

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



“ALCALOIDES TOTALES EN 49 ECOTIPOS DE TARWI (*Lupinus Mutabilis*) (AMARGOS Y DESAMARGADOS) EXPLORADOS POR MÉTODOS CUANTITATIVOS (GC-FID) Y CUALITATIVOS (FT-IR)”

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

ALMENDRA CECILIA BRYSON CABRERA

LIMA – PERÚ

2023



Document Information

Analyzed document 338.2 Almendra Bryson - Tesis 2022.pdf (D142272662)

Submitted 2022-07-21 16:43:00

Submitted by Patricia Glorio-Paulet

Submitter email pgp@lamolina.edu.pe

Similarity 1%

Analysis address pgp.unalm@analysis.arkund.com

Firma asesora de tesis
Ph.D. Patricia Glorio Paulet

Sources included in the report

W

URL: <https://opensource.apple.com/source/clang/clang-425.0.24/src/test/MC/ARM/neon-vld-encoding.s.auto.html>

Fetches: 2022-07-21 16:43:57

1

W

URL: <https://www.tdx.cat/handle/10803/3229#page=1>

Fetches: 2022-07-21 16:44:00

1

W

URL: <https://www.tdx.cat/handle/10803/3118#page=1>

Fetches: 2022-07-21 16:44:00

1

W

URL: http://congresos.cio.mx/memorias_congreso_mujer/archivos/extensos/sesion3/S3-BCA20.pdf

Fetches: 2022-07-21 16:46:00

1

W

URL: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?type=supplementary&id=10.1371/journal.pone.0237539.s002>

Fetches: 2022-06-23 21:21:30

3

Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS “ALCALOIDES TOTALES EN 49 ECOTIPOS DE TARWI (LUPINUS MUTABILIS)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“ALCALOIDES TOTALES EN 49 ECOTIPOS DE TARWI (*Lupinus Mutabilis*)
(AMARGOS Y DESAMARGADOS) EXPLORADOS POR MÉTODOS
CUANTITATIVOS (GC-FID) Y CUALITATIVOS (FT-IR)”**

Presentado por:

ALMENDRA CECILIA BRYSON CABRERA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

M. Sc. Walter F. Salas Valerio
PRESIDENTE

Dra. Indira Betalleluz Pallardel
MIEMBRO

PhD. Ritva Repo de Carrasco
MIEMBRO

Dra. Patricia Glorio Paulet
ASESORA

Dr. Luis Rodríguez Saona
CO-ASESOR

Lima – Perú

2023

DEDICATORIA

A mi padre José Bryson, a mi madre Rosanna Cabrera y a mi hermana Lucía Bryson por su amor y apoyo inagotable en todo el camino recorrido hasta hoy para lograr mis estudios y sustentación y por darme el impulso para continuar con mis objetivos.

A mi pequeña sobrina Aliciel porque siempre la tengo presente y por motivarme a ser cada vez una mejor persona.

A mi familia por sus enseñanzas y por su permanente orientación en mi formación en valores.

A mi compañero de vida José Obregón por su continuo apoyo y por los gratos momentos compartidos.

A Dios por darnos la fuerza para continuar y por el regalo de cada día de vida.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Patricia Glorio Paulet (asesora) por su aporte en conocimiento en las diversas áreas abarcadas en la tesis, por su ayuda en las coordinaciones con los laboratorios para la ejecución oportuna de las operaciones del experimental, por su constante disposición en la revisión de los avances y por su acompañamiento que permitieron el logro de la tesis.

Al Dr. Luis Rodríguez Saona (co-asesor), investigador y profesor de Ohio, por su aporte en experiencia y conocimientos en el área de espectroscopia que permitieron el cuidado en la ejecución de los resultados.

Al Dr. Jorge Chávez Pérez (colaborador) por su apoyo en el uso de las instalaciones del instituto IBBM de la UNALM que permitieron llevar a cabo las operaciones de entrenamiento previas a la tesis y que permitieron el almacenamiento de soluciones y de materiales usados en la ejecución de la tesis y por su apoyo en las lecturas de los equipos GC-FID y espectrómetro FT-MIR de mesa y al Ing. Eder Apumayta Suárez en Biología de la UNALM por su apoyo e instrucciones en el uso del cromatógrafo de gases.

A mi compañera de estudios la Ing. Zuly Sabelino Francia en Industrias Alimentarias de la UNALM por su apoyo en actividades que facilitaron el desarrollo de la presente investigación y por su aporte al compartir data indispensable para el reporte de los resultados de la presente tesis.

A mi compañera Bach. Lourdes Chara Naveros en Industrias Alimentarias de la UNALM por su apoyo en la ejecución de las operaciones de extracción de alcaloides y al Mg. Daniel Sumire Qquenta estudiante del programa Doctoral en Ciencias de Alimentos de la UNALM por su apoyo en conocimiento y ejecución para la construcción de las curvas de calibración de los alcaloides.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Proyecto 022-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE, proyecto del programa de leguminosas de la UNALM liderado por el Dr. Félix Camarena Mayta por brindar materiales y reactivos requeridos para la ejecución del experimental de la tesis, por la disponibilidad de ambientes de trabajo y por la entrega de los 49 ecotipos de tarwi.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	TARWI.....	3
2.1.1.	Denominación y taxonomía.....	3
2.1.2.	Origen y difusión.....	4
2.1.3.	Composición química.....	6
2.1.4.	Usos.....	11
2.1.5.	Producción nacional.....	12
2.2.	ALCALOIDES DEL TARWI.....	14
2.2.1.	Definición.....	14
2.2.2.	Biosíntesis	15
2.2.3.	Propiedades	15
2.2.4.	Efectos en consumo humano	16
2.2.5.	Principales tipos	17
2.2.6.	Desamargado del tarwi.....	20
2.3.	CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (GC-FID)	21
2.3.1.	Definición de cromatografía de gases (GC)	21
2.3.2.	Elementos instrumentales del GC.....	22
2.3.3.	Descripción de GC-FID	24
2.4.	ESPECTROSCOPIA	24
2.4.1.	Definición.....	24
2.4.2.	Espectro electromagnético	25

2.4.3.	Espectroscopia de absorción.....	26
2.4.4.	Espectroscopia infrarroja	27
2.4.5.	Espectroscopia del infrarrojo medio transformada de Fourier (FT-MIR)	28
2.5.	QUIMIOMETRIA	30
2.5.1.	Definición.....	30
2.5.2.	Pasos para el análisis multivariante	32
2.5.3.	Análisis de componentes principales (PCA)	35
2.5.4.	Modelo independiente suave de analogía de clase (SIMCA).....	38
2.5.5.	Mínimos cuadrados parciales (PLS).....	43
III.	METODOLOGÍA.....	47
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	47
3.2.	MATERIA PRIMA.....	47
3.3.	MATERIALES	47
3.4.	EQUIPOS.....	48
3.5.	REACTIVOS	49
3.6.	SOFTWARES	49
3.7.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	49
3.7.1.	Preparación de la muestra de tarwi amargo.....	49
3.7.2.	Preparación de la muestra de tarwi desamargado.....	50
3.7.3.	Análisis del contenido de alcaloides del tarwi por GC-FID.....	53
3.7.4.	Análisis quimiométricos de los espectros FT-MIR del tarwi amargo y desamargado.....	58
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1.	ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES DEL TARWI POR GC-FID	63
4.1.1.	Análisis del contenido de alcaloides totales en tarwi amargo.....	64
4.1.2.	Análisis del contenido de alcaloides residuales en tarwi desamargado	76

4.2.	ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICOS DE LOS ESPECTROS FT-MIR DEL TARWI AMARGO Y DESAMARGADO.....	84
4.2.1.	Análisis de las bandas de absorción de los estándares de alcaloides	84
4.2.2.	Análisis de las zonas del infrarrojo de los espectros del tarwi.....	88
4.2.3.	Respuestas de clasificación del tarwi mediante análisis multivariado (SIMCA) de los espectros FT-MIR usando espectrómetro portátil y de mesa.....	90
4.2.4.	Respuesta de predicción de la clasificación SIMCA obtenido con los espectros FT-MIR de los espectrómetros portátil y de mesa	100
4.2.5.	Respuesta de calibración del contenido de alcaloides mediante análisis multivariado (PLS) de los espectros FT-MIR usando espectrómetro portátil y de mesa	105
4.2.6.	Comparación entre las zonas espectrales de mayor relevancia para el análisis SIMCA y PLS.....	111
V.	CONCLUSIONES	115
VI.	RECOMENDACIONES	117
VII.	BIBLIOGRAFÍA	118
VIII.	ANEXOS.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Clasificación taxonómica del tarwi (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>)	4
Tabla 2:	Características de calidad, en tanto por ciento en materia seca, de las cuatro especies, <i>L. albus</i> , <i>L. mutabilis</i> , <i>L. angustifolius</i> y <i>L. luteus</i>	6
Tabla 3:	Análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado.....	7
Tabla 4:	Composición de aminoácidos de la fracción proteica de semillas de tarwi	8
Tabla 5:	Composición de ácidos grasos del tarwi (% de ácidos grasos totales).....	9
Tabla 6:	Contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) de semilla de lupino (<i>L. mutabilis</i>) de los Andes de Colombia.....	18
Tabla 7:	División del espectro IR.....	27
Tabla 8:	Diseño experimental.....	62
Tabla 9:	Cuantificación del contenido lupanina, esparteína y alcaloides totales (%) en granos amargos de tarwi (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>)	67
Tabla 10:	Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) de acuerdo a agrupación de ecotipos por nivel de alcaloides: alto, intermedio y bajo.....	72
Tabla 11:	Cuantificación del contenido de lupanina, esparteína y alcaloides residuales (%) en granos desamargados de tarwi (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>)	78
Tabla 12:	Porcentaje de pérdida de lupanina, esparteína y alcaloides totales de los 49 ecotipos de tarwi sometidos a proceso de desamargado acuoso.....	83
Tabla 13:	Residuos entre clases de la clasificación SIMCA	94
Tabla 14:	Clase predicha de la clasificación SIMCA.....	98
Tabla 15:	Clasificación incorrecta de la clasificación SIMCA	99
Tabla 16:	Análisis de componentes principales de la clase amargo y desamargado en la clasificación SIMCA	100
Tabla 17:	Clase predicha de la predicción de la clasificación SIMCA y porcentaje de acierto y error.....	103
Tabla 18:	Clasificación incorrecta de la predicción de la clasificación SIMCA y porcentajes de sensibilidad y de selectividad.....	104

Tabla 19: Respuesta de calibración del contenido de alcaloides (%) en b.s. por análisis quimiométrico de los espectros FT-MIR por método PLS.....	107
Tabla 20: Relación de las zonas de los espectros FT-MIR con mayor poder discriminatorio en SIMCA y de mayor relación de regresión en PLS con las zonas de las bandas de absorción de los estándares de lupanina y esparteína	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de participación en la producción de tarwi en 2017.....	13
Figura 2: Estructura molecular de la lupanina.....	19
Figura 3: Estructura molecular de la esparteína.....	19
Figura 4: Frecuencias de vibración en el infrarrojo medio.....	29
Figura 5: Diagrama de bloques de un interferómetro y componentes electrónicos asociados que se usan típicamente en un instrumento FT-MIR.....	30
Figura 6: Reducción de la dimensionalidad con dos componentes principales.....	38
Figura 7: Diagrama de flujo de preparación de muestra de tarwi amargo.....	50
Figura 8: Diagrama de flujo de preparación de la muestra de tarwi desamargado por método acuoso, adaptado de Jacobsen y Mujica (2006).....	51
Figura 9: Cuantificación del contenido de los alcaloides lupanina, esparteína y alcaloides totales (%) de los granos amargos de tarwi (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>)	69
Figura 10: Clasificación de ecotipos por nivel de contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) significativamente diferentes	74
Figura 11: Diagrama de cajas para grupos de ecotipos por región de origen.....	75
Figura 12: Cuantificación del contenido de los alcaloides lupanina, esparteína y alcaloides residuales (%) en granos desamargados de tarwi (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) ..	80
Figura 13: Espectros FT-MIR de la lupanina y la esparteína medidos en espectrómetro de mesa	87
Figura 14: Espectros promedios de la harina de tarwi amargo y desamargado.....	89
Figura 15: Proyecciones de clases de la clasificación SIMCA.....	91
Figura 16: Separación entre clases y distancia entre clases (ICD) de la clasificación SIMCA	93
Figura 17: Poder discriminatorio de la clasificación SIMCA.....	96
Figura 18: Poder de modelado total de la clasificación SIMCA	97
Figura 19: Proyecciones de clases de la predicción de la clasificación SIMCA	101
Figura 20: Separación entre clases de la predicción de la clasificación SIMCA	102

Figura 21: Regresión de la calibración por el método PLS	109
Figura 22: Vector de regresión de la calibración por el método PLS.....	111

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	ECOTIPOS DE TARWI PROPORCIONADOS POR EL PROGRAMA DE LEGUMINOSAS DE LA UNALM.....	135
ANEXO 2:	SISTEMA INSTRUMENTAL DEL GC-FID.....	137
ANEXO 3:	EQUIPO DE FT-MIR PORTÁTIL	137
ANEXO 4:	SISTEMA INSTRUMENTAL DE FT-MIR DE MESA.....	138
ANEXO 5:	INSTRUCTIVO DEL MANEJO DEL ESPECTRÓMETRO PORTÁTIL Y EL DE MESA PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS FT-MIR DE LOS ESTÁNDARES Y DE LAS MUESTRAS DE TARWI AMARGO Y DESAMARGADO	138
ANEXO 6:	INSTRUCTIVO DEL MANEJO DEL PROGRAMA PIROUETTE PARA EL ANÁLISIS DE CLASIFICACIÓN POR SIMCA	139
ANEXO 7:	INSTRUCTIVO DEL MANEJO DEL PROGRAMA PIROUETTE PARA EL ANÁLISIS DE LA PREDICCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN POR SIMCA.....	140
ANEXO 8:	INSTRUCTIVO DEL MANEJO DEL PROGRAMA PIROUETTE PARA EL ANÁLISIS DE LA CALIBRACIÓN POR PLS.....	140
ANEXO 9:	GRANOS DE TARWI AMARGO SELECCIONADOS Y PESADOS PARA INICIAR EL DESAMARGADO POR MÉTODO ACUOSO	141
ANEXO 10:	ETAPA DE REMOJO DE GRANOS DE TARWI AMARGO CON AGUA POTABLE.....	142
ANEXO 11:	ETAPA DE COCCIÓN DE GRANOS DE TARWI CON AGUA POTABLE EN OLLA CASERA.....	142
ANEXO 12:	ETAPA DE LAVADO POR CINCO DÍAS DE LOS GRANOS DE TARWI, AGUA AMARILLENTO OBSERVADO EN LOS PRIMEROS CAMBIOS DE AGUA.....	143
ANEXO 13:	ETAPA DE LAVADO POR CINCO DÍAS DURANTE EL DESAMARGADO ACUOSO DE LOS GRANOS DE TARWI, AGUA TRANSPARENTE OBSERVADO EN LOS ÚLTIMOS CAMBIOS DE AGUA.....	143

