleccionar la opción TOOLS con la tecla  (OK)
3. Posterior seleccionar la opción MANUAL SCAN, con la tecla  (OK).
4. Retirar la tapa.
5. Limpiar completamente el cristal de diamante (\varnothing 2mm) en donde se ubicará la muestra, esta se ubica en la parte superior del equipo portátil.
6. Seleccionar la opción BACKGROUND SCAN, con la tecla  (OK). Dejar por unos segundos registrar esta lectura.
7. Posterior colocar la muestra de manera tal que cubra completamente el cristal de diamante.
8. Ubicar la tapa de modo que cubra la muestra y encaje en el equipo.

9. Seleccionar la opción SAMPLE SCAN, con la tecla **↵** (OK). Dejar por unos segundos registrar la lectura del espectro (4000 a 700 cm^{-1}).
10. Concluida la lectura, se puede observar el espectro en su totalidad; para ello presionar la tecla **↵** (OK), y seleccionar la opción VIEW ESPECTRUM.
11. Para exportar (guardar) el espectro, primero volver al menú presionado la tecla X (atrás). Luego presionar la tecla **↵** (OK), seleccionar la opción EXPORT y guardar en el formato spc.
12. Para realizar la siguiente lectura, presionar cualquier tecla.
13. Luego continuar con el procedimiento mencionado anteriormente desde el paso 5, para cada repetición y/o muestra.

ANEXO 8

CONTENIDO PROTEICO EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO

CÓDIGO	PROTEÍNA (%)	
	AMARGO	DESAMARGADO
T 1	43.76 ± 0.08	51.51 ± 0.78
T 2	40.22 ± 0.37	42.07 ± 0.17
T 3	42.94 ± 0.57	44.72 ± 0.30
T 4	38.90 ± 0.99	49.50 ± 1.67
T 5	39.39 ± 0.18	49.20 ± 0.05
T 6	43.23 ± 0.26	51.27 ± 0.21
T 7	39.30 ± 0.07	40.49 ± 0.22
T 8	37.66 ± 0.52	47.51 ± 0.09
T 9	37.00 ± 0.13	44.24 ± 0.19
T 10	34.46 ± 0.32	50.57 ± 0.91
T 11	41.32 ± 0.08	55.83 ± 0.06
T 12	41.43 ± 0.24	52.43 ± 1.09
T 13	37.65 ± 0.48	52.09 ± 0.52
T 14	38.10 ± 0.10	54.61 ± 0.86
T 15	40.74 ± 0.61	54.74 ± 0.66
T 16	38.33 ± 0.13	50.81 ± 0.05
T 17	41.88 ± 0.24	55.43 ± 0.33
T 18	40.04 ± 0.10	45.88 ± 1.02
T 19	37.72 ± 0.19	47.92 ± 0.09
T 20	41.55 ± 0.14	56.75 ± 0.16
T 21	41.59 ± 0.32	52.94 ± 0.50
T 22	40.75 ± 0.51	53.43 ± 1.86
T 23	37.61 ± 0.19	52.03 ± 0.79
T 24	38.80 ± 0.63	53.11 ± 0.45
T 25	40.29 ± 0.88	50.4 ± 0.31
T 26	39.12 ± 0.52	50.39 ± 0.97
T 27	39.14 ± 0.74	52.30 ± 0.55
T 28	38.21 ± 1.33	48.98 ± 1.23

<<Continuación>>

T 29	40.21 ± 0.35	50.51 ± 1.33
T 30	37.64 ± 0.54	54.24 ± 0.07
T 31	40.81 ± 0.57	54.80 ± 0.32
T 32	39.75 ± 0.46	54.04 ± 0.03
T 33	38.03 ± 0.32	49.48 ± 0.09
T 34	35.95 ± 0.28	46.49 ± 1.36
T 35	38.72 ± 0.10	47.78 ± 0.09
T 36	37.54 ± 0.84	49.70 ± 0.23
T 37	37.91 ± 0.17	47.31 ± 0.20
T 38	39.71 ± 0.20	51.23 ± 0.25
T 39	40.27 ± 0.36	50.42 ± 0.61
T 40	38.03 ± 1.16	47.99 ± 1.06
T 41	40.99 ± 0.80	51.28 ± 0.40
T 42	40.48 ± 0.15	50.63 ± 1.42
T 43	38.63 ± 0.01	49.70 ± 0.28
T 44	38.73 ± 0.33	47.86 ± 0.12
T 45	39.11 ± 0.15	49.41 ± 0.19
T 46	40.79 ± 0.92	45.12 ± 0.47
T 47	42.87 ± 1.22	52.00 ± 0.02
T 48	40.15 ± 0.30	50.65 ± 0.41
T 49	39.77 ± 0.39	45.83 ± 0.77
T 50	38.10 ± 0.16	46.96 ± 0.09
T 51	43.49 ± 0.20	49.96 ± 0.49
T 52	40.43 ± 0.72	52.03 ± 0.31