ANEXO 14: MUESTRAS DE HARINA DE TARWI AMARGO Y DESAMARGADO.....	144
ANEXO 15: PESADO DE MUESTRA DE TARWI PARA PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES	144
ANEXO 16: MUESTRAS PESADAS DE TARWI AMARGO	145
ANEXO 17: MUESTRAS PESADAS DE TARWI DESAMARGADO TRATADAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO, SONICACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN	145
ANEXO 18: MOVIMIENTOS SUAVES GIRATORIOS PARA EL LAVADO CON DICLOROMETANO DE SOLUCIONES NEUTRALIZADAS	146
ANEXO 19: DECANTACIÓN TRAS LA MEZCLA CON DICLOROMETANO CON FORMACIÓN DE DOS FASES: FASE SUPERIOR AMARILLA CORRESPONDIENTE AL ÁCIDO TRICLOROACÉTICO, FASE INFERIOR TRANSPARENTE CORRESPONDIENTE AL DICLOROMETANO.....	146
ANEXO 20: SECADO DE SOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES EN DICLOROMETANO (FASE TRANSPARENTE DECANTADA) POR SISTEMA DE EVAPORACIÓN	147
ANEXO 21: FILTRADO DE SOLUCIÓN DE ALCALOIDES EN METANOL HACIA VIAL PARA CROMATOGRFÍA	147
ANEXO 22: CROMATOGRAMA OBSERVADO DESDE COMPUTADORA DEL GC-FID	148
ANEXO 23: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK Y DILUCIONES A PARTIR DEL ESTÁNDAR PERCLORATO DE LUPANINA	148
ANEXO 24: DATOS PARA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR LUPANINA PARA BAJAS CONCENTRACIONES EN CROMATÓGRAFO GC-FID.....	149
ANEXO 25: CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR LUPANINA PARA BAJAS CONCENTRACIONES EN CROMATÓGRAFO GC-FID	149

ANEXO 26:	DATOS PARA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR LUPANINA PARA ALTAS CONCENTRACIONES EN CROMATÓGRAFO GC-FID.....	150
ANEXO 27:	CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR LUPANINA PARA ALTAS CONCENTRACIONES EN CROMATÓGRAFO GC-FID.....	150
ANEXO 28:	PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK Y DILUCIONES A PARTIR DEL ESTÁNDAR ESPARTEÍNA	151
ANEXO 29:	DATOS PARA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA ESTÁNDAR ESPARTEÍNA EN CROMATÓGRAFO GC-FID.	151
ANEXO 30:	CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA ESTÁNDAR ESPARTEÍNA EN CROMATÓGRAFO GC-FID.....	152
ANEXO 31:	VALORES DE LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD), LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOC) Y TIEMPO DE RETENCIÓN (TR) DE LA LUPANINA Y ESPARTEÍNA EN GC-FID.....	152
ANEXO 32:	EVALUACIÓN DE PRECISIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE LUPANINA Y ESPARTEÍNA (%) EN B.S. DE LOS GRANOS AMARGOS DE TARWI (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>)...	153
ANEXO 33:	RESULTADO DE LA PRUEBA DE NORMALIDAD DE LA VARIABLE “ALCALOIDES TOTALES” USANDO LA PRUEBA ESTADÍSTICA SHAPIRO WILK.....	156
ANEXO 34:	HISTOGRAMA DE LOS VALORES DE LA VARIABLE “ALCALOIDES TOTALES”	156
ANEXO 35:	ECOTIPOS DE TARWI (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) CON ALTO CONTENIDO DE ALCALOIDES.....	157
ANEXO 36:	ECOTIPOS DE TARWI (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) CON INTERMEDIO CONTENIDO DE ALCALOIDES.....	157
ANEXO 37:	ECOTIPOS DE TARWI (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) CON BAJO CONTENIDO DE ALCALOIDES.....	158
ANEXO 38:	AGRUPACIONES DE ECOTIPOS POR VALOR CERCANO DE ALCALOIDES TOTALES.....	159

ANEXO 39: RESULTADO DE LA PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS PARA LOS GRUPOS DEL ANEXO 38 USANDO LA PRUEBA ESTADÍSTICA BARTLETT	161
ANEXO 40: RESULTADO DE LA PRUEBA DE ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LOS GRUPOS DEL ANEXO 38	162
ANEXO 41: ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LOS GRUPOS DEL ANEXO 38	162
ANEXO 42: RESULTADO DE LA PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE ENTRE LOS GRUPOS DEL ANEXO 38 POR LA PRUEBA DE TUKEY.....	163
ANEXO 43: COMPARACIÓN MÚLTIPLE ENTRE LOS GRUPOS DEL ANEXO 38 POR LA PRUEBA DE TUKEY.....	164
ANEXO 44: AGRUPACIONES DE ECOTIPOS POR EL CRITERIO DE REGIÓN DE ORIGEN	166
ANEXO 45: RESULTADO DE LA PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS PARA LOS GRUPOS DEL ANEXO 44 USANDO LA PRUEBA ESTADÍSTICA BARTLETT	169
ANEXO 46: RESULTADO DE LA PRUEBA DE ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LOS GRUPOS DEL ANEXO 44	170
ANEXO 47: ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LOS GRUPOS DEL ANEXO 44.	170
ANEXO 48: EVALUACIÓN DE PRECISIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE LUPANINA Y ESPARTEÍNA (%) EN B.S. DE LOS GRANOS DESAMARGADOS DE TARWI (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>).....	171
ANEXO 49: CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES (%) EN B.S. DE GRANOS AMARGOS, ALCALOIDES RESIDUALES (%) EN B.S. DE GANOS DESAMARGADOS Y PÉRDIDA DE ALCALOIDES TRAS DESAMARGADO ACUOSO (%).....	174
ANEXO 50: ESPECTROS MIR DE: (A) LUPANINA Y (B) ESPARTEÍNA, DEL <i>LUPINUS PANICULATUS DESR.</i> DE ARGENTINA DEL ESTUDIO DE MAMMARELLA (1970).....	176

ANEXO 51:	TOTAL DE ESPECTROS FT-MIR DEL CONJUNTO DE MUESTRAS USADAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIADO SIMCA Y ZONA SELECCIONADA PARA LOS ANÁLISIS SIMCA Y PLS.....	177
ANEXO 52:	RELACIÓN DE ECOTIPOS Y REPETICIONES USADOS EN EL MODELO DE CLASIFICACIÓN SIMCA A PARTIR DE LOS ESPECTROS DEL ESPECTRÓMETRO PORTÁTIL	178
ANEXO 53:	RELACIÓN DE ECOTIPOS Y REPETICIONES USADOS EN EL MODELO DE CLASIFICACIÓN SIMCA A PARTIR DE LOS ESPECTROS DEL ESPECTRÓMETRO DE MESA.....	178
ANEXO 54:	ESPECTROS INICIALES (SIN EL PRE-TRATAMIENTO DE LA TRANSFORMACIÓN) DEL ECOTIPO D2 OBTENIDO POR ESPECTRÓMETRO PORTÁTIL Y DE MESA.....	179
ANEXO 55:	RELACIÓN DE ECOTIPOS Y REPETICIONES USADOS EN EL MODELO DE CALIBRACIÓN PLS A PARTIR DE LOS ESPECTROS DEL ESPECTRÓMETRO PORTÁTIL	180
ANEXO 56:	RELACIÓN DE ECOTIPOS Y REPETICIONES USADOS EN EL MODELO DE CALIBRACIÓN PLS A PARTIR DE LOS ESPECTROS DEL ESPECTRÓMETRO DE MESA	180
ANEXO 57:	FACTORES ÓPTIMOS DE LA CALIBRACIÓN POR EL MÉTODO PLS DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES (%) EN B.S.....	181

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llama

B.S.: Base seca

NTP: Norma técnica peruana

FT-MIR: Infrarrojo medio con transformada de Fourier

PCA: Análisis de componentes principales

PC: Componente principal

SIMCA: Modelo independiente suave de analogía de clases

ICD: Distancia entre clases

PLS: Mínimos cuadrados parciales

SEC: Error estándar de calibración

SEV: Error estándar de validación

Rcal: Coeficiente de correlación de calibración

Rval: Coeficiente de correlación de validación

RESUMEN

El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) es un alimento atractivo para el consumo doméstico e industrial por sus características de alto contenido en proteína (35.5 – 47.8 %) y en aceites (16.9 – 18.9 %), por el tamaño grande de sus semillas y por el favorecimiento en el mantenimiento de los suelos durante su cultivo. Sin embargo, su uso está limitado por el contenido de alcaloides quinolizidínicos (~ 3.3 %) que le otorgan sabor amargo y efectos tóxicos sobre la salud humana. Con el objetivo de explorar la biodiversidad en el contenido de alcaloides totales y evaluar si el método de desamargado acuoso logra un contenido de alcaloides residuales al nivel seguro de consumo (máximo 0.02 % b.s.), se exploró la extracción química y cromatografía de gases como técnica tradicional para la cuantificación de alcaloides, y con el objetivo de introducir una técnica de mayor practicidad se exploró la espectroscopia de infrarrojo medio transformada de Fourier (FT-MIR) (usando equipo portátil y de mesa) junto con métodos quimiométricos, para el análisis de discriminación entre tarwi amargo y desamargado (clasificación SIMCA) y para el análisis de predicción del contenido de alcaloides en tarwi (calibración PLS). Se obtuvo en 49 ecotipos cultivados en Perú valores de referencia de alcaloides totales y residuales de 3.6 y 0.031 % (b.s.) respectivamente con la técnica tradicional. Respecto al análisis quimiométrico se obtuvo una clasificación excelente con distancia entre clases de 10.7 (portátil) y 32.9 (mesa), y una calibración promedio con error estándar del 0.8508 % (portátil) y 0.7911 % (mesa) y con coeficiente de correlación 0.8749 (portátil) y 0.8997 (mesa). Debido a la eficiencia lograda se puede seguir explorando la espectroscopia FT-MIR en relación con alcaloides, cuya principal ventaja es su rapidez de medición (2 a 5 segundos) y que se realiza a partir de la harina del tarwi.

Palabras claves: Lupanina, esparteína, GC-FID, FT-MIR, SIMCA, PLS.

ABSTRACT

Tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) is an attractive food for domestic and industrial consumption for its characteristics of high content of protein (35.5 – 47.8 %) and oil (16.9 – 18.9 %), due to the large size of its seeds and for favoring maintenance of soils during its cultivation. However, its use is limited by the content of quinolizidine alkaloids (~ 3.3 %) that give it a bitter taste and toxic effects on human health. In order to explore the biodiversity in the content of total alkaloids and evaluate if the aqueous debittering method achieves a content of residual alkaloids at the safe level of consumption (maximum 0.02 % d.m.), chemical extraction and gas chromatography was explored as a traditional alkaloid quantification technique, and with the aim of introducing a more practical technique, Fourier transformed mid-infrared spectroscopy (FT-MIR) was explored (using portable and tabletop equipment) with chemometric methods, for discrimination analysis between bitter and debittered tarwi (SIMCA classification) and for prediction analysis of alkaloid content in tarwi (PLS calibration. Reference values of total and residual alkaloids of 3.6 and 0.031% (d.m.) respectively were obtained in 49 ecotypes cultivated in Peru with the traditional technique. With reference to the chemometric analysis, an excellent classification was obtained with a distance between classes of 10.7 (portable) and 32.9 (table), and an average calibration with a standard error of 0.8508% (portable) and 0.7911% (table) and with a correlation coefficient of 0.8749 (portable) and 0.8997 (table). As a result of the efficiency achieved, FT-MIR spectroscopy can continue to be explored in relation to alkaloids, whose main advantage is its speed of measurement (2 to 5 seconds) and that is made from tarwi flour.

Keywords: Lupanine, sparteine, GC-FID, FT-MIR, SIMCA, PLS.

I. INTRODUCCIÓN

El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) es un grano andino cuyo consumo data desde los años del 200 al 500 a.c. por lo que se desarrolló en las culturas pre incas (Alva *et al.*, 2013); durante la conquista sufrió la sustitución parcial por semillas de la costumbre alimentaria de los europeos convirtiéndola en un cultivo subexplotado (Gross, 1975, citado por Hatzold *et al.*, 1983a). La atención hacia ellos volvió hacia los años 50 y con ello comenzaron los esfuerzos en su revaloración mediante estudios y conferencias (Tapia, s.f.), sin embargo, el proceso de introducción ha sido lento. Adquiere gran importancia por su alto contenido en proteína (41% a 51%) y aceite (24% a 14%) (Weitz, 2009) y por el uso de sus subproductos: torta de tarwi en la alimentación animal, agua de lavado como pesticida agrícola y animal.

El bajo consumo de sus granos se debe a su sabor amargo y efectos tóxicos para la salud atribuidos a la presencia de alcaloides quinolizidínicos los cuales son disminuidos mediante un proceso tradicional de desamargado acuoso (Groos *et al.*, 1988), su contenido se encuentran entre 0.02 a 4.45% (Lescano, 1998, citado por Cutipa, 2014) por lo que se plantean niveles seguros de consumo: máximo 0.02% (b.s.) (Culvenor y Petterson, 1986, citado por Gross *et al.*, 1988), máximo 0.07 % (b.s.) (NTP (2018) 205.090). El método mayormente usado para identificar granos desamargados es la detección de la disminución del sabor amargo mediante evaluación sensorial cuya limitante en la objetividad es la fatiga pese a que se puede contar con catadores altamente calificados, por ello los métodos instrumentales son necesarios bajo el cumplimiento de la seguridad alimentaria para la determinación exacta del nivel de desamargado.

Las técnicas de cuantificación de alcaloides de tarwi reportados en la literatura constan de una extracción química con posterior lectura con cromatografía, como las investigaciones de Muzquiz *et al.* (1993) y Wink *et al.*, 1983, citado por Gross (1988). Usando esta metodología se tiene el primer estudio aplicado en tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) cultivado en Perú que comprende la identificación de alcaloides en diez ecotipos realizado por Cortés *et al.* (2020), por lo que aún se tiene una gran variedad de ecotipos para explorar su contenido

en alcaloides. La aplicación de cromatografía en la agroindustria se dificulta por requerir equipos sofisticados, insumos químicos de alto costo, personal experimentado y demora en la obtención de resultados. Por ello, surge la necesidad de explorar métodos más rápidos, más económicos y de fácil aplicación como la espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de fourier (FT-MIR), su análisis quimiométrico ha sido usado en el estudio de Sabelino (2020) para la calibración de proteína y compuestos fenólicos de tarwi cultivado en Perú. Su propuesta en el estudio de alcaloides puede aportar en la rápida y objetiva toma de decisiones a la cadena productiva del tarwi que incluye a productores, industrias de transformación, plantas emergentes de desamargado y entidades de aseguramiento de la calidad. La técnica de espectroscopia FT-MIR ha demostrado su versatilidad en diversos análisis quimiométricos del tipo cualitativo y cuantitativo siendo recomendado además por su confianza y precisión. Así, se tiene el modelo independiente suave de analogía de clases (SIMCA) como análisis cualitativo con resultados exitosos en la clasificación de pistacho y de aceite de oliva por presencia de adulterantes, tomate por su perfil de carotenoides, yogures por su contenido de grasa (Aykas y Menevseoglu, 2021; Rubio *et al.*, 2010; Efenberger *et al.*, 2017) el cual puede ser usado en la clasificación entre granos amargos y desamargados, y se tiene la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) como análisis cuantitativo con resultados confiables en la predicción del contenido de vitaminas, de especies adulterantes en pistacho y en aceite de oliva, (López *et al.*, 2006; Aykas y Menevseoglu, 2021; Efenberger *et al.*, 2017) el cual puede ser usado en la calibración del contenido de alcaloides en granos de tarwi.

Así, el objetivo principal del presente trabajo de investigación fue explorar el contenido de alcaloides de 49 ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) mediante el uso de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) (análisis tradicional) y explorar el uso de espectroscopia FT-MIR en modelos quimiométricos de clasificación (análisis cualitativo) y de regresión (análisis cuantitativo) relacionadas con el nivel de alcaloides. Siendo los objetivos específicos: 1. Cuantificar el contenido de alcaloides totales para evaluar la biodiversidad de los ecotipos. 2. Cuantificar el contenido de alcaloides residuales para evaluar el nivel de desamargado. 3. Evaluar la eficiencia en la respuesta de clasificación y predicción de la clase mediante análisis de espectroscopia FT-MIR, de equipos portátil y de mesa, por método SIMCA. 4. Evaluar la eficiencia en la respuesta de calibración del contenido de alcaloides mediante análisis de espectroscopia FT-MIR, de equipos portátil y de mesa, por método PLS .

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. TARWI

2.1.1. Denominación y taxonomía

El tarwi es una leguminosa por su condición de formación de vainas que se produce mundialmente en diferentes especies bajo el género *Lupinus*, siendo el tarwi de los Andes de América del Sur la especie *Mutabilis* con nombre científico *Lupinus mutabilis Sweet* (ver Tabla 1) cultivado en los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, entre ellos indican Jacobsen y Mujica (2008) y Alva *et al.* (2013) son Perú, Bolivia y Ecuador los predominantes en producción. El *Lupinus* se ha desarrollado en Europa, Australia y Sudamérica, su denominación común en Europa es “altramuz”, mientras en Sudamérica es “chocho” en Perú, Colombia y Ecuador, que en lengua quechua es: “chuchus muti” usada en Cochabamba en Bolivia, “tarwi” o “tarhui” en centro y centro sur del Perú; y en lengua aymara es: “tauri” en zona sur del Lago Titicaca perteneciente a Perú y Bolivia. Se usa el nombre “ullus” en algunos lugares del sur del Perú y Bolivia, y en inglés se la denomina “andean lupin” o “Pearl lupin” (Tapia, 2015).

El tarwi, género *Lupinus*, se encuentra distribuido mundialmente según Tapia (2015) bajo 300 a 400 especies. Sin embargo, las especies de mayor importancia son según Huyghe (1997) *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *L. mutabilis*, cuya distribución es la siguiente según Ruiz (1995): Género *Lupinus albus* en Francia, Alemania, Norteamérica, España, Chile. Género *Lupinus angustifolius* en Australia. Género *Lupinus luteus* en Alemania y Polonia. Género *Lupinus mutabilis* en Chile, Perú, Francia e Inglaterra.

Según Hughes *et al.* (1970) citado por Ruiz (1995) las especies del género *Lupinus* con mayor uso y reconocimiento a nivel comercial son en Europa todas sus especies nativas y en Sudamérica la especie *mutabilis*. Estas especies son naturalmente amargas, pero como búsqueda de aprovechamiento del tarwi se han realizado estudios de manipulación genética

donde se han identificado la presencia de genes que inhiben la formación de alcaloides para dar lugar a las variedades llamadas “dulces” debido a su menor contenido en alcaloides (Mera, 2016). En la Tabla 1 se menciona la clasificación taxonómica del *Lupinus mutabilis Sweet* desde la división hasta el nombre común, descrito por Rivadeneira (1999) citado por Caicedo y Peralta (2001).

Tabla 1: Clasificación taxonómica del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*)

División	Espermatofita
Sub-división	Angiosperma
Clase	Dicotiledóneas
Sub-clase	Arquiclámideas
Orden	Rosales
Familia	Leguminosas
Sub-familia	Papilionoideas
Tribu	Genisteas
Género	Lupinus
Especie	Mutabilis
Nombre científico	Lupinus mutabilis Sweet
Nombres comunes	Chocho, tahuri, tarwi

FUENTE: Caicedo y Peralta (2001)

2.1.2. Origen y difusión

En cuanto a su origen, según Tapia (2015) los que por primera vez domesticaron y usaron al tarwi fueron la cultura egipcia (*Lupinus luteos*) y andina (*Lupinus mutabilis*) hace por lo menos 4 mil años. Antúnez de Mayolo (1982) citado por Tapia (2015) menciona que evidenciaron que la cultura Nazca consumía el tarwi al encontrarse residuos de sus semillas en sus tumbas pre incaicas, también el consumo en la cultura Tiahuanaco se evidenció por encontrarse pinturas de estas semillas en sus vasos ceremoniales. El beneficio que hoy se sabe es que el tarwi es una importante fuente de proteína vegetal, así el tarwi pudo jugar un papel importante en la alimentación de las culturas prehispánicas como complemento en su

dieta carente de proteína animal puesto según Tapia (s.f.) esta era predominantemente vegetariana.

Con la domesticación del tarwi andino, se logró expandir su cultivo según su adaptabilidad a suelo, clima y medio ambiente, concentrándose en lugares de clima templado (Tapia, s.f.). Su cultivo fue afectado desde la conquista de los españoles con la introducción de granos que ellos preferían para su alimentación los cuales según Tapia (s.f.) fueron el trigo, la cebada, las habas y las arverjas, reemplazando al tarwi andino. Pese a ello, su cultivo se mantuvo en el tiempo, aunque disminuido y poco valorado, logrando que los pobladores acumularan un conocimiento ancestral valioso acerca de su diversidad de cultivo y aprovechamiento del grano. La marginación se acentuó por la dificultad de su consumo por su sabor amargo debido al contenido de alcaloides de sus granos, según Mujica (1992) citado por Jacobsen y Mujica (2006) otro motivo de su poca aceptación fue su rendimiento agronómico inestable.

Se sabe que la influencia y dominio de los españoles sobre las tierras andinas condujeron al cultivo de tarwi a una situación de subexplotado, la cual duró muchos años. Como primeros sucesos de recobrar reconocimiento se puede mencionar al acontecimiento que describe Tapia (s.f.), la caracterización y clasificación botánica de Herrera en 1941 sobre la quinua, cañihua, amaranto y lupinu, y el posterior estudio nutricional de la quinua y la cañihua acerca de su contenido de aminoácidos esenciales y la no presencia de gluten en sus semillas. Con ello se abrió el interés sobre estos cultivos y se crearon doce Congresos Internacionales de Cultivos Andinos (1977 – 2006) bajo un enfoque de fomento de especies nativas andinas, el interés internacional hacia el tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) se vio fortalecida por la existencia de otras especies del género *Lupinus* en otros continentes y los congresos de difusión de la ILA International Lupin Association. Los estudios y seminarios aportaron al desarrollo de la agroindustria por los años 1970 en Perú y Bolivia donde se empezaron a transformar a los granos andinos en productos como harina, fideos, galletas, entre otros (Tapia, s.f.). Sin embargo, el avance del reconocimiento del tarwi fue lento y poco atendida y una causa de ello han sido los bajos ingresos que obtienen los agricultores hacia este cultivo (Camarena, 2013, citado por Alva *et al.*, 2013). Alva *et al.* (2013) menciona como organizaciones en continua investigación de los cultivos andinos al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), a la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y

describió en el 2013 a la situación del tarwi a nivel nacional e internacional como en etapa de vida emergente e indica puede competir con otros granos por su alta resistencia ante cambios climáticos y antes las plagas.

2.1.3. Composición química

El tarwi (*Lupinus*) ha generado interés debido a su valor nutritivo destacado, el cual varía de acuerdo a su genética, y del que se puede aprovechar una vez desamargado el grano. Camarena *et al.* (2012) citado por De la Cruz (2018) menciona que el valor nutritivo de esta leguminosa es muy importante y debería ser más utilizado en la alimentación humana. De acuerdo a su variabilidad de especie Guerrero (1999) citando a la revista Agricultura de Jambrina hace una comparación de los componentes químicos de las cuatro principales especies del tarwi (ver Tabla 2), de donde se observa que la especie *Lupinus mutabilis* es la que presenta mayor porcentaje de los nutrientes: proteína, aminoácido lisina y aceite; y en cuanto al contenido de alcaloides puede presentar de 0.5 a 2, siendo el más alto entre las cuatro especies.

Tabla 2: Características de calidad, en tanto por ciento en materia seca, de las cuatro especies, *L. albus*, *L. mutabilis*, *L. angustifolius* y *L. luteus*

Componentes	<i>Lupinus albus</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>	<i>Lupinus luteus</i>
Proteínas	30-48	40-50	30-40	32-48
Lisina (g / 100 g de proteína)	4.5-5.0	5.2-6.0	4.5	4.9
Aceite	10-12	12-20	7	7
Glúcidos solubles	10-14	10	8	10
Cenizas	3.5	3.5	3.5	3.5
Alcaloides	0.005-1.5	0.5-2	0.02-1.5	0.02-1

FUENTE: Jambrina (s.f.) citado por Guerrero (1999)

En las semillas del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*), la composición bromatológica promedio según Jacobsen y Mujica (2006) es proteína en 35.5%, aceite en 16.9%, carbohidratos en 35.77%, fibra cruda en 7.65% y cenizas en 4.145% con relación directa entre proteína y alcaloides y relación indirecta entre proteína y aceite constituyendo estos dos últimos más de la mitad del peso del grano. Villacrés *et al.* (2006) reporta un análisis bromatológico comparativo entre grano amargo y desamargado que se muestra en Tabla 3, donde se observa que el contenido de alcaloides disminuye de 3.26 a 0.03%.

Tabla 3: Análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado

Componente	Chocho amargo	Chocho desamargado
Proteína (%)	47.80	54.05
Grasa (%)	18.90	21.22
Fibra (%)	11.07	10.37
Cenizas (%)	4.52	2.54
Humedad (%)	10.13	77.05
ELN (%)	17.62	11.82
Alcaloides (%)	3.26	0.03
Azúcares totales (%)	1.95	0.73
Azúcares reductores (%)	0.42	0.61
Almidón Total (%)	4.34	2.88
K (%)	1.22	0.02
Mg (%)	0.24	0.07
Ca (%)	0.12	0.48
P (%)	0.60	0.43
Fe (ppm)	78.45	74.25
Zn (ppm)	42.84	63.21
Mn (ppm)	36.72	18.47
Cu (ppm)	12.65	7.99

FUENTE: Allauca *et al.* (2005) citado por Villacrés *et al.* (2006)

El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) es comparada nutricionalmente con la soya, leguminosa con mayor reconocimiento a nivel mundial, ambas se caracterizan por su mayoritario contenido de proteína y grasa. En composición, la proteína representa el 44.3% en tarwi y 33.4% en soya, la grasa el 16.5% en tarwi y 16.4% en soya, los carbohidratos el 28.2% en tarwi y 35.5% en soya, la fibra el 7.1% en tarwi y 5.7% en soya y en cenizas el 3.3% en tarwi y 5.5 en soya (Jacobsen y Mujica, 2006). La soya, sin embargo, solo es cultivada en las regiones subtropicales, siendo el tarwi la opción comparativa a la soya para las tierras más frías.

a. Proteína

Presenta alto contenido de proteína, ver Tabla 3, como lo reportado por Sosa (2000) citado por Gutiérrez *et al.* (2016) de 43.07% (b.s.) y por Toctaquiza y Boero (2012) citado por De la Cruz (2018) de 42% (b.s.) según además indica que puede concentrarse hasta un 51% (b.s.) durante el proceso de desamargado. El contenido de aminoácidos del tarwi de los Andes (ver Tabla 4) se compone en cantidad mayoritaria de leucina, seguido de lisina y es deficiente en aminoácidos sulfurados como metionina y cisteína, pudiendo ser complementada con los aminoácidos esenciales de los cereales, que generalmente son deficientes en lisina y abundantes en metionina, Ha y Zemel (2003) citado por Chirinos (2015) indica algunos beneficios, leucina para la cicatrización del tejido muscular, piel y huesos, la lisina para la buena absorción del calcio, la fenilalanina para tratar el artritis, la valina para el metabolismo muscular.

Tabla 4: Composición de aminoácidos de la fracción proteica de semillas de tarwi

Aminoácido	Semillas de tarwi cocidas y desamargadas (g/16g N)	Semillas crudas de tarwi (g/16 g N)
Isoleucina	5.3	4.8
Leucina	7.9	7.0
Lisina	5.6	5.9
Metionina	0.5	0.4
Cisteína	1.4	1.2

«continuación»

Met+Cys	1.9	1.6
Fenilalanina	4.2	4.3
Tirosina	3.9	3.6
Phe+Tyr	8.1	7.9
Treonina	3.6	3.8
Triptófano	0.7	0.7
Valina	4.5	4.2

FUENTE: Schoeneberger *et al.* (1982)

b. Aceite

El contenido de aceite también es elevado, ver Tabla 3. La composición del aceite de tarwi se describe en la Tabla 5, donde se observa que presenta omega 6 y omega 3 (ácidos grasos esenciales) y omega 9 (ácido graso no esencial). Está compuesto mayormente de ácidos grasos insaturados con mayor contenido en ácido graso oleico y menor en ácido graso linoleico, esta característica lo hace estable en cuanto a rancidez (Williams, 1979, citado por Ruiz, 1995). El principal beneficio del ácido graso oleico es la de reducir el riesgo cardiovascular, mientras del linoleico es la de controlar la presión arterial (Chirinos, 2015). En comparación con el aceite de otros *Lupinus*, el aceite de tarwi (*L. mutabilis*) no contiene ácido erúico (Hansen y Czochanska, 1974, citado por Hatzold *et al.*, 1983a) lo que es considerado por Suca G. y Suca C. (2015) como una ventaja debido a que dicho ácido es potencialmente tóxico.

Tabla 5: Composición de ácidos grasos del tarwi (% de ácidos grasos totales)

Ácidos	Porcentaje (%)
Oleico (Omega 9)	40.4
Linoleico (Omega 6)	37.1

«continuación»

Linolénico (Omega 3)	2.9
Palmítico	13.4
Palmitoleico	0.2
Esteárico	5.7
Mirístico	0.6
Araquídico	0.2
Behénico	0.2
Erúsico	0.0
Cociente Poliisaturado/Saturado	2.0

FUENTE: Jacobsen y Mujica (2006)

c. Fibra

Se encuentra en la cáscara del grano y su contenido oscila alrededor del 10% (ver Tabla 3) del grano. La fibra alimentaria incluye a los elementos que no sufren degradación enzimática durante la digestión, son beneficiosas por su capacidad saciante para retrasar el apetito (Villacrés *et al.*, 2006)

d. Minerales

Los macronutrientes que se encuentran en mayor cantidad en el grano amargo son el potasio (1.22%) y el fósforo (0.60%), y en el grano desamargado es el calcio (0.48%) y el fósforo (0.43%) (ver Tabla 3). El calcio se encuentra mayoritariamente en la cáscara por tanto se recomienda el consumo del grano integral (Villacrés *et al.*, 2006). El fósforo tiene la función de controlar el calcio para el adecuado mantenimiento de los huesos y del sistema muscular cardiaco (Sánchez y Madrid, 2004, citado por Villacrés *et al.*, 2006). Su micronutriente mayoritario es el hierro (Chirinos, 2015).

Otra característica del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) es que presenta a comparación de la soya un menor contenido en saponinas, taninos, filatos e inhibidores de tripsina (Chirinos,

2015), importante mencionar que el contenido de este último es bajo y no se ha demostrado que altere significativamente la calidad proteica (Schoeneberger *et al.*, 1982). Con todo ello, el tarwi es una planta cuyas propiedades nutricionales pueden enriquecer la dieta y usarse como una buena alternativa de proteína vegetal.

2.1.4. Usos

Los granos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) fueron aprovechados por los pobladores andinos desde época prehispánica principalmente para la alimentación humana, siendo el principal inconveniente el sabor amargo característicos de sus granos, motivo por el cual la expansión y diversificación de su uso fue limitado. Por ello los pobladores aprendieron técnicas de desamargado, así las culturas egipcia y andina sometían a los granos de tarwi a un proceso de maceración y posterior lavado previo a su consumo (Tapia, 2015). Ya en la actualidad el uso del tarwi se ha ampliado a favor de un mayor aprovechamiento de su valor nutritivo y ha abarcado áreas más allá de la alimentación humana, como la medicinal, el cuidado animal y el control de plagas.