Gramos de proteína en 100g de tarwi integral molido (base seca). n=2. Promedio ± Desv. estándar

ANEXO 9
CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO Y
DESAMARGADO

CÓDIGO	FENÓLICOS (mg EAG/ 100 g)	
	AMARGO	DESAMARGADO
T 1	505.32 ± 0.93	174.02 ± 5.57
T 2	526.80 ± 6.24	103.17 ± 2.76
T 3	510.78 ± 7.41	96.50 ± 2.12
T 4	522.75 ± 3.95	179.55 ± 1.09
T 5	479.63 ± 6.56	176.97 ± 3.40
T 6	498.50 ± 0.77	156.18 ± 0.99
T 7	495.37 ± 6.24	112.44 ± 2.44
T 8	487.81 ± 12.92	146.96 ± 2.44
T 9	461.31 ± 6.61	94.45 ± 0.62
T 10	486.88 ± 5.34	156.50 ± 4.91
T 11	469.97 ± 3.04	111.54 ± 4.10
T 12	519.94 ± 17.42	127.13 ± 4.20
T 13	510.87 ± 9.36	136.05 ± 1.12
T 14	484.90 ± 14.39	164.42 ± 6.01
T 15	474.19 ± 15.51	174.36 ± 1.37
T 16	513.39 ± 0.54	187.89 ± 2.92
T 17	503.63 ± 2.04	152.74 ± 1.21
T 18	469.26 ± 6.48	163.81 ± 0.22
T 19	508.32 ± 1.71	116.33 ± 2.12
T 20	494.19 ± 0.39	155.59 ± 3.46
T 21	489.93 ± 14.40	119.53 ± 0.76
T 22	472.71 ± 5.42	190.12 ± 0.95
T 23	449.52 ± 18.39	160.62 ± 1.03
T 24	496.35 ± 10.93	162.42 ± 6.07
T 25	520.43 ± 1.93	157.69 ± 1.05
T 26	526.71 ± 3.5	149.40 ± 2.82
T 27	520.91 ± 11.18	150.44 ± 2.92

<<Continuación>>

T 28	505.52 ± 2.46	148.18 ± 3.34
T 29	480.49 ± 7.78	144.40 ± 0.23
T 30	487.16 ± 8.27	192.31 ± 3.12
T 31	490.06 ± 3.66	108.91 ± 0.95
T 32	483.09 ± 5.34	125.92 ± 1.29
T 33	487.48 ± 15.49	168.18 ± 0.68
T 34	466.65 ± 3.86	164.89 ± 3.39
T 35	437.39 ± 3.65	135.82 ± 1.91
T 36	473.68 ± 10.88	193.70 ± 7.40
T 37	508.78 ± 13.21	185.42 ± 4.06
T 38	496.12 ± 9.97	156.34 ± 4.29
T 39	476.27 ± 11.80	182.27 ± 1.61
T 40	488.81 ± 3.58	144.73 ± 4.37
T 41	509.58 ± 11.13	184.54 ± 7.37
T 42	494.95 ± 0.83	135.50 ± 2.64
T 43	480.46 ± 5.47	133.33 ± 6.61
T 44	492.34 ± 11.99	131.97 ± 1.57
T 45	499.12 ± 3.82	204.67 ± 0.95
T 46	494.77 ± 4.44	106.79 ± 1.13
T 47	488.77 ± 10.41	113.63 ± 1.99
T 48	483.50 ± 10.08	147.23 ± 0.70
T 49	494.62 ± 3.95	128.72 ± 4.93
T 50	460.91 ± 2.89	126.17 ± 3.26
T 51	428.49 ± 1.79	102.96 ± 1.02
T 52	455.44 ± 11.72	116.84 ± 3.70

mg AGE/100 g = Miligramos equivalente de ácido gálico en 100 g de tarwi integral molido (base seca). n=2. Promedio ± Desv. estándar