En la alimentación humana el uso del tarwi se da a nivel de consumo fresco y cocido de sus semillas desamargadas que pueden usarse a imaginación culinaria como en guisos, purés, salsas, cebiche serrano, sopas, postres y refrescos, y a nivel industrial procesada como harina (Weitz, 2009) la cual puede ser usada en panificación y en diversos productos procesados que pueden ser enriquecidos por su peculiaridad de mayor contenido proteico y de aceite y menor en carbohidratos a diferencia de otras oleaginosas y de las leguminosas; el grano de tarwi también es procesado para la extracción de su aceite la cual es recomendada como un buen aceite comestible y del cual se obtiene como subproducto la torta de tarwi que se caracterizaría por ser un concentrado proteico (Hatzold *et al.*, 1983a).

En el área medicinal según Jacobsen y Mujica (2006) los parientes silvestres del tarwi se usaron para tratar dolencias como la diabetes consumiendo la harina de tarwi amargo hervida, malestar renal con el consumo del agua usado en el desamargado de los granos, malestar por consumo de alcohol lo trataban consumiendo granos de tarwi desamargado en frío, entre otros.

En el ámbito de cuidado del ganado ha sido usado como parte de la alimentación debido a su aporte proteico así el grano de tarwi desamargado es incluido en las mezclas vegetales (Tapia, 2015), la torta de tarwi ha sido destinado como parte de la alimentación de las aves debido a que estos animales tienen mayor tolerancia a los alcaloides, y el agua de lavado de los granos de tarwi para el cuidado del ganado como repelente en el pelaje y como desparasitador intestinal (Alva *et al.*, 2013; Weitz, 2009).

Por último, en la agricultura se usa la harina y el caldo de cocción de tarwi por sus efectos para controlar las plagas como indica Vela y Sáenz (1993) citado por Alva *et al.* (2013).

La contraparte del uso del tarwi es que el proceso de desamargado de sus granos deja grandes cantidades de agua de cocción y lavado con alto contenido de alcaloides, el cual muchas veces es destinada a ríos o al mar como desecho siendo una fuente de sustancias tóxicas para las especies que las habitan (Tapia y Fries, 2007, citado por Alva *et al.*, 2013).

2.1.5. Producción nacional

El tarwi se encuentra dentro de los granos andinos más importantes que se cultivan en el Perú, los cuales son además la quinua, la kiwicha y la cañihua. La producción nacional de estos granos se ha desarrollado desde una situación inicial de cultivos subexplotados hacia una de mayor exposición nacional llegando a un paulatino reconocimiento internacional en la actualidad, esto debido al interés acerca de sus propiedades nutricionales. Entre los años 40 y 50 la formación de Ministerios de Agricultura en la región sumó en los esfuerzos de la revalorización de la producción nacional a lo que vinieron investigaciones, cooperaciones y convenciones internacionales para obtener mayor conocimiento y generar mayor difusión (Tapia, s.f.).

Según lo reportado por MINAGRI (diciembre, 2018) las zonas de producción del tarwi son Cusco, Puno, Áncash, Junín, La Libertad, Cajamarca, Amazonas, Huánuco, Huancavelica y Ayacucho, reporta que en el Perú la superficie sembrada de los granos andinos creció de 32 mil a más de 81 mil ha entre 2012 y 2017, de lo sembrado en ese último año se cosechó cerca de 79 mil ha representando el 0.9% de la superficie cosechada nacional según reporte de la Encuesta nacional agropecuaria (ENA), con una participación de la quinua en un 75%, del tarwi en 15%, de la kiwicha en 6% y de la cañihua en 4%.

De acuerdo a la Figura 1 los cuatro departamentos con mayor participación son La Libertad con 34%, Cusco con 22%, Apurímac con 13% y Puno con 10%.

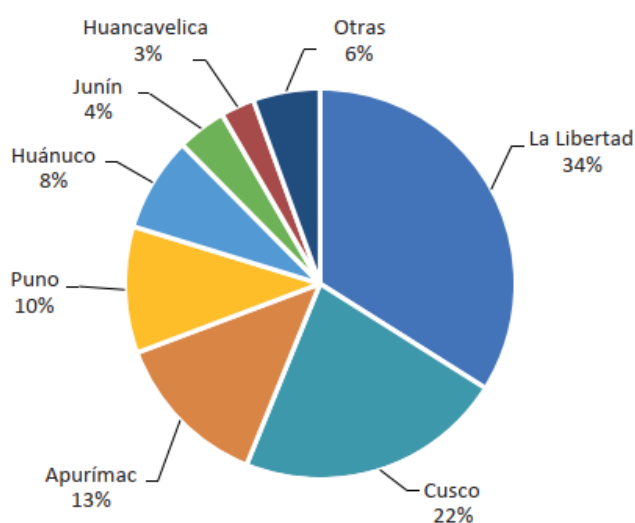


Figura 1: Porcentaje de participación en la producción de tarwi en 2017

FUENTE: MINAGRI (2017) citado por MINAGRI (diciembre, 2018)

El cultivo del tarwi se realiza entre las alturas de 2000 a 3900 metros sobre el nivel del mar (msnm) por lo que ha sido dividido en dos grupos, el primer grupo de 2000 a 3400 msnm correspondiente a regiones de La Libertad, Áncash y Junín, y el segundo grupo de 3401 a 3900 msnm que abarca a zonas del Cusco y Puno (Repo-Carrasco, 1992, citado por Alva *et al.*, 2013).

En cuanto a la producción del tarwi MINAGRI (junio, 2018) reporta para el año 2000 una producción de 8.8 miles de toneladas (mil t) y para el 2006 una producción de 8.2 mil t lo que constituyó una bajada del 1% anual entre dichos años, a lo que siguió una tendencia de subida hasta lo reportado en 2018 con un crecimiento del 5% anual llegando a un máximo de 14 mil t en el 2016.

El MINAGRI (diciembre, 2018) reportó según la ENA que los productores del tarwi como grano seco representaban en 2017 el 20% del total de productores de granos andinos nacionales con un crecimiento en 48% respecto a lo reportado en 2012. Indica también que, de la cantidad total de los productores de granos andinos, incluido el tarwi, el 99.9% correspondía a personas naturales y el restante se repartía entre empresas (SAC, EIRL) y

cooperativas; acerca de las extensiones de unidades agrícolas (UA) el 62% no pasaba de las 3 ha y el 13.7% pasaban de las 10 ha.

Se observó una notable desigualdad en la comparación de la situación en 2017 del tarwi con respecto a otros granos andinos principales: la mayor superficie sembrada fue de la quinua con 63 329 Ha, seguida del tarwi con 10 629 Ha, y las menores fueron la cañihua con 6 270 Ha y la kiwicha con 1 489 Ha. MINAGRI (diciembre, 2018) reporta que solo el 48% de la producción del tarwi ha sido destinado para su comercialización y que entre los años 2016 – 2017 los productores de tarwi obtuvieron un ingreso promedio de 412 soles con un precio de venta de 3.30 soles el kilo del grano seco, siendo uno de los cultivos que genera menos ingresos a sus productores.

Respecto a su exportación su participación tampoco ha despegado a comparación de otros granos andinos, sin embargo, su tendencia ha ido en aumento con una exportación de 1.3 mil t en el año 2015 y 1.9 mil t en el 2018, logrando su mayor exportación en el 2017 con 2.1 mil t, abarcando a Ecuador (98.7 %), España (0.81 %), E.E.U.U. (0.28 %) e Inglaterra (0.11 %) según lo indicado por MINAGRI (diciembre, 2018).

2.2. ALCALOIDES DEL TARWI

La presencia de alcaloides en los granos de tarwi no permiten el consumo directo de esta leguminosa por ser considerados compuestos tóxicos para el organismo y por el sabor amargo desagradable que le confiere al grano, siendo esto un factor que no ha permitido su expansión en los esfuerzos de difusión y revalorización.

2.2.1. Definición

Una de las primeras definiciones de “alcaloides” fue dada por W. Meissner en el siglo XIX que hacía referencia a aquellos compuestos orgánicos nitrogenados de origen natural que reaccionaban como bases (Bruneton, 1993), los avances en estudio de este metabolito permitieron definirla también como la de ser de origen generalmente vegetal, contener al nitrógeno generalmente intracíclico, ser derivados por lo general de aminoácidos, con efectos farmacológicos y que químicamente puede formar un precipitado (Bruneton, 1991, citado por Rodríguez, 2009).

El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) posee los alcaloides del tipo quinolizidínicos, Muzquiz *et al.* (1993) menciona que los alcaloides del género *Lupinus* provienen de la quinolizidina y que mayormente se encuentran como bases terciarias o N-óxidos con estructura bicíclica o tetracíclica, Bruneton (1993) indica que la estructura de la quinolizidina es nitrogenada y que consiste en dos ciclos enlazados (bicíclico) conformados con al menos dos tipos de átomos (heterociclo). Ringuelet y Viña (2013) menciona que la estructura de los alcaloides quinolizidínicos consta de una o dos quinolizidinas y la estructura de esta última es heterocíclica nitrogenada bicíclica.

2.2.2. Biosíntesis

Como indica Caicedo y Peralta (2001) citado por Rodríguez (2009) la formación de los alcaloides requiere generalmente de los aminoácidos ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y ácido antranílico. En cuanto a los alcaloides quinolizidínicos su biosíntesis, según Bruneton (1993), se da a partir de dos moléculas del mismo aminoácido, e indica que el requerimiento para otros alcaloides es de una única molécula de aminoácido, de dos aminoácidos diferentes o varias moléculas del mismo. Rodríguez (2009) señala a los alcaloides quinolizidínicos como auténticos a aquellos que se sintetizan a partir de la lisina y que pueden ser bicíclicas, tricíclicas o tetracíclicas (lupanina y esparteína).

Acerca de la localización del proceso de biosíntesis de los alcaloides quinolizidínicos en la planta del tarwi Guerrero (1999) menciona que la lisina y el triptófano se encuentran inicialmente en la plántula, luego la síntesis de alcaloides se logra en las hojas por los cloroplastos según Rodríguez (2009) y son transportados por el floema a distintos órganos de almacenamiento de las hojas, tallos y semillas.

2.2.3. Propiedades

Acerca de las propiedades de los alcaloides Ringuelet y Viña (2013) mencionan que intervienen para el buen funcionamiento del equilibrio iónico debido a su carácter básico, absorben los rayos ultravioletas debido a sus núcleos aromáticos, en medio ácido puede protonarse y transformarse a sal debido a la presencia de nitrógeno en su estructura.

Ahora bien, de acuerdo a muchos autores los alcaloides quinolizidínicos son considerados como metabolitos secundarios en la planta del tarwi cuya función no se ha encontrado con exactitud, pero coinciden en que la principal función sería la de protección de la planta contra amenazas de microorganismos y animales del medio ambiente, mas no se tiene claro su función en el ámbito metabólico de la misma planta. Lock (1994) indica que se algunos reportan que intervienen como reguladores del crecimiento o repelentes o atractores de insectos. Villacrés *et al.* (2009) señala que el propósito del alcaloide sería la defensa de la planta contra microorganismos patógenos (fitopatógenos), insectos y animales herbívoros, Keeler (1976) citado por Chirinos (2015) indica que este efecto de defensa sería por su acción mutagénica y tóxica sobre estos organismos, Mc Cawley (1985) citado por Villacrés *et al.* (2009) explica que su toxicidad se debe a su acción inhibidora de proteínas, del ARN transmisor y de fármacos que tratan y alivian el sistema nervioso central.

En el estudio de Villacrés *et al.* (2009) se determina el efecto del extracto alcaloidal de 10 mg/ml como bactericida en cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Cándida albicans* y *Pseudomona*, como cicatrizador sobre piel de roedor con infección dérmica por *S. aureus* y *E. coli*, como fungicida contra *Mycrosporium canis* y *Trichophytom rubrum*, y como nematicida a concentración de 2% de alcaloide provocando una mortalidad del 93.3% sobre *Meloidogyne*.

En cuanto a sus propiedades físico químicas se centran de acuerdo a su basicidad, de si son o no oxigenados y en general su estructura. Rodríguez (2009) explica que los alcaloides son muy pocos solubles en agua, pero solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos apolares y muy poco polares, el carácter básico suele ser muy variado y va a depender de la disponibilidad del doblete libre del nitrógeno, Ringuelet y Viña (2013) señalan que los que no contienen oxígeno en su molécula son generalmente volátiles, mientras los que sí presentan oxígeno suelen ser sólidos.

2.2.4. Efectos en consumo humano

Para los años 90 el tema de consumo inocuo de los granos de tarwi fue abordado por las autoridades por motivo de protección a los consumidores, para lo cual establecieron límites del contenido de alcaloides, respecto a esto Quispe (2015) menciona que en algunos países europeos regularon el contenido de alcaloides quinolizidínicos en harina de tarwi y sus

derivados a un límite máximo un 0.02% (b.h.) o 0.1% (b.s.). Lo mismo se siguió para los países de Sudamérica, la FAO (1982) reporta que el contenido de alcaloides en granos de tarwi seguro para el consumo humano es de 0.002 a 0.02% (b.h.). Villacrés *et al.* (2009) menciona que las dosis que provocan intoxicación son de 11 a 25 mg/kg de peso corporal en niños y de 25 a 46 mg/kg de peso corporal en adultos.

Acerca del paso del alcaloide en el cuerpo humano Muzquiz *et al.* (1993) señala que siempre y cuando no se exceda una dosis determinada el cuerpo puede eliminar rápidamente al alcaloide por medio del riñón. La cantidad de alcaloide contenida en los granos de tarwi varía por especie, en la comparación realizada por Quispe (2015) entre los *Lupinus* de Perú, Ecuador, México, Alemania y Egipto determina que la especie *Lupinus mutabilis Sweet* es la que presenta mayor concentración alrededor del 3% y la de origen peruano supera el contenido con un porcentaje mayor al 4%. Según Lescano (1998) citado por Cutipa (2014) el contenido fluctúa de 0.02 a 4.45% y menciona que para la aceptación como variedades dulces se fija su contenido máximo de 0.04% en el grano, llamando variedad dulce a los de bajo contenido de alcaloides.

Los efectos tóxicos de los alcaloides quinolizidínicos en el consumo humano al pasar las dosis recomendadas de seguridad alimentaria se da a nivel de sistema nervioso y ante un exceso de consumo puede causar daños a nivel cardíaco y respiratorio (Culvenor *et al.*, 1986, citado por Muzquiz *et al.*, 1993). Algunos síntomas visibles de su toxicidad son es el aumento anormal del diámetro de la pupila, coloración azulada de la piel que puede indicar la falta de oxígeno en la sangre, y otros perceptibles como calambres, parálisis respiratoria, dolor estomacal, vómitos, y puede llegar a producir un coma (Wink, 1992; Sani, 2001, citados por Villacrés *et al.*, 2009). Es así, que son considerados el componente antinutritivo principal del tarwi cuya toxicidad puede llegar hasta la muerte.

2.2.5. Principales tipos

Según Wink (1991) citado por Ortega *et al.* (2010) se han identificado en los *Lupinus* una cantidad aproximada de 150 alcaloides quinolizidínicos. Dicho contenido de alcaloides depende de las condiciones de cultivo, para la región andina los alcaloides mayoritarios en orden decreciente serían según Hatzold *et al.* (1983a) la lupanina, la 1,3 hidroxilupanina y la esparteína, e indica citando a Couch (1926) que la 1,3 hidroxilupanina es 10 veces menos

tóxica que la lupanina y esparteína. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el alcaloide que se encuentra en mayor concentración es la lupanina, seguido de la esparteína. Esto se cumple en la mayoría de las especies silvestre del *Lupinus* (Wink, 1993, citado por Huamán y Choccare, 2017). Ortega *et al.* (2010) en su estudio de caracterización del chocho en los andes de Colombia (ver Tabla 6) concluye que el contenido es mayor en lupanina (0.73%), seguido de la esparteína (0.26%) y luego el 1-3 hidroxilupanina (0.14%). Algunos alcaloides que se encuentran en menor cantidad son la 3-β-hidroxilupanina y la tetrahidrorombifolina (Villacrés *et al.*, 2009).

Tabla 6: Contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) de semilla de lupino (*L. mutabilis*) de los Andes de Colombia

Sustancias	AQ (g / 100g semilla)
Esparteína	0.2673
4-Hidroxilupanina	0.0281
Hidroxiesparteína	0.0078
Amodendrina	0.0046
Lupanina	0.7305
1-3 hidroxilupanina	0.1472

FUENTE: Adaptado de Ortega *et al.* (2010)

Acerca de la toxicidad de los dos principales alcaloides del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) Pothier *et al.* (1998) demuestra que la esparteína es más tóxica que la lupanina mediante su estudio de efectos sobre el sistema nervioso central en ratones con resultados que concuerdan con los trabajos que el mismo autor cita: Yoyo (1982) y Mazur *et al.* (1966).

a. Lupanina

Su fórmula estructural es $C_{15}H_{24}N_2O$ y su estructura molecular se presenta en la Figura 2. Es un compuesto cuaternario oxigenado, sus características químicas son: peso molecular de 248.36 g/mol, solubilidad en agua, cloroformo, éter y alcohol, insolubilidad en éter de

petróleo (Arias, 1985, citado por Rodríguez, 2009), sólido a temperatura ambiente, no volátil, cristalizable (Ringuelet y Viña, 2013). Presenta propiedades farmacológicas como bactericida y nematocida e inhibidor del anabolismo de proteínas (Duke, 1987, citado por Bruneton, 1993). Los efectos de su toxicidad a dosis bajas es la de reducir el flujo coronario, la duración de la contracción y el ritmo cardiaco y a dosis altas puede detener el corazón (Duke, citado por, Pothier *et al.*, 1998).

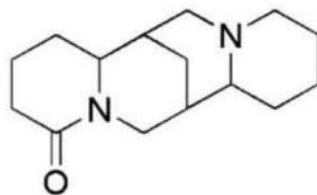


Figura 2: Estructura molecular de la lupanina

FUENTE: Bunsupa *et al.* (2013)

b. Esparteína

Su fórmula estructural es $C_{15}H_{26}N_2$ y su estructura molecular se presenta en la Figura 3. Es un compuesto ternario no oxigenado, sus características químicas son: peso molecular de 234 g/mol, insolubilidad en agua, alcohol, éter y cloroformo, de reacción básica (Guerrero, 1987, citado por Rodríguez, 2009), líquido incoloro de consistencia oleosa y espesa (Merino, 1993, citado por Rodríguez, 2009), volátil, arrastrable por vapor de agua (Ringuelet y Viña, 2013). Presenta propiedades farmacológicas como cardiovasculares, antihipertensiva, bloqueo de ganglios, acción antimuscarínicos, efectos depresores y analgésicos sobre el sistema nervioso central (Pothier *et al.*, 1998).

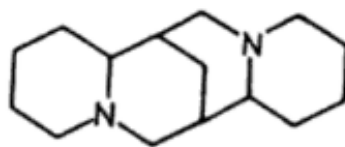


Figura 3: Estructura molecular de la esparteína

FUENTE: Lock (1994)

2.2.6. Desamargado del tarwi

El proceso para disminuir el contenido de alcaloides (quinolizidínicos) en tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) es el llamado proceso de desamargado, cuyo producto esperado son granos de tarwi que cumplan con el límite aceptado de alcaloides para que sean consumibles e inocuos en cuanto a toxicidad. Existen tres métodos de desamargado: biológico, químico y/o acuoso. La presente investigación aplicará el método acuoso, también llamado extracción por lixiviación en agua, el cual se puede aplicar a nivel casero y/o industrial.

El método de desamargado acuoso consiste básicamente de tres etapas: remojo, cocción y lavado. De este proceso se obtienen dos productos: los granos de tarwi desamargado que resultan ser de agradable sabor y suave textura, y el agua usado para el desamargado que resultan ser de sabor amargo intenso de color amarillento pálido y de olor al grano crudo (Jacobsen y Mujica, 2006).

Los granos desamargados son usados para la alimentación humana y animal y el agua de desamargado se puede aprovechar como pesticida agrícola y animal en lugar de ser eliminado en ríos lo que generaría contaminación ambiental. Previo a estas tres etapas es la de limpieza de impurezas del grano (residuos de cosecha, tierra o piedrecillas).

- El remojo es el proceso de acondicionamiento que consiste en sumergir los granos en agua y dejarlos por un tiempo determinado en reposo con el objetivo de lograr un nivel de hidratación que permita mayor difusión en la salida de alcaloides. Según el estudio de Ortega *et al.* (2010) el proceso de hidratación se inicia con baja absorción de agua sin presentar cambio significativo en el volumen del grano hasta después de 8 horas, tiempo en que el grano ya comienza a ganar agua a tasa constante e indica que esta va siendo almacenada en la estructura porosa del grano, en el interior de las células y en espacio entre paredes celulares. Se debe considerar que durante este proceso se pierden nutrientes, Gutiérrez *et al.* (2016) indica que un remojo de 18 horas o más puede ser negativo debido a la pérdida de proteínas solubles en agua incluyendo otros nutrientes.
- La cocción es el proceso de cambios bioquímicos del grano que permitan una adecuada lixiviación de alcaloides. Consiste en dejar los granos en agua hirviendo

por un tiempo determinado, según Gutiérrez *et al.* (2016) los cambios producidos son la inactivación de las enzimas lipasas y lipooxigenasas que son responsables de la germinación y deterioro del grano, disminución de la biocarga, coagulación de proteínas y mejoramiento de la permeabilidad de la pared celular, e indica que el tiempo óptimo de cocción es de 60 minutos para lograr una mayor concentración de alcaloides en el agua de cocción. Vásquez *et al.* (2019) menciona que la cocción puede eliminar hasta el 75% de los alcaloides contenidos en los granos amargos, se puede adicionar a este proceso elementos que mejoren la eficiencia como agitación o adición de cal.

- El lavado es el proceso de extracción constante de los alcaloides que consiste en remojar los granos cocidos en agua por un tiempo con interrupciones para cambios de agua. Durante el lavado no solo se disminuye el contenido de alcaloides del grano sino también de nutrientes, esta pérdida se ve incrementada al realizar más cambios de agua o al acoplar un agitador (Carvajal *et al.*, 2013, citado por Gutiérrez *et al.*, 2016).

Según Caicedo *et al.* (2001) con el tratamiento acuoso se puede lograr obtener granos de tarwi con un mínimo contenido de alcaloides en un porcentaje entre 0.02-0.07%, aunque no sea un proceso eficiente debido al alto consumo de agua y altas pérdidas de sólidos.

2.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (GC-FID)

2.3.1. Definición de cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es un método físico de separación de compuestos aplicada en diversas ciencias por la amplitud de tipos de análisis que puede realizar y cuyas respuestas facilita la identificación y determinación de analitos, los cuales deben ser inyectados en la mayoría de casos por dilución y cuyo requisito a cumplir es ser una sustancia volátil y térmicamente estable así los componentes de la mezcla volátiles se separan de acuerdo a sus propiedades como el punto de ebullición, tamaño molecular y polaridad (Skoog *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2010; Ismael y Nielsen, 2010).

Presenta una fase móvil que es un gas y una fase estacionaria que puede ser líquido o sólido, según explica Skoog *et al.* (2008) la muestra se disuelve en una fase móvil la que se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible y fija, la separación se basa en la relación inversa de la afinidad de la muestra con la fase estacionaria y la rapidez de desplazamiento en la fase móvil.

Los resultados se expresan en un cromatograma donde la formación de picos en diferentes tiempos se usa para la identificación del analito y el área debajo de la curva para determinar la cantidad de dicho analito. La preparación de la muestra es un proceso delicado a considerar puesto se requiere el nivel de aislado y concentrado del analito que permita su identificación dentro de los límites detectables del GC, que se mantenga conservado y que se asegure no provoque reacciones químicas que interfieran con la generación de picos falsos (Qian *et al.*, 2010).

La cromatografía de gases se caracteriza por ser de proceso eficiente, de alta resolución, de alta precisión, sensible a concentraciones muy bajas del analito (ppb), por requerir muy poca cantidad de muestra (uL) (McNair *et al.*, 2019). Su aplicación en ingeniería alimentaria es amplia, Qian *et al.* (2010) menciona por ejemplo en la determinación de ácidos grasos, triglicéridos, colesterol, análisis de solventes, agua, alcoholes, pesticidas, aditivos alimentarios, aromatizantes, entre otros, los cuales como se ha mencionado deben ser estables a altas temperaturas por lo que no son ideales para azúcares, aminoácidos, vitaminas.

2.3.2. Elementos instrumentales del GC

La ruta de elementos de un cromatógrafo de gases consta de un sistema de abastecimiento de gases, puerto de inyección, horno, columna, detector y sistema electrónica para registro de información (Qian *et al.*, 2010) con la siguiente breve definición:

a. Sistema de abastecimiento de gases

En cromatografía de gases la fase móvil es un gas llamado gas portador el cual debe cumplir con ciertas propiedades como el ser inerte con el analito y el punto de volatilidad bajo el gradiente de temperatura controlada, se requiere al menos un suministro de gas y

posiblemente gases para el detector, el tipo de gas es seleccionado para contener adecuadamente a los analitos durante su recorrido por la columna del GC y la fase estacionaria, debe presentar trampas en su recorrido para impedir el ingreso de impurezas al circuito y así asegurar el cuidado de los elementos y por ende evitar desviaciones en los resultados (Qian *et al.*, 2010; Ismael y Nielsen, 2010).

b. Puerto de inyección

El puerto de inyección consta de una jeringa que toma una determinada cantidad de muestra de forma manual o automatizada y la introduce al sistema cromatográfico para su vaporización, el elemento de protección es un tabique que funciona como un tapón para evitar la salida de los gases pero que por su tipo de material permite el ingreso de la aguja de la jeringa para introducir la muestra, una lenta inyección y tamaño no adecuado de muestra bajan la eficiencia de la columna y genera dispersión de bandas y baja resolución (Qian *et al.*, 2010; Skoog *et al.*, 2008).

c. Horno

El horno es el elemento que controla la temperatura de la columna, la cual contiene a la fase estacionaria y es por donde recorrerá la muestra con la fase móvil ya vaporizadas; la temperatura del horno se programa para que sea bajo durante la inyección y se eleve para el recorrido de la muestra, su valor óptimo va a depender de la naturaleza del análisis y se la debe establecer considerando que afecta a la resolución y al tiempo de elución (Qian *et al.*, 2010).

d. Columna

Se tienen dos tipos de columnas, la empaquetada y la capilar, en la actualidad se consideran a las columnas capilares superiores a las empaquetadas por su mayor eficiencia y rapidez, son colocadas en el interior del horno en forma de helicoides (Skoog *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2010). La columna empaquetada debe cumplir con una polaridad similar a la de los analitos inyectados y puede crear desventaja si su volatilidad genera sangrado de columna, ante ello y con la creación de columnas capilares se usan menos fases estacionarias Qian *et al.* (2010). La columna capilar debe ser del largo correcto puesto tiene relación directa con

la resolución considerando que también aumenta el tiempo de análisis, también del grosor correcto puesto afecta a la separación en la manera de que al ser más gruesa retienen los compuestos por más tiempo (Qian *et al.*, 2010).

e. Detector

El objetivo del detector es la de medir la concentración de los analitos de la muestra mediante la generación de una señal que es proporcional a la concentración de dicho analito de acuerdo a la sensibilidad del detector, el cual genera las áreas de los picos en el cromatograma. (Qian *et al.*, 2010). Algunas características de un detector ideal: sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproductibilidad, intervalo de temperaturas desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C, tiempo de respuesta corto, alta confiabilidad y manejo sencillo, no debe destruir la muestra (Skoog *et al.*, 2008).

2.3.3. Descripción de GC-FID

La cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) es el método más ampliamente utilizado en cromatografía de gases y también en los estudios de ingeniería de alimentos por sus ventajas de alta sensibilidad, alta confiabilidad y amplitud en respuesta (Qian *et al.*, 2010), entre sus desventajas está la de ser destructiva y la de requerir el uso de otros gases controladores (Skoog *et al.*, 2008). Los gases usados para el detector FID es el hidrógeno y el aire. Su funcionamiento se basa en que los analitos al ser compuestos orgánicos se pirolizan o combustionan fácilmente por acción de una llama de hidrógeno y aire formando iones cuya cantidad es proporcional a la del carbono reducido por la llama (Skoog *et al.*, 2008) y a la corriente que se aplica por medio del potencial en la llama (Qian *et al.*, 2010).

2.4. ESPECTROSCOPIA

2.4.1. Definición

La espectroscopia estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia para obtener información a través de los espectros que se generan abarcando el estudio de su producción, medición/registro e interpretación y ser usados en amplitud de formas como en

análisis cualitativos y cuantitativos (Skoog *et al.*, 2008; Penner, 2010). La espectroscopia se diversifica en tipos dado el objetivo: por la naturaleza de la especie se tiene del tipo atómico o molecular, por la capacidad de penetración de la radiación en la especie se tiene la de absorción, emisión o difracción y por la radiación electromagnética se tiene en general en investigaciones de alimentos la ultravioleta, la del visible, la de infrarrojo y la de ondas de radio (Penner, 2010). Haciendo alusión al comportamiento dual de la luz Penner (2010) señala que una diferencia entre absorción, emisión y difracción es que las dos primeras son mejor explicadas bajo el concepto de partículas mientras que la difracción lo es mediante el término de ondas.

El fundamento por el cual los métodos de espectroscopia son usados para identificar especies desconocidas se basa en el hecho de que cada átomo y molécula presenta como parte de su naturaleza específica un conjunto de niveles de energía disponibles y otros inalcanzables, de igual modo presentan espacios de energía potenciales entre niveles de energía internos que también son específicos los cuales pueden ser traducidos como su huella digital (Penner, 2010). Determinando las transacciones específicas entre los niveles de energía disponibles de una especie al ganar energía proveniente de una determinada región electromagnética es como se analiza la identidad de dicha especie (Penner, 2010), por tanto, la adecuación de detección dependerá también de la longitud de onda seleccionada para la radiación (Sogorb y Vilanova, 2004). Se puede tener información de la concentración del analito al medir la energía emitida por la especie al regresar a su estado fundamental (Skoog *et al.*, 2008).

2.4.2. Espectro electromagnético

El espectro electromagnético abarca el conjunto de frecuencias, cantidad de ciclos de onda por unidad de tiempo, provenientes de una radiación electromagnética la cual es la energía emitida por una fuente natural o artificial que se propaga en ondas electromagnéticas y las ordena según su comportamiento, siendo sus límites “cero” e “infinito” (Ordóñez, 2012).

Las ondas electromagnéticas son definidas por la interacción entre el campo eléctrico y magnético debido al movimiento de sus partículas subatómicas (Ordóñez, 2012), la interacción de ambos campos se explica por la ley de Faraday sobre la influencia del campo magnético sobre el campo eléctrico y la ley de Ampere sobre la influencia inversa (Sogorb y Vilanova, 2004).

Entre las características de la onda electromagnética está que puede propagarse en el vacío ya que no necesita de un medio o soporte material de propagación, son transversales porque se produce perturbación en dirección perpendicular a la de su propagación (Ordóñez, 2012), se propaga en el vacío a velocidad de 300000 km/seg que es su máxima velocidad la cual en el vacío es independiente de su longitud de onda, es portadora de energía, se diferencian de acuerdo a su banda de frecuencia, a mayor frecuencia mayor es su energía asociada (Sogorb y Vilanova, 2004), la onda es polarizada a lo largo del eje X así las ondas de los campos eléctrico y magnético son perpendiculares, se la mide por su frecuencia, longitud de onda, amplitud y distancia, la frecuencia está determinada por la fuente y permanece invariable mientras que la velocidad depende de la composición del medio por el que pasa (Skoog *et al.*, 2008).