ANEXO 10

VECTOR DE REGRESIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO

Ecuación de calibración: Y (contenido de proteína) = $a_1 A_1 + a_2 A_2 + a_3 A_3 + \dots + a_{106} A_{106}$

a: Cargas o pesos a determinado números de onda

A: Absorbancia a determinado número de onda

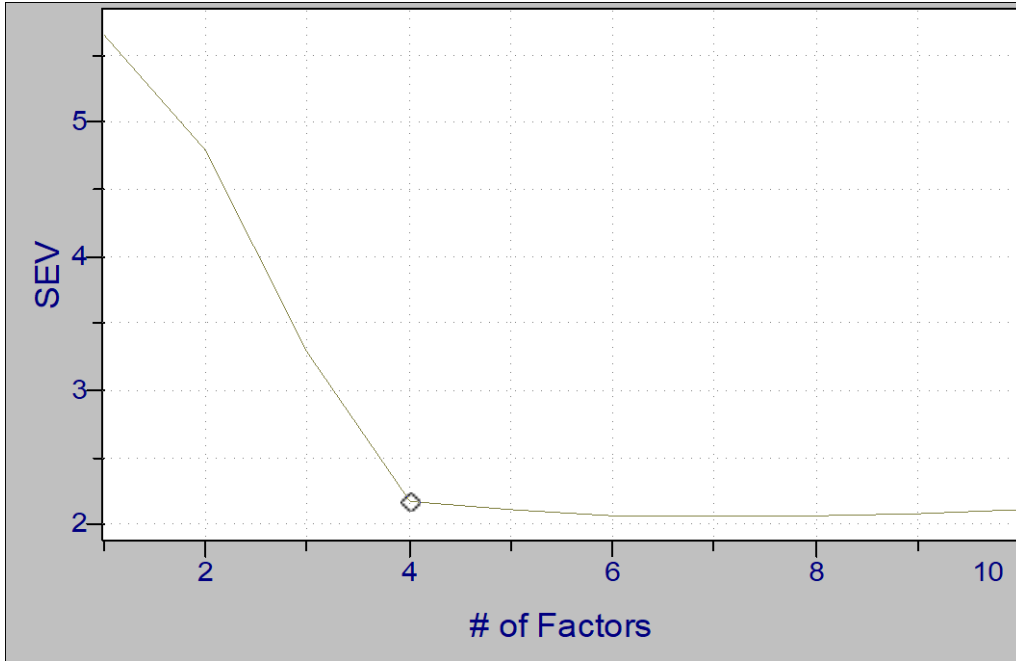
NMERO DE ONDA	VECTOR DE REGRESIÓN		NÚMERO DE ONDA	VECTOR DE REGRESIÓN	
1432.74	a ₁	-1050.6633	1584.92	a ₅₄	-3542.2192
1435.61	a ₂	-368.6135	1587.79	a ₅₅	-4022.2217
1438.48	a ₃	358.6154	1590.66	a ₅₆	-4632.5020
1441.36	a ₄	1036.2831	1593.53	a ₅₇	-4671.8477
1444.23	a ₅	1754.2692	1596.40	a ₅₈	-4665.3862
1447.10	a ₆	2610.3953	1599.27	a ₅₉	-5031.0151
1449.97	a ₇	3175.2383	1602.14	a ₆₀	-4741.1104
1452.84	a ₈	3800.2554	1605.02	a ₆₁	-5412.2920
1455.71	a ₉	4445.3696	1607.89	a ₆₂	-5516.9775
1458.58	a ₁₀	4550.5420	1610.76	a ₆₃	-5206.9966
1461.45	a ₁₁	4453.7476	1613.63	a ₆₄	-4911.1895
1464.33	a ₁₂	4304.7778	1616.50	a ₆₅	-4731.0894
1467.20	a ₁₃	3969.5154	1619.37	a ₆₆	-4364.9976
1470.07	a ₁₄	3335.3420	1622.24	a ₆₇	-4033.7988
1472.94	a ₁₅	2786.9236	1625.11	a ₆₈	-3622.7185
1475.81	a ₁₆	2087.1045	1627.98	a ₆₉	-3376.2302
1478.68	a ₁₇	1335.9985	1630.86	a ₇₀	-3033.4453
1481.55	a ₁₈	587.4310	1633.73	a ₇₁	-2476.3333
1484.42	a ₁₉	-41.3418	1636.60	a ₇₂	-2560.7170
1487.29	a ₂₀	-777.6357	1639.47	a ₇₃	-2428.5139
1490.17	a ₂₁	-897.4223	1642.34	a ₇₄	-2360.5659
1493.04	a ₂₂	-1658.1483	1645.21	a ₇₅	-2148.9880