El espectro electromagnético se divide convencionalmente de menor a mayor frecuencia en las siguientes categorías: radiodifusión, rayos infrarrojos, luz visible, rayos ultravioletas, rayos x, rayos gamma, rayos cósmicos (Ordóñez, 2012).

2.4.3. Espectroscopia de absorción

La espectroscopia de absorción se basa en el fenómeno de absorción de la radiación electromagnética por una especie química y se expresa en un aumento de la energía interna (Penner, 2010). Sobre este proceso Sogorb y Vilanova (2004) señalan que a temperatura ambiente los átomos y moléculas se encuentran en su estado basal o fundamental, que es su nivel de energía más bajo, la cual se ve aumentada con la absorción de la onda electromagnética, pero indica que esto ocurre si la energía de dicha onda coincide exactamente con la energía necesaria para excitar a la especie hasta que la lleve a alguno de sus niveles energéticos superiores, tras unos nanosegundos la especie vuelve a su estado original emitiendo al medio la energía absorbida. Esta cantidad de energía se mide por longitud de onda proporcionando datos que pueden ser usados en análisis cualitativos y cuantitativos de la especie química (Skoog *et al.*, 2008).

Según indica Penner (2010) las transiciones más relevantes de la espectroscopia de absorción atómica y molecular pertenecen a la región de longitud de onda de rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo y microondas e indica que para la radiación infrarroja el tipo de transición que ocurre es posición vibratoria de los átomos en enlaces moleculares.

2.4.4. Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja abarca la absorción por una especie química de frecuencias de radiación del rango infrarrojo. Este método es muy usado en la industria alimentaria, aunque menor que el de absorción visible y ultravioleta, pudiendo analizar una gran cantidad de muestras dado a que casi todas las moléculas orgánicas e inorgánicas absorben radiación infrarroja (Sogorb y Vilanova, 2004). La transición por la que pasa la especie química al absorber la radiación infrarroja es entre dos estados vibracionales o entre dos estados rotacionales, la primera usa poca energía por lo que sucede en muestras gaseosas mientras que la segunda sucede en muestras sólidas o líquidas (Swarin y Drumm, 1992, citado por Macho, 2002). La radiación infrarroja se divide en 3 regiones como se observa en la Tabla 7 cuyas transiciones son características a cada región: en IR cercano se producen absorciones por sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales, en IR medio vibraciones fundamentales y en IR lejano absorciones por cambios rotacionales (Wehling, 2010; Macho, 2002).

Tabla 7: División del espectro IR

Región	Transición característica	Longitud de onda (nm)	Número de onda (cm⁻¹)
Infrarrojo cercano (NIR)	Sobretonos y combinaciones	700-2500	14300-4000
Infrarrojo medio (MIR)	Vibraciones fundamentales	2500-5x10 ⁴	4000-200
Infrarrojo lejano	Rotaciones	5x10 ⁴ -10 ⁶	200-10

FUENTE: Swarin y Drumm (1992) citado por Macho (2002)

Sogorb y Vilanova (2004) menciona que la longitud de onda de una radiación infrarroja es absorbida por una molécula de acuerdo a las características propias de dicha molécula como átomos que la conforman, estructura molecular y tipos de enlaces presentes, proceso que provoca transiciones entre niveles de energía vibracional e indica que para moléculas simples y complejas el número de modos de vibración posibles es grande.

2.4.5. Espectroscopia del infrarrojo medio transformada de Fourier (FT-MIR)

La radiación electromagnética de la región infrarrojo medio está comprendida en el rango de longitud de onda de 650 a 4000 cm^{-1} e interactúa con las especies por absorción basando su análisis de identificación en la asociación de las bandas individuales con grupos químicos específicos (Wehling, 2010). Sus bandas de absorción hacen referencia a rangos de longitud de onda del infrarrojo que indican la vibración entre átomos de una molécula del que se analiza la transición ocurrida entre niveles de energía internos donde el número cuántico referente a vibración cambia en una unidad formando la banda fundamental o cambia en más unidades formando los sobretonos (Macho, 2002).

El tipo de transición característico del MIR es vibracional fundamental en el cual según explica Sogorb y Vilanova (2004) los átomos vibran con una frecuencia que depende de ellas y de la fortaleza del enlace químico que las une, cuya fortaleza tiene relación directa con la frecuencia de vibración e indica que las vibraciones provenientes de más de dos átomos en movimiento simultáneo dependen únicamente de los átomos y de la fortaleza de sus enlaces, aunque la frecuencia puede variar por influencia de otros átomos de alrededor, Wehling (2010) menciona que la frecuencia de vibración es inversamente proporcional a la masa del sistema molecular e indica que las principales vibraciones que se producen son los de estiramiento y flexión.

En la Figura 4 se muestra las bandas de absorción de los grupos funcionales más comunes en el infrarrojo medio donde Macho (2002) señala dos zonas, una de 4000 a 1300 cm^{-1} donde las bandas corresponden a un solo grupo químico con algunas desviaciones producidas por ciertas características estructurales y en la otra zona de 1300 a 400 cm^{-1} donde ciertas regiones del espectro son abarcadas por varias bandas haciendo más compleja la identificación de grupos químicos.

En cuanto a la instrumentación se utilizan rutinariamente dos tipos de espectrómetros para la espectroscopia del MIR, los instrumentos dispersivos que dispersan la radiación y los instrumentos de transformada de Fourier (FT). En la Figura 5 se observan los elementos instrumentales para el análisis FT-MIR, Wehling (2010) menciona entre los elementos que se utilizan: interferómetro cuya función es la de dividir el haz de IR, espejos para recombinar los haces reflejados, detector que recibe la radiación modificada tras la absorción de

frecuencias específicas por la muestra, computadora que realiza la transformación matemática de Fourier que consiste en convertir la intensidad versus longitud de onda que muestra el interferograma en un espectro infrarrojo de absorbancia versus frecuencia.

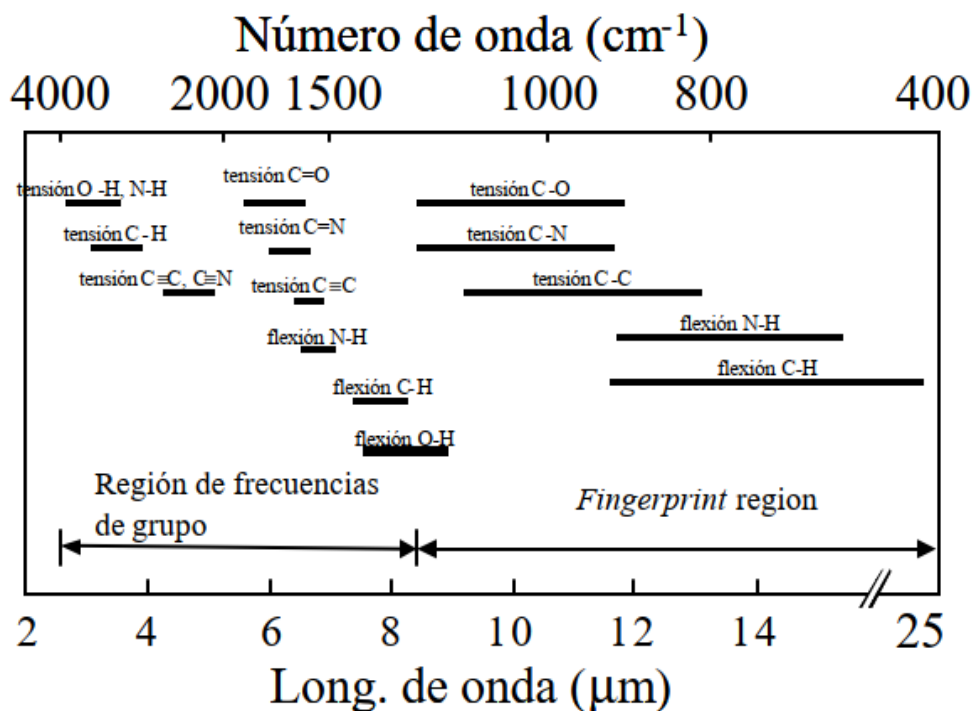


Figura 4: Frecuencias de vibración en el infrarrojo medio

FUENTE: Martens y Dardenne (1998) citado por Macho (2002)

En el funcionamiento de un espectrómetro FT-MIR se realizan mediciones de background que es el espectro de fondo, la cual según el Manual de operación (2017) es importante para que el equipo recopile información del medio ambiente para luego capturar el perfil absoluto de la muestra, de igual manera su medición entre muestras permitirá que la señal no sea influenciada por los cambios ocurridos en el ambiente e indica que para una correcta lectura de background se requiere la adecuada limpieza en los visores para eliminar cualquier residuo u opacidad.

Un parámetro a determinar en las lecturas de los espectros es el número de barridos o scan que se programa en el espectrómetro, Ventura (2006) explica que se usa el promedio de los scan tomados en las mismas condiciones para aumentar la señal y disminuir el ruido y que ello mejora al aumentar el número de scan.

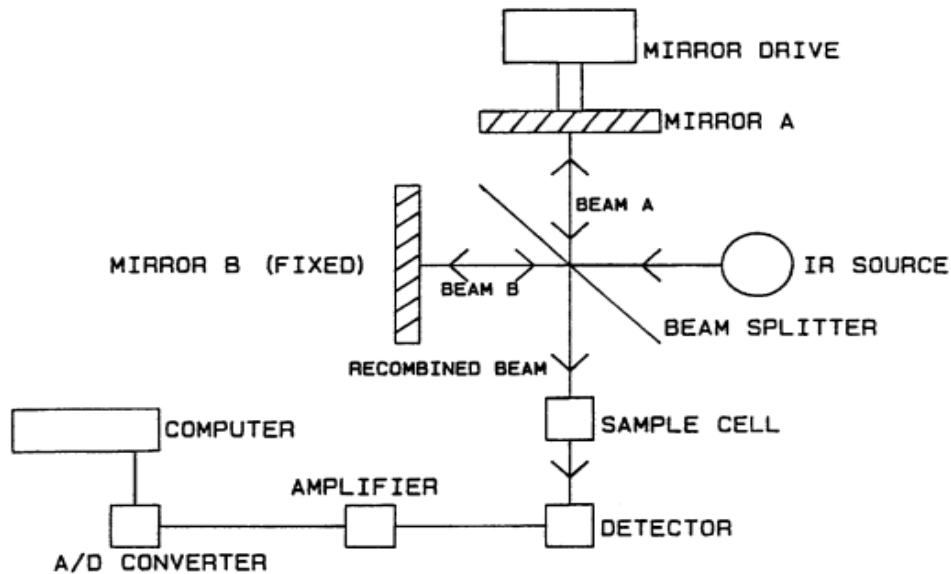


Figura 5: Diagrama de bloques de un interferómetro y componentes electrónicos asociados que se usan típicamente en un instrumento FT-MIR

FUENTE: Wehling (2010)

El método de análisis FT-MIR presenta varias ventajas frente a los métodos dispersivos, Skoog *et al.* (2008) menciona 3 ventajas: la primera es el mayor rendimiento por presentar menos aparatos ópticos y no contar con rendija lo que genera aumento de la potencia de radiación y aumento de la relación señal/ruido, la segunda es su alta potencia de resolución y capacidad de reproducción de la longitud de onda, y la tercera es la rápida obtención de datos.

2.5. QUIMIOMETRIA

2.5.1. Definición

La quimiometría es el estudio de aplicación de métodos matemáticos y estadísticos para la medición óptima de datos experimentales químicos con el objetivo de maximizar su evaluación y obtener lo máximo de información química con su análisis e interpretación. Abarca el estudio de datos del tipo univariado y multivariado, que serán tratados con métodos univariantes y multivariantes respectivamente, en el método univariante se analiza

solo una variable, mientras que en el multivariante se analizan muchas variables por lo que en general requiere de un preprocesamiento (Mongay, 2005; Dos Santos *et al.*, 2012).

El procesamiento quimiométrico de datos de espectroscopia infrarroja se trata de un análisis multivariante debido a las diversas señales analíticas del perfil de componentes de la muestra alimenticia del cual se busca facilitar la evaluación compleja de los espectros infrarrojos. Macías *et al.* (2004) menciona como aplicaciones de FT-MIR y quimiometría en la industria alimentaria: caracterizar bebidas alcohólicas; predecir los niveles de adulteración en la elaboración de alimentos procesados; realizar estudios fisiológicos en plantas, y en la discriminación de microorganismos. Es así, que el objetivo de la quimiometría es la de obtener información cualitativa y/o cuantitativa a partir de los datos relevantes discriminando a aquellos que pueden interferir en el procesamiento y posterior interpretación de datos y/o patrones.

Según Ximénez y San Martín (2013) el análisis simultáneo de un conjunto de más de dos variables, hace referencia a un análisis multivariante e indica que además estas variables deben cumplir con ser aleatorias y relacionadas entre sí tal que no puedan analizarse por separado, señala que estas variables pueden ser del tipo cualitativo, cuantitativo y ser consideradas dependientes o independientes.

Respecto a los análisis cualitativos, la quimiometría se ha usado exitosamente para identificar patrones en un conjunto de muestras y predecir el comportamiento y clasificación de muestras incógnitas. Según Moncayo (2017) un modelo cualitativo o de clasificación define matemáticamente la relación entre un conjunto de medidas y una variable cualitativa que caracteriza a una muestra.

Respecto a los análisis cuantitativos el objetivo es obtener un modelo para la predicción de un atributo específico mediante técnicas de regresión que permite la calibración de un atributo cuantitativo desconocido como variable dependiente con la información de las variables independientes que suelen ser medidas espectrales o cromatográficas. Para establecer dicha relación se usan datos empíricos y conocimientos previos, y se destaca el uso de varias variables predictoras debido a la presencia de distintas fuentes de varianza que pueden influir sobre ellas (Infometrix, 2014; López *et al.*, 2006).

2.5.2. Pasos para el análisis multivariante

Según Rodríguez (2014) y Talavera *et al.* (2013) el procesamiento quimiométrico se basa en los siguientes pasos: definición y caracterización de muestras, registro de condiciones operativas, pretratamiento de datos, exploración de datos, módulo del conjunto de entrenamiento y validación del modelo de calibración que se explicarán a continuación tomando de referencia el análisis de mediciones espectrales.

a. Definición y caracterización de muestras

La definición es la selección de muestras que sean relevantes y del rango de diversidad necesaria de acuerdo a la aplicación futura del modelo, y la caracterización es la revisión previa de literatura sobre la relación del atributo en interés con ciertos métodos quimiométricos confiables de tal manera que la aplicación sea afín al objetivo planteado (Rodríguez, 2014).

b. Registro de condiciones operativas

Es la estandarización de las condiciones apropiadas para la toma de muestras y de las mediciones multivariantes (Rodríguez, 2014).

c. Pre-tratamiento de datos

Es la modificación que se le da a la data para facilitar su uso y lograr una respuesta lineal de las variables, eliminando fuentes de variaciones que están fuera del interés del análisis que pueden influenciar el resultado final y hacer más complejo su análisis (Talavera *et al.*, 2013; Lucio, 2012).

Según Talavera *et al.* (2013) el pre-tratamiento consta de dos etapas: transformaciones y pre-procesamiento; acerca de la primera menciona que su objetivo es aplicar las matemáticas para disminuir el ruido experimental y respecto a la segunda su objetivo es aplicar estadística para que los datos estén dentro de un mismo rango de valores. En orden de aplicación primero son las transformaciones y luego el pre-procesamiento.

c.1. Transformaciones

Una adecuada transformación es importante para suavizar la influencia del ruido, que contiene información aleatoria ajena a la esencia del análisis, sobre los resultados del análisis multivariante. Por lo que se aplica a los datos de un conjunto de variables sobre una determinada muestra (fila) (Infometrix, 2014). Se puede aplicar una secuencia de transformaciones de acuerdo al requerimiento del análisis, así se tiene la siguiente opción de secuencia para la transformación de datos espectrales infrarrojos:

- Segunda derivada: Se realiza repitiendo el proceso de la primera derivada que consiste en la sustracción de las absorbancias de números de onda adyacentes. El objetivo es la de mejorar la resolución de picos superpuestos y eliminar las variaciones de la línea base lo que puede resultar en aumentar la potencialidad de la discriminación, sin embargo, ello puede aumentar la complejidad del espectro y disminuir la proporción entre la señal y el ruido (Macho, 2002).
- Smooth: Se realiza ajustando un polinomio cuadrático restringido, una de las formas más sencillas de suavizar es mediante una media móvil. El objetivo es la de asegurar la alienación de los datos de la muestra y con ello suavizar el ruido corrigiendo las fluctuaciones aleatorias a aumentos o disminuciones monótonas (Macho, 2002).

Ambas transformaciones están basadas en el filtro polinomial de Savitzky-Golay (Infometrix, 2014).

c.2. Pre-procesamiento

Un adecuado pre-procesamiento de los datos es importante para evitar que los análisis multivariantes realicen interpretaciones equivocadas de las varianzas debido a unidades arbitrarias. Por lo que se aplica a los datos de un conjunto de muestras sobre una determinada variable (columna), dando un resultado específico que varía si se añaden o se retiran muestras (Infometrix, 2014). La opción de pre-procesamiento recomendada para tratar datos espectroscópicos es el siguiente:

- Centro medio: Se basa en trasladar la distribución de los datos hacia alrededor del origen del plano para mejorar la visualización y comprensión del comportamiento de los datos, su cálculo consta de: 1. Cálculo de la media de cada variable; 2. Sustracción de la media a cada dato. El objetivo es crear una matriz de los datos que se centre en la media de sus valores (Infometrix, 2014).

d. Exploración de datos

El siguiente paso tras el pre-tratamiento de datos es el método de reconocimiento de patrones que se logra con técnicas estadísticas con el cual se busca alguna similitud o tendencia en una matriz de datos multivariantes (Dos Santos *et al.*, 2012; Talavera *et al.*, 2013).

e. Modulación del conjunto de entrenamiento

Es requerido en los análisis cualitativos y cuantitativos para desarrollar modelos de clasificación y de regresión respectivamente como base de información verídica que es propio de la materia a estudiar por lo que está constituida por el conjunto de datos para un modelamiento y futura predicción (Infometrix, 2014). Las técnicas de clasificación son para agrupar a los elementos en estudio según una característica química para su evaluación cualitativa y que puede ser complementada por métodos predictivos para el análisis de muestras incógnitas (Talavera *et al.*, 2013), y las técnicas de regresión son para relacionar linealmente dos conjuntos de datos donde uno se pretende entender en base al otro por su influencia en la propiedad de interés cuya creación del modelo se denomina calibración con objetivo final la predicción (Infometrix, 2014).

En esta etapa se debe optimizar el modelo evaluando el resultado obtenido con las opciones seleccionadas de transformación, pre-procesamiento, selección de variables y eliminación de muestras atípicas u outliers. El mismo algoritmo es capaz de detectar los outliers por no encajar con la estructura del modelo debido a su alto valor de residuo y por valores altos de distancia Mahalanobis (para modelos de clasificación) y de Leverage (para modelos de regresión) que indican su influencia en el modelo. El analista puede modificar las opciones antes mencionadas de tal manera que encuentre la selección que optimice su modelo o incluso puede probar mejorando la calidad de la data aumentando la cantidad de muestras o usando mediciones con mejor resolución (Aykas y Menevseoglu, 2021; Infometrix, 2014).

f. Validación del modelo de calibración

Es la evaluación del nivel de eficacia y fiabilidad de la predicción del modelo de calibración comparando las respuestas (cualitativa o cuantitativa) predichas por el modelo y los valores conocidos mediante técnicas tradicionales de alta confiabilidad. Si las mediciones a predecir provienen de muestras que se encuentran en la calibración se trataría de una validación cruzada, mientras que si provienen de muestras que no se encuentran en la calibración se trataría de una validación externa (Rodríguez, 2014; Infometrix, 2014). La eficacia y fiabilidad de la predicción va a depender no solo de la optimización del modelo y calidad de las medidas cromatográficas / espectroscópicas, sino también de la cantidad y selección de muestras las cuales deben ser representativas y deben abarcar la máxima variación posible de la variable de respuesta de tal manera que el modelo cuente con la información necesaria para la correcta determinación de futuras muestras desconocidas (Peinado, 2005). Es por ello la importancia en la minuciosidad en todos los pasos del análisis quimiométrico.

El objetivo del análisis quimiométrico de mediciones multivariantes es la de obtener modelos predictivos robustos y adecuados para la interpretación de diversas muestras que se encuentran en la naturaleza (Porcel, 2002).

2.5.3. Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA suele ser el primer método usado para la exploración de datos multivariantes con el objetivo de reducir la dimensión mediante combinaciones lineales de la información multidimensional, variables independientes correlacionadas, y su reordenamiento en un nuevo sistema de coordenadas con variables reducidas y no intercorrelacionadas, construido en base a PCs donde el primer componente principal (PC1) se traza abarcando la mayor información y las siguientes (PC2, ..., PCn) van abarcando cada vez menos información (Infometrix, 2014; Dos Santos *et al.*, 2012). El término “información” es definido como “variación” y se calcula con la siguiente ecuación:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2$$

Donde “ n ” es el número de variables y “ x ” son los valores de las variables. Respecto a la varianza, dicha ecuación se asemeja por indicar la dispersión como la suma de cuadrados de la desviación de la variable sobre su media y se diferencia por la inclusión del factor “ $n - 1$ ” que se genera por el uso de un pre-procesamiento (Infometrix, 2014).

La aplicación de PCA puede resolver el contenido de errores de las mediciones químicas multivariantes (cromatogramas / espectros) donde cada compuesto de la solución puede relacionarse con PCs por su influencia en las mediciones. La importancia de reducir la dimensión de un conjunto de datos compuestos por la combinación de variables que tienen y no tienen relación con la variable dependiente de interés, es la de encontrar información que es específica y descartar la que sería aleatoria (redundante y ruido). Ello se logra formando PCs y determinando la cantidad necesaria de dichos factores. Al trabajar con el número óptimo de PCs se estarían descartando las combinaciones irrelevantes de las variables, mas no se descartarían las variables. La ventaja de trabajar con un conjunto de datos reducido es su mayor facilidad de manejo e interpretación (Infometrix, 2014; Brereton, 2003).

Las características de los factores es que son ortogonales entre sí (están no correlacionadas), se forman de manera decreciente en información, su cantidad puede ser hasta la cantidad en común entre muestras y variables. La visualización que otorga un PCA permite la determinación de agrupaciones y la interpretación de datos según un atributo (variable dependiente) y la detección de muestras atípicas. El programa “Modelado Quimiométrico Integral Pirouette® (Infometrix)” construye a partir de las variables “ x ”, “ y ” y “ c ” (independiente, dependiente y para la clase respectivamente) una matriz X para el análisis quimiométrico compuesto por n filas (cada fila es una muestra) y m columnas (cada columna es una variable independiente) como se muestra a continuación:

$$X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ \dots \\ x_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ x_{31} & x_{32} & \dots & x_{3m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

Donde “ x_{nm} ” es el elemento correspondiente a la “ m -ésima” variable de la “ n -ésima” muestra. Dicha matriz X es de dimensión $n \times m$ y contiene los datos transformados y pre-

procesados (*Xtrans*) (Infometrix, 2014; Rodríguez, 2014). En un modelo PCA, la representación de la matriz X se base en otras dos matrices:

$$X = TL^T$$

Donde “ T ” es la matriz de puntajes y “ L^T ” es la transpuesta de la matriz de cargas, donde el primer vector de puntajes y el primero también de carga son denominados como vectores propios del PC1. Si se recorta el número de columnas de ambas matrices a un valor “ k ” (primeros factores) debido a su relevancia, entonces se obtiene:

$$X = \hat{X} = T_k L_k^T$$

Donde “ \hat{X} ” es la matriz X reducida. Las columnas de la matriz de puntajes indican la proyección de las muestras sobre el nuevo sistema de coordenadas definido por PCs como sus ejes, y las columnas de la matriz de carga indican la contribución de las variables sobre los PCs (primera columna es para el PC1) y cuyo valor varía entre 1 (coincide con un PC) y -1 (no coincide con un PC) indicando mayor y menor contribución respectivamente (Brereton, 2003; Infometrix, 2014; Dos Santos, *et al.*, 2012).

Las PCs “ $Z_1, Z_2, Z_3, \dots, Z_n$ ” son combinaciones lineales de los elementos “ $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ ” de cada muestra “ n ”, así un PC se puede describir como:

$$Z_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + a_{13}x_3 + \dots + a_{1n}x_n$$

Donde “ $a_{11}, a_{12}, a_{13}, \dots, a_{1n}$ ” son determinados asumiendo que los elementos “ x_n ” no están relacionados entre sí (Rodríguez, 2014). En la Figura 6 se visualiza la construcción de un modelo de PCA.

Al modelar PCA se calcula: los “ X residuales” que corresponden a la diferencia entre la matriz *Xtrans* sin y con recorte en “ k ” descrito como “error residual (E)” cuyo cálculo sería “ $E_k = X - T_k L_k^T$ ”, y un vector predictivo de contribución de puntuación para nuevas mediciones “ x_{new} ” mediante “ $t_{new} = x_{new} L_k$ ”. Ambos cálculos son usados en la predicción

PCA en la determinación de muestras atípicas y de las variables que las hacen diferentes (Infometrix, 2014).

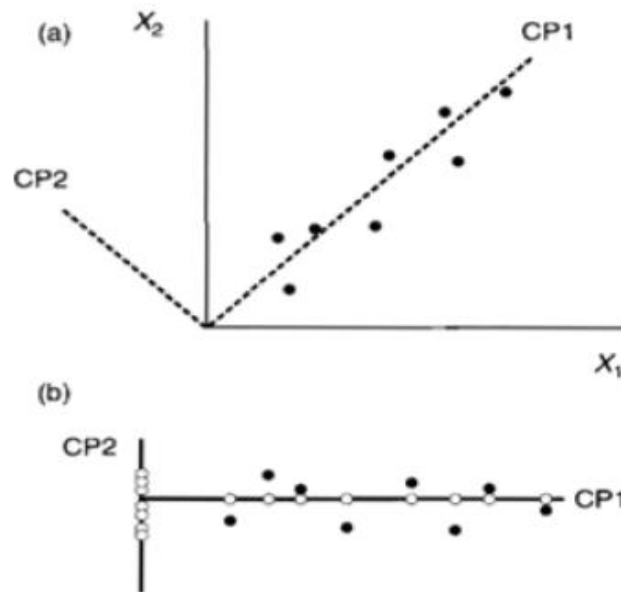


Figura 6: Reducción de la dimensionalidad con dos componentes principales

FUENTE: Miller, N. y Miller J. (2002) citado por Rodríguez (2014)

Respecto a la Figura 6 en (a) se muestra la construcción del PC1 y PC2 sobre el plano de dos variables (X_1 y X_2) y en (b) se muestra los puntos de datos (●) y sus proyecciones (○) sobre el plano de los PCs.

2.5.4. Modelo independiente suave de analogía de clase (SIMCA)

Según se indica en Infometrix (2014) el método SIMCA es un método de clasificación que se basa en la similitud la cual consiste en la aproximación de las muestras en un espacio de medición donde una mayor cercanía indica una mayor probabilidad de pertenecer a la categoría cercana y ello se mide como distancia cuya forma de cálculo caracteriza al método SIMCA.

El método SIMCA pertenece al grupo de enfoque de reconocimiento de patrones supervisado, en comparación de los no supervisados donde la principal diferencia es la forma de construcción del modelo en el cual en el primero las muestras son previamente asignadas a una categoría tras un conocimiento externo mientras que en el segundo las categorías se

designan por un análisis exploratorio. Los términos que terminan por definir a la técnica SIMCA son la denominación independiente y suave.

Es denominado “independiente” debido a que en cada grupo se realiza de manera independiente un Análisis de Componentes Principales (PCA) e incluso pueden tener diferentes números de componentes principales (PCs) (Brereton, 2003). A diferencia de otros métodos de clasificación, la técnica SIMCA puede generar muchos diagnósticos debido a que en su modelo las clases pueden superponerse dando como resultado que la incógnita se ajuste a una categoría, no se ajuste a ninguna o se ajuste a varias expresando en probabilidad su predicción (Infometrix, 2014) y es este el motivo por el cual es denominado “suave” en contraste con el concepto de modelado duro que refiere a que un elemento debe pertenecer a una clase (Brereton, 2003), es así que el modelado suave es pertinente para análisis de datos químicos por la misma naturaleza de los objetos de compartir características, lo que lo hace un modelo realista.

Como se ha descrito el objetivo final del método SIMCA es la de clasificar confiablemente muestras incógnitas, para lograr conocer si la muestra incógnita se ajusta a una determinada clase. La información se procesa en dos partes, una mediante el modelo de clase y la otra mediante los residuales con los que se puede llegar a la respuesta de rechazar una muestra en caso sea significativamente mayor los residuales de la muestra sobre los de la clase (Ni *et al.*, 2009, citado por Lucio, 2012). Para llegar a ello los pasos a seguir son: (1) medidas de separación entre clases; (2) medidas de importancia exclusivas del SIMCA; (3) asignación de una muestra a las categorías; (4) confiabilidad de la predicción (Infometrix, 2014).

a. Clasificación por método SIMCA

Para obtener un buen modelo SIMCA y optimizado se requiere de lo siguiente: que cada clase de entrenamiento sea considerado como independiente, determinar la cantidad óptima de factores en cada clase, realizar un buen diagnóstico de los valores atípicos, además de examinar adecuadamente su poder de modelado, poder de discriminación que indica qué tan bien una variable discrimina entre dos clases, separabilidad de clases, residuos; y tener en cuenta que al cambiar transformaciones y/o preprocesamientos se debe volver a optimizar el

modelo. El modelado de CPs que se realiza independientemente para cada categoría o clase se realiza según la descripción realizada en el ítem de PCA (Infometrix, 2014).

a.1. Medidas de separación entre clases

La separación entre clases se mide bajo el término de “distancia” entre los modelos de PCs usando el concepto geométrico de distancia y cuyo valor debe ser mayor que 3 para afirmar que las clases son separables, se ejemplifica esta medida mediante la siguiente ecuación usando como ejemplo un caso de dos clases donde las muestras de la clase 1 se ajusta al modelo de clase 2:

$$\hat{X}_1 = X_1 L_2 L_2^T$$

Donde L hace referencia a las matrices de cargas recortadas y X_1 al bloque de la clase 1 Infometrix (2014). La ecuación de residuos se define como:

$$E = \hat{X}_1 - X_1$$

Y la ecuación de un residual entre clases para cada muestra en la clase 1 como:

$$S_{12} = \left(\frac{1}{(m - k_2)n_1} \sum_i^{n_1} e_i e_i^T \right)^{1/2}$$

Donde describe que k_2 es el número de componentes principales en la clase 2 y n_1 el número de muestras de la clase 1. Dicha ecuación se aplicaría para cada combinación de pares de clases, su resultado sería una matriz que no es simétrica puesto solo ajusta las muestras de la clase 1 al modelo de clase 2 y no a la inversa. Así, la ecuación para el cálculo de distancia entre clases es:

$$D_{12} = \left(\frac{S_{12}^2 + S_{21}^2}{S_{11}^2 + S_{22}^2} \right)^{1/2} - 1 = D_{21}$$