<<Continuación>>

1495.91	a ₂₃	-2282.6458	1648.08	a ₇₆	-2152.1689
1498.78	a ₂₄	-2926.6860	1650.95	a ₇₇	-1933.6611
1501.65	a ₂₅	-3419.4189	1653.83	a ₇₈	-1928.2565
1504.52	a ₂₆	-3865.4614	1656.70	a ₇₉	-1730.4662
1507.39	a ₂₇	-4438.9365	1659.57	a ₈₀	-1422.6399
1510.26	a ₂₈	-4387.7495	1662.44	a ₈₁	-842.3301
1513.14	a ₂₉	-4338.7378	1665.31	a ₈₂	-63.7862
1516.01	a ₃₀	-3920.3501	1668.18	a ₈₃	802.1117
1518.88	a ₃₁	-3066.0347	1671.05	a ₈₄	2140.4878
1521.75	a ₃₂	-2312.4353	1673.92	a ₈₅	3587.4709
1524.62	a ₃₃	-1276.5013	1676.80	a ₈₆	5021.8130
1527.49	a ₃₄	-266.3657	1679.67	a ₈₇	6326.1211
1530.36	a ₃₅	919.9883	1682.54	a ₈₈	7422.5801
1533.23	a ₃₆	2059.1990	1685.41	a ₈₉	8060.6982
1536.11	a ₃₇	3094.8489	1688.28	a ₉₀	8744.0605
1538.98	a ₃₈	4026.4543	1691.15	a ₉₁	8878.6445
1541.85	a ₃₉	4865.2842	1694.02	a ₉₂	8611.7061
1544.72	a ₄₀	5442.9204	1696.89	a ₉₃	7849.7310
1547.59	a ₄₁	5612.5986	1699.77	a ₉₄	7102.1289
1550.46	a ₄₂	5714.6655	1702.64	a ₉₅	5198.9243
1553.33	a ₄₃	5601.3940	1705.51	a ₉₆	4251.7119
1556.20	a ₄₄	4967.8335	1708.38	a ₉₇	2714.3320
1559.08	a ₄₅	4461.5815	1711.25	a ₉₈	1236.5493
1561.95	a ₄₆	3609.2971	1714.12	a ₉₉	-211.0225
1564.82	a ₄₇	2551.4963	1716.99	a ₁₀₀	-1236.4249
1567.69	a ₄₈	1386.4486	1719.86	a ₁₀₁	-2304.1165
1570.56	a ₄₉	-14.1493	1722.74	a ₁₀₂	-2929.0645
1573.43	a ₅₀	-1109.5426	1725.61	a ₁₀₃	-3726.9795
1576.30	a ₅₁	-2164.8511	1728.48	a ₁₀₄	-3892.6445
1579.17	a ₅₂	-2861.9985	1731.35	a ₁₀₅	-4051.3572
1582.05	a ₅₃	-3370.3245	1734.22	a ₁₀₆	-4355.3379

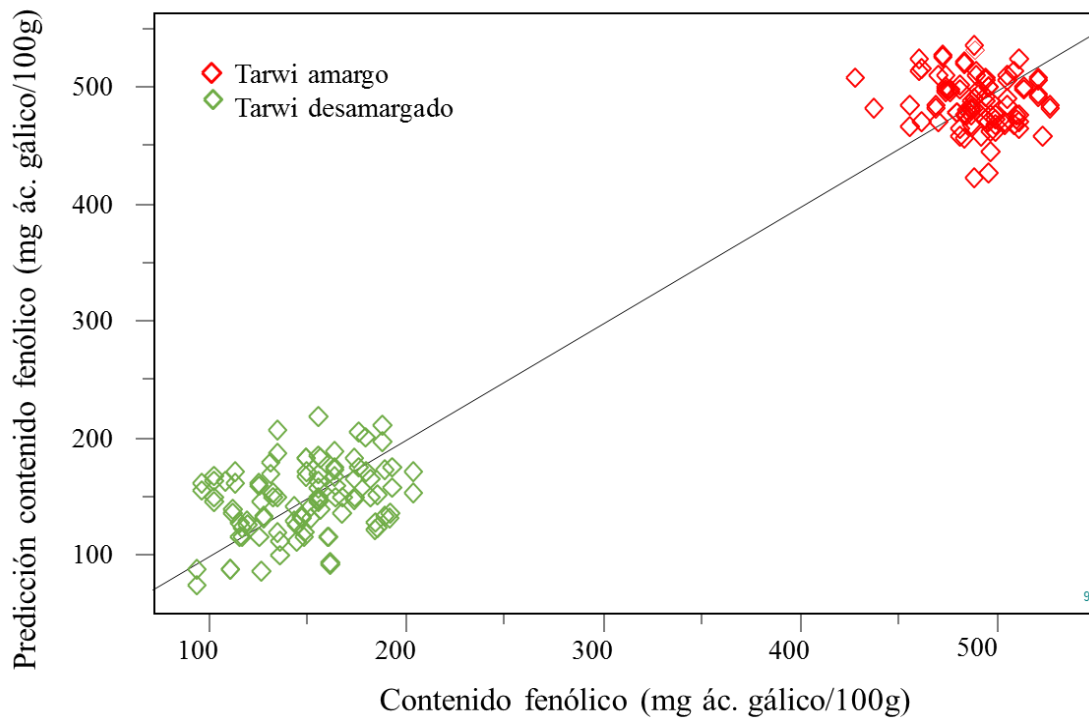
ANEXO 11

NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES PARA EL MODELO PLSR DE PROTEÍNA EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO



ANEXO 12

PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO Y DESAMARGADO



ANEXO 13

VECTOR DE REGRESIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI AMARGO

Ecuación de calibración:

$$Y \text{ (contenido de fenólicos totales)} = a_1 A_1 + a_2 A_2 + a_3 A_3 + \dots + a_{89} A_{89}$$

a: Cargas o pesos a determinado números de onda

A: Absorbancia a determinado número de onda

NÚMERO DE ONDA	VECTOR DE REGRESIÓN		NÚMERO DE ONDA	VECTOR DE REGRESIÓN	
1401.16	a ₁	4720.1177	1627.98	a ₄₆	-17784.0508
1404.03	a ₂	9651.8467	1630.86	a ₄₇	-17675.1875
1406.90	a ₃	15050.9336	1633.73	a ₄₈	-19334.9336
1409.77	a ₄	19097.4590	1636.60	a ₄₉	-26147.3555
1412.64	a ₅	19665.8906	1639.47	a ₅₀	-30896.2422
1415.51	a ₆	16464.8262	1642.34	a ₅₁	-36833.5469
1418.39	a ₇	12820.4092	1645.21	a ₅₂	-42469.0430
1421.26	a ₈	8806.1133	1648.08	a ₅₃	-48148.0898
1424.13	a ₉	598.6898	1650.95	a ₅₄	-51873.5352
1427.00	a ₁₀	-9196.8447	1653.83	a ₅₅	-55187.7109
1429.87	a ₁₁	-19965.6309	1656.70	a ₅₆	-54274.6953
1432.74	a ₁₂	-29155.1445	1659.57	a ₅₇	-51587.6719
1435.61	a ₁₃	-40122.7031	1662.44	a ₅₈	-46567.7734
1438.48	a ₁₄	-51687.7031	1665.31	a ₅₉	-40524.2031
1441.36	a ₁₅	-61319.8945	1668.18	a ₆₀	-34002.8359
1444.23	a ₁₆	-70753.8906	1671.05	a ₆₁	-28888.4512
1447.10	a ₁₇	-74397.5781	1673.92	a ₆₂	-24138.2383
1449.97	a ₁₈	-78296.1172	1676.80	a ₆₃	-18861.2188
1452.84	a ₁₉	-77846.1172	1679.67	a ₆₄	-14276.6553
1455.71	a ₂₀	-76048.4141	1682.54	a ₆₅	-11783.8369
1458.58	a ₂₁	-72728.7734	1685.41	a ₆₆	-8796.2920
1461.45	a ₂₂	-68832.2422	1688.28	a ₆₇	-6352.9717

<<Continuación>>

1464.33	a ₂₃	-63687.4102	1691.15	a ₆₈	-997.8177
1467.20	a ₂₄	-55549.6797	1694.02	a ₆₉	3040.2493
1470.07	a ₂₅	-47072.4688	1696.89	a ₇₀	3927.6763
1472.94	a ₂₆	-35439.2070	1699.77	a ₇₁	2434.8413
1475.81	a ₂₇	-21742.6523	1702.64	a ₇₂	399.4279
1478.68	a ₂₈	-6901.3721	1705.51	a ₇₃	-1762.3767
1481.55	a ₂₉	10894.0166	1708.38	a ₇₄	-5316.3188
1484.42	a ₃₀	31633.5430	1711.25	a ₇₅	-11561.8604
1487.29	a ₃₁	50664.9180	1714.12	a ₇₆	-14848.2266
1490.17	a ₃₂	69833.3047	1716.99	a ₇₇	-16428.6523
1493.04	a ₃₃	89266.7578	1719.86	a ₇₈	-17077.2754
1495.91	a ₃₄	107603.8516	1722.74	a ₇₉	-14727.5430
1498.78	a ₃₅	123416.8906	1725.61	a ₈₀	-12147.8164
1501.65	a ₃₆	134487.5156	1728.48	a ₈₁	-6703.9722
1602.14	a ₃₇	-83522.6563	1731.35	a ₈₂	-1169.3368
1605.02	a ₃₈	-69874.9766	1734.22	a ₈₃	5537.2427
1607.89	a ₃₉	-54958.6523	1737.09	a ₈₄	17292.2910
1610.76	a ₄₀	-39933.3242	1739.96	a ₈₅	25354.7520
1613.63	a ₄₁	-33061.2344	1742.83	a ₈₆	32996.1836
1616.50	a ₄₂	-27769.2266	1745.71	a ₈₇	40833.2734
1619.37	a ₄₃	-21750.9785	1748.58	a ₈₈	48357.0195
1622.24	a ₄₄	-19273.0176	1751.45	a ₈₉	53871.0625
1625.11	a ₄₅	-17572.9355			

ANEXO 14

VECTOR DE REGRESIÓN PARA EL MODELO DE CALIBRACIÓN DEL CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES EN TARWI DESAMARGADO

Ecuación de calibración:

$$Y \text{ (contenido de fenólicos totales)} = a_1 A_1 + a_2 A_2 + a_3 A_3 + \dots + a_{90} A_{90}$$

a: Cargas o pesos a determinado números de onda

A: Absorbancia a determinado número de onda

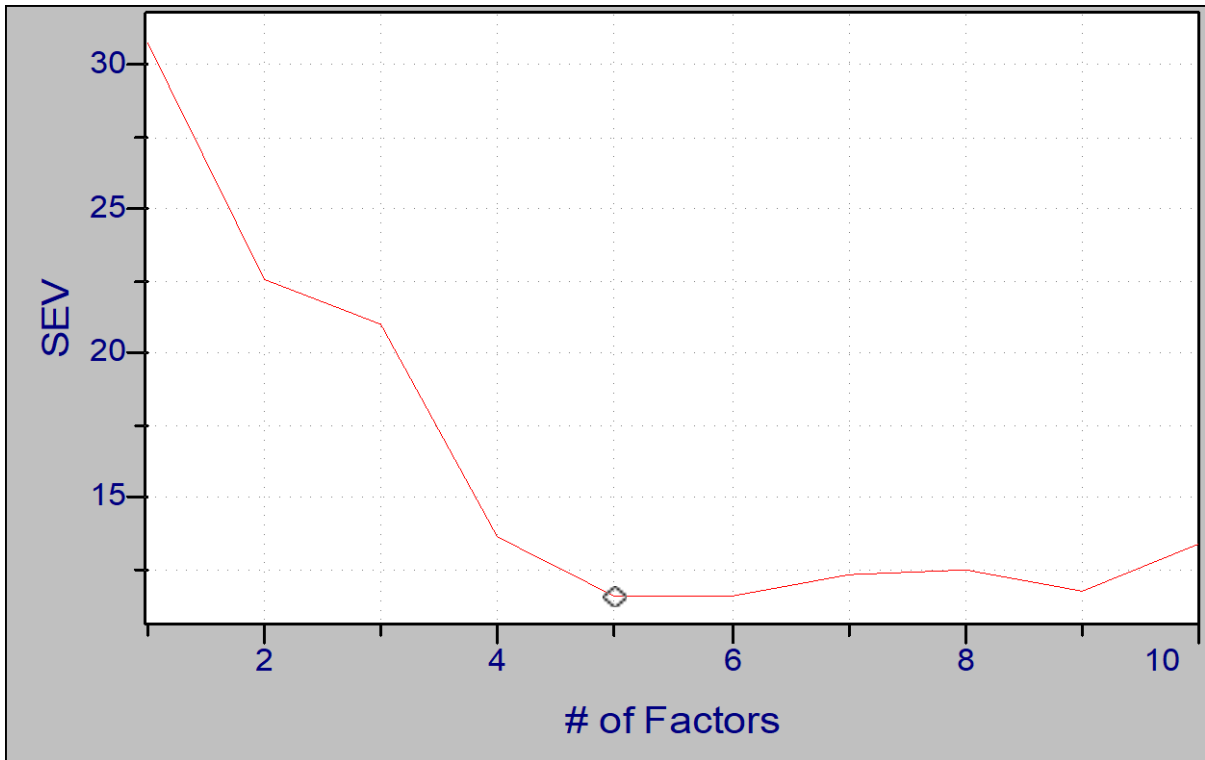
NÚMERO DE ONDA	VECTOR DE REGRESIÓN		NÚMERO DE ONDA	VECTOR DE REGRESIÓN	
1401.16	a ₁	-78020.9453	1625.11	a ₄₆	-6122.9243
1404.03	a ₂	-78734.7344	1627.98	a ₄₇	-7071.9702
1406.90	a ₃	-77351.5625	1630.86	a ₄₈	-422.4891
1409.77	a ₄	-80680.7266	1633.73	a ₄₉	3781.7490
1412.64	a ₅	-82221.5156	1636.60	a ₅₀	971.2373
1415.51	a ₆	-83631.6719	1639.47	a ₅₁	-1751.2656
1418.39	a ₇	-83640.6797	1642.34	a ₅₂	-10374.8447
1421.26	a ₈	-79032.5000	1645.21	a ₅₃	-16069.2393
1424.13	a ₉	-76318.3359	1648.08	a ₅₄	-23616.6992
1427.00	a ₁₀	-69488.0703	1650.95	a ₅₅	-34932.7148
1429.87	a ₁₁	-59284.0703	1653.83	a ₅₆	-51501.1055
1432.74	a ₁₂	-40740.0820	1656.70	a ₅₇	-66512.2031
1435.61	a ₁₃	-19143.2715	1659.57	a ₅₈	-82857.0859
1438.48	a ₁₄	312.7792	1662.44	a ₅₉	-96535.9688
1441.36	a ₁₅	19983.3848	1665.31	a ₆₀	-105615.8516
1444.23	a ₁₆	32484.5371	1668.18	a ₆₁	-101897.6172
1447.10	a ₁₇	42637.1172	1671.05	a ₆₂	-90063.0000
1449.97	a ₁₈	41782.2734	1673.92	a ₆₃	-74066.7344
1452.84	a ₁₉	38139.1523	1676.80	a ₆₄	-47105.3906
1455.71	a ₂₀	37202.4805	1679.67	a ₆₅	-18127.3809
1458.58	a ₂₁	35079.8945	1682.54	a ₆₆	13601.2949
1461.45	a ₂₂	30268.3203	1685.41	a ₆₇	40297.8203

<<Continuación>>

1464.33	a ₂₃	28903.9727	1688.28	a ₆₈	47084.8125
1467.20	a ₂₄	28995.4863	1691.15	a ₆₉	46592.0664
1470.07	a ₂₅	29154.3027	1694.02	a ₇₀	37372.5664
1472.94	a ₂₆	32449.9688	1696.89	a ₇₁	16759.9023
1475.81	a ₂₇	34536.1914	1699.77	a ₇₂	-7313.3525
1478.68	a ₂₈	37372.9727	1702.64	a ₇₃	-30002.9414
1481.55	a ₂₉	42175.2461	1705.51	a ₇₄	-46637.7695
1484.42	a ₃₀	49510.1328	1708.38	a ₇₅	-55470.5469
1487.29	a ₃₁	50355.3320	1711.25	a ₇₆	-62311.4180
1490.17	a ₃₂	57480.2695	1714.12	a ₇₇	-64088.8633
1493.04	a ₃₃	56583.3477	1716.99	a ₇₈	-61743.4922
1495.91	a ₃₄	53254.9531	1719.86	a ₇₉	-63216.0391
1498.78	a ₃₅	46228.1797	1722.74	a ₈₀	-58660.9219
1501.65	a ₃₆	41382.4570	1725.61	a ₈₁	-56560.3281
1599.27	a ₃₇	-22759.1563	1728.48	a ₈₂	-49404.5039
1602.14	a ₃₈	-22605.1816	1731.35	a ₈₃	-43453.5273
1605.02	a ₃₉	-23523.9980	1734.22	a ₈₄	-40036.0625
1607.89	a ₄₀	-25854.0547	1737.09	a ₈₅	-34085.5078
1610.76	a ₄₁	-21167.1270	1739.96	a ₈₆	-29792.1250
1613.63	a ₄₂	-18361.1094	1742.83	a ₈₇	-19934.5918
1616.50	a ₄₃	-16846.1152	1745.71	a ₈₈	-12305.8848
1619.37	a ₄₄	-12608.9805	1748.58	a ₈₉	-3053.8103
1622.24	a ₄₅	-8094.7471	1751.45	a ₉₀	7782.8286

ANEXO 15

NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES PARA EL MODELO PLSR DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN TARWI AMARGO

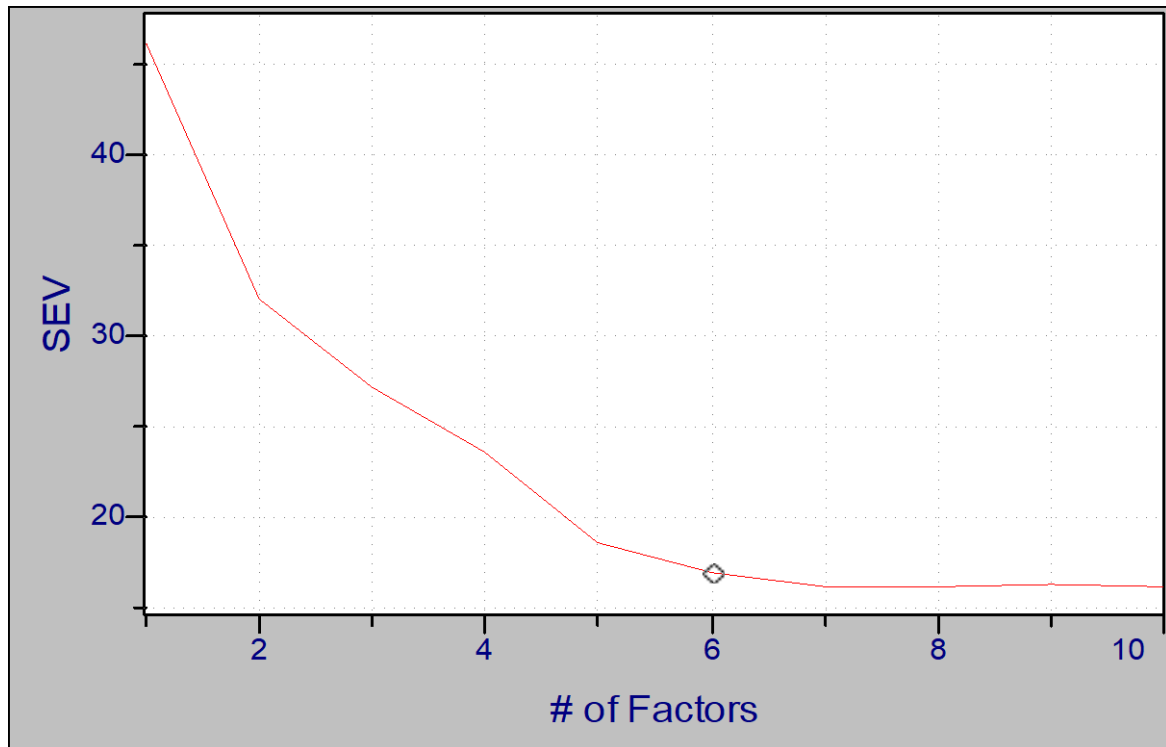


ANEXO 16
ECOTIPOS AMARGOS PARA LA CALIBRACIÓN
DE FENÓLICOS TOTALES

CÓDIGO	NOMBRE	CÓDIGO	NOMBRE
T 1	Altagracia	T 28	CD Junín 4
T 3	Cholo fuerte	T 30	CD Junín 6
T 4	Andenes INIA	T 31	CD Junín 9
T 5	Huánuco 2	T 32	SGC 22
T 6	Patón grande	T 36	Yunguyo negro
T 7	Lircay – Huancavelica	T 37	Cheje Copani negro
T 8	Huancavelica (Sihuas)	T 39	CD Junín 7- 1
T 9	Puno 2	T 40	CD Junín 7 -2
T 10	Puno 1	T 41	Abancay
T 11	Cajamarca	T 42	Vicos
T 13	Cheje Copani blanco	T 43	Tauribamba blanco
T 14	H6 INIA	T 44	CD Junín 10-2
T 17	Yanamuclo PLGO	T 46	H6 INIA blanco
T 18	Huánuco 1	T 47	Yana tarwi
T 20	Pallasca	T 48	Yanamuclo 008-3
T 21	Churibamba Huánuco 4384	T 49	Tauribamba (Sihuas)-2
T 24	H6 INIA plomo	T 50	Tauribamba (Sihuas)-3
T 25	CD Junín 1	T52	Huánuco 1 B/N
T 27	CD Junín 3		

ANEXO 17

NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES PARA EL MODELO PLSR
DE COMPUESTOS FENOLICOS EN TARWI DESAMARGADO



ANEXO 18
ECOTIPOS DESAMARGADOS PARA LA CALIBRACIÓN
DE FENÓLICOS TOTALES

CÓDIGO	NOMBRE	CÓDIGO	NOMBRE
T 1	Altagracia	T 27	CD Junín 3
T 3	Cholo fuerte	T 28	CD Junín 4
T 4	Andenes INIA	T 29	CD Junín 5
T 5	Huánuco 2	T 32	SGC 22
T 6	Patón grande	T 33	CD Junín 10 - 1
T 7	Lircay – Huancavelica	T 34	Yunguyo beige
T 9	Puno 2	T 35	Andenes UNALM
T 10	Puno 1	T 36	Yunguyo negro
T 11	Cajamarca	T 37	Cheje copani negro
T 12	Moteado beige	T 38	Tauribamba (Sihuas) -1
T 13	Cheje Copani blanco	T 39	CD Junín 7- 1
T 14	H6 INIA	T 40	CD Junín 7 -2
T 16	Yunguyo	T 42	Vicos
T 17	Yanamuclo PLGO	T 43	Tauribamba blanco
T 18	Huánuco 1	T 44	CD Junín 10-2
T 19	Andenes – 80	T 48	Yanamuclo 008-3
T 20	Pallasca	T 49	Tauribamba (Sihuas)-2
T 21	Churibamba Huánuco 4384	T 50	Tauribamba (Sihuas)-3
T 25	CD Junín 1	T 51	PLGO 3
T 26	CD Junín 2	T 52	Huánuco 1 B/N