Ecuación que se aplicaría para cada combinación de pares de clases y cuyo resultado daría una matriz simétrica ($D_{11} = D_{22} = 0$).

a.2. Poder de modelado

La importancia del poder de modelado total es que indica cuáles son las variables que tienen excelente (valor igual a 1) o ninguna discriminación (valor igual a 0) para su capacidad de modelar bien una clase, por tanto, hace referencia a la utilidad de las variables teniendo en cuenta que un valor por debajo de 0.5 significa ser de poca utilidad (Infometrix, 2014; Brereton, 2003). La ecuación de poder de modelado de cada variable para cada clase es de acuerdo a lo descrito por Brereton (2003):

$$M_j = 1 - \frac{S_{jresid}}{S_{jraw}}$$

Donde “S” es la desviación estándar y la descripción “ S_{jraw} ” hace referencia al caso de los datos sin procesar y “ S_{jresid} ” a los residuos (Brereton, 2003).

a.3. Poder discriminatorio

Se aplica el poder discriminatorio para entender la capacidad de discriminación de una variable entre dos clases la cual puede ser buena y efectiva o con poco efecto. Su cálculo se basa en ajustar cada muestra a ambos modelos de clase y calcular las matrices residuales las cuales son para las cuatro direcciones de ajuste de clases, de muestras de A al modelo de A, de muestras B al modelo B, de muestras A al modelo B y de muestras B al modelo A (Brereton, 2003). Brereton (2003) describe a la siguiente ecuación como la desviación estándar para las matrices residuales, el cual a mayor valor mayor será el poder discriminatorio.

$$D_j = \sqrt{\frac{\text{claseAmodeloB}S_{jresid}^2 + \text{claseBmodeloA}S_{jresid}^2}{\text{claseAmodeloA}S_{jresid}^2 + \text{claseBmoldeloB}S_{jresid}^2}}$$

b. Predicción de la clasificación por método SIMCA

Se mide la eficiencia en la predicción para validar la clasificación SIMCA, para ello se debe ejecutar la predicción de cierta cantidad de muestras diferentes al conjunto de entrenamiento del modelo de clasificación. Los resultados de dicha validación externa se basarán en la clasificación incorrecta y en los parámetros que se calculan a partir de ella: sensibilidad y selectividad que se calculan usando los siguientes términos:

- Verdaderos negativos (tn): es el caso donde una muestra que no pertenece a la clase “A” es clasificada correctamente a otra clase diferente a “A”. Se ubican fuera de la diagonal sin incluir los cuadrantes “sin modelar” y “sin coincidencia”.
- Falsos positivos (fp): es el caso donde una muestra que no pertenece a la clase “A” es clasificada incorrectamente en dicha clase “A”. Se ubican en la fila “sin modelar”.
- Falso negativo (fn): es el caso donde una muestra que pertenece a la clase “A” es clasificada correctamente a otra clase diferente a “A”. Se ubican en la columna “sin coincidencia”.
- Verdadero positivo (tp): es el caso donde una muestra que pertenece a la clase A es clasificada correctamente a dicha clase “A”. Se ubican en la diagonal sin incluir los cuadrantes “sin modelar” y “sin coincidencia”.

Los valores de la columna “sin coincidencia” indican la cantidad de muestras sin éxito en su clasificación esperada, mientras que los valores de la fila “sin modelar” indican la cantidad de muestras que no presentan una categoría asignada previamente o que están asignados a una categoría no incluida en el modelo. Las clasificaciones incorrectas describen el éxito en la predicción mediante el conteo de “ tn ”, “ fp ”, “ fn ” y “ tp ”, con dichos datos el analista toma la decisión sobre la cantidad de muestras correcta e incorrectamente clasificadas que tolera para considerar como adecuado a su modelo cualitativo (Infometrix, 2014).

A continuación, se presentan los parámetros que permiten evaluar la eficiencia en la predicción SIMCA y comparar entre predicciones de distintos modelos:

b.1. Sensibilidad

Se definiría como el porcentaje de muestras aceptados por el modelo y se calcula como lo siguiente:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{tp}{tp + fn}$$

b.2. Selectividad

También llamada especificidad, se definiría como el porcentaje de muestras rechazados por el modelo y se calcula como lo siguiente:

$$\text{Selectividad} = \frac{tn}{tn + fp}$$

El analista debe establecer los grados de importancia entre los tres parámetros de eficiencia para evaluar la “aceptabilidad” de un modelo de clasificación o para establecer como “mejor” un modelo al compararlo con otro(s) (Infometrix, 2014; Casalea *et al.*, 2012; Moncayo, 2017).

2.5.5. Mínimos cuadrados parciales (PLS)

En una regresión multivariante se asume una relación lineal entre la variable de interés dependiente “Y” con las múltiples variables analíticas independientes “x” de tal manera que la calibración permita la función predictiva “ $Y = f(x)$ ” como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_m x_m + f$$

Donde “Y” es la respuesta, “ x_1, x_2, \dots, x_m ” son las variables predictoras, “ $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_m$ ” son las pendientes o los coeficientes de regresión y “f” es el residuo o error de la correlación (Lin *et al.*, 2014; Infometrix, 2014).

La regresión multivariante por método PLS es un tipo de regresión basado en factores de modelado bilineal. Las técnicas de regresión basado en factores trabajan: a las variables “ x ” como no correlacionadas entre sí para eliminar la imprecisión que se generaría al asumir que las variables son dependientes entre ellas, la descomposición de la matriz original de las variables independientes “ x ” en tres matrices por PCA lo que a su vez aumenta la covarianza entre los valores de “ x ” e “ y ” y la posterior sustitución de la matriz original de las variables independientes “ x ” por la matriz de dimensión reducida proporcionando una matriz robusta, y trabajan minimizando la interferencia de variables independientes que no aportan en el modelamiento de la variable dependiente al caracterizar la varianza en combinaciones de las variables independientes (Infometrix, 2014; López *et al.*, 2006; Peinado, 2005).

Por lo tanto, como ventaja se obtiene la limitación de la influencia de información irrelevante presente en la varianza espectral lo que permite calibraciones más precisas y elaboradas con información útil y la no necesidad de eliminar datos por el tratamiento de combinaciones sobre las variables que les otorga la característica deseada de no estar correlacionadas, y como desventaja se tiene la interpretación y asignación de factores (Martens y Naes, 1989, y Martens y Martens, 2001, citado por Kocaoglu *et al.*, 2009, Infometrix, 2014). En dichas técnicas se desarrolla una nueva variable dependiente “ Y_{new} ” en base de la nueva variable independiente “ x_{new} ”, para ello se multiplica la matriz original “ $y = x\beta + f$ ” por su transpuesta quedando “ $Y_{new} = x_{new}\beta$ ” como nueva ecuación.

Para la última ecuación, en el caso de PLS se tiene que “ $\beta = VR^{-1}U^T y$ ” cuyo coeficiente de regresión se calcula minimizando la suma de cuadrados del error y cuyos elementos “ V ” (columna), “ R ” (bidiagonal derecha) y “ U ” (fila) refieren a los pseudovalores propios. Así, las características de un PLS respecto a otras técnicas de regresión basado en factores es el uso de la bidiagonalización, el cálculo de pseudovalores propios que determina cuánta variación de las matrices “ x ” e “ y ” abarca un factor (Kocaoglu *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014) y la mayor varianza explicada por los componentes principales sobre todo por el primero (Porcel, 2002).

En PLS la determinación del número óptimo de factores es esencial por indicar la cantidad de variables que el modelo requiere para una justa interpretación de los datos y porque se pueden generar dos casos que comprometería la buena eficiencia en la predicción: subajuste si el número de factores es muy pequeño provocando la falta de información en la calibración

y sobreajuste si el número de factores es muy alto provocando la inclusión de información errada en la calibración (Aykas y Menevseoglu, 2021; Lu *et al.*, 2012; Osten, 1988 y Martens, 1989, citados por Porcel, 2002). Su estimación se puede realizar a partir de un proceso de validación cruzada (cross validation) que se basa en la predicción de muestras cuya variable dependiente es conocido por el modelo pero que tras su exclusión en el modelo de calibración y posterior predicción permite el cálculo del residuo de predicción (diferencia entre el valor conocido y el valor estimado), el modelo realiza dicha evaluación formando segmentos de muestras donde cada proceso de validación usa un segmento para ser predicha y los otros para la calibración repitiendo el proceso hasta que todos los segmentos hayan sido usados una vez (Infometrix, 2014). Los parámetros que miden la calidad del modelo de regresión son los siguientes:

a. Error estándar de calibración (SEC)

Es el error que se genera al validar el modelo con predicciones de muestras de su propio conjunto de entrenamiento, informando sobre el ajuste entre los valores conocidos y los estimados. Por lo tanto, puede indicar un error mucho más bajo de lo que se obtendría con futuras muestras desconocidas que se alejen a lo que el modelo conoce por su conjunto de entrenamiento, es decir, no proporciona la confiabilidad real del modelo (Infometrix, 2014; Kocaoglu *et al.*, 2009). Su cálculo se realiza respecto a la variable dependiente “y” con la siguiente ecuación:

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^c (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_c}}$$

Donde “ y_i ” es el valor conocido, “ \hat{y}_i ” es el valor predicho por el modelo de calibración y “ n_c ” es el número de muestras del conjunto de entrenamiento de la calibración (Rodríguez, 2014).

b. Error estándar de validación cruzada (SEV)

Es el error que se genera al validar el modelo con predicciones de muestras diferentes a su conjunto de entrenamiento, informando sobre el ajuste entre los valores conocidos y los

estimados durante una validación cruzada. Por lo tanto, su valor suele ser mayor que el SEC brindando mayor confiabilidad del error que se obtendría en futuras predicciones considerando que se trata de una medida general. Suele usarse en la determinación del número óptimo de factores al ser correspondiente el valor de SEV más bajo (Infometrix, 2014; Kocaoglu *et al.*, 2009). Su cálculo se realiza respecto a la variable dependiente “y” con la siguiente ecuación:

$$SEV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^C (y_i - \hat{y}_{cv,i})^2}{n_c}}$$

Donde “ y_i ” es el valor conocido, “ $\hat{y}_{cv,i}$ ” es el valor predicho por validación cruzada y “ n_c ” es el número de muestras del conjunto de entrenamiento de la calibración (Rodríguez, 2014).

c. Coeficiente de correlación de calibración (Rcal) y de validación (Rval)

El Rcal es la correlación entre los valores predichos por la regresión y los valores conocidos por el modelo respecto a la variable dependiente “y”, su valor debe ser lo más próximo a “1” (Llano, 2016; Infometrix, 2014). El Rval indica sobre el modelo de regresión cuánta variación del segmento usado en la validación cruzada puede ser explicada, la calificación de la calibración es de “excelente” para $Rval > 0.90$ y “buena” para $0.89 > Rval > 0.70$ (Llano, 2016).

La mejor calidad del modelo se obtiene a valores más bajos de los errores de calibración y validación (SEC y SEV) junto con valores más altos de los coeficientes de correlación de calibración y de validación (Rcal y Rval) (Llano, 2016) dichos valores corresponden al número óptimo de factores (componentes principales) y la explicación es que a mayor cantidad de factores se mejora el modelamiento y se obtiene menor error hasta llegar al número óptimo, pasado dicha cantidad de factores el modelamiento procederá a explicar solamente ruido (Wold, 1978, citado por Porcel, 2002).

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se ejecutó en diversos ambientes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Específicamente en:

- Ambientes de la Facultad de Agronomía: en el Laboratorio de Semillas del Programa de Leguminosas se almacenaron la materia prima y las muestras.
- Ambientes de la Facultad de Industrias Alimentarias (FIAL): en el Laboratorio de Biotecnología se realizó la preparación de muestras, en el Laboratorio de Análisis Físico-químico de Alimentos y Laboratorio de Microbiología de Alimentos se realizó la extracción de alcaloides y en el Laboratorio de Investigación e Instrumentación se realizaron las lecturas con el cromatógrafo de gases y con el espectrómetro portátil.
- Ambiente de la UNALM: en los laboratorios del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular se almacenaron los extractos de alcaloides y se realizaron las lecturas con el espectrómetro de mesa.

3.2. MATERIA PRIMA

Se trabajó con granos de 49 ecotipos de tarwi (*Lupinus. mutabilis Sweet*) distribuidos en nueve regiones del Perú (La Libertad, Cusco, Áncash, Huánuco, Huancavelica, Puno, Cajamarca, Junín y Apurímac) proporcionados por el Programa de Leguminosas de la UNALM. En el Anexo 1 se presenta el nombre y la región de origen de cada ecotipo.

3.3. MATERIALES

- Pizeta
- Gradilla de laboratorio
- Sopor te metálico para pera de decantación

- Cuchara espátula de acero inoxidable
- Jeringas desechables, de 5 ml
- Micropipeta, de 500- 5000 uL (Transferpette®S BRAND)
- Micropipeta, de 100-1000 uL (Transferpette®S BRAND)
- Tips para micropipeta, de 1000 y 5000 ul (Transferpette®S BRAND)
- Vasos precipitados, de 100 y 250 ml (Boeco Germany)
- Fiolas, de 500 y 1000 ml (Boeco Germany)
- Frasco de vidrio con tapa, de 1000 ml (Boeco Germany)
- Tubos Falcon de polipropileno, de 15 y 50 ml (Corning Science)
- Pera de decantación, de 500 ml (Boeco Germany)
- Balón para evaporación fondo plano, de 250 ml modelo NS 29/32 (Boeco Germany)
- Filtros de jeringa de politetrafluoroetileno, de poro 0.45 um de diámetro 13 mm (Bulk Acrodisc ® de PALL)
- Viales de cromatografía, de 1.5 mL, 11.6x32 mm (ISOLAB Laborgerate GmbH)
- Tapa rosca de polipropileno de 9 mm con septa de PTFE/silicona de 6 mm (ISOLAB Laborgerate GmbH)
- Caja de almacenamiento de viales modelo T33-64 (Simport)
- Parafilm en cinta 4 in x 250 ft. (Laboratory Supplier)

3.4. EQUIPOS

- Molino de laboratorio tipo martillo, modelo LM3100 (Perten Instruments)
- Balanza analítica, de 252 g modelo HR-250AZ (AND de A&D Company Limited)
- Balanza de precisión, de 1600 g modelo PA1602 (Ohaus)
- Estufa de laboratorio (Venticell ® de MMM)
- Campana extractora
- Limpiador ultrasónico modelo UCS-05 (Lab Companion)
- Evaporador de solvente (Behr Labor Technik)
- Centrífuga refrigerada (Heal Force, China)
- Agitador magnético (Velp Científica)
- Columna capilar Agilent DB-1 (30 m x 0.4 mm d.i.)
- Cromatógrafo de gases con detector FID modelo 7890A (Agilent Technologies)
(Anexo 2)

- Espectrómetro de Infrarrojo con transformación de Fourier portátil modelo Tru Defender FT (Aura Scientific de Thermo Fisher Scientific) (Anexo 3)
- Espectrómetro de Infrarrojo con transformación de Fourier de mesa modelo UATR Two (Perkin Elmer) (Anexo 4)

3.5. REACTIVOS

- Ácido tricloroacético (EMSURE ®, Alemania)
- Hidróxido de sodio (EMSURE ®, Alemania)
- Diclorometano (MERCK KGaA, Alemania)
- Metanol (LICHROSOLV ®)
- Metanol HPLC (J.T. Baker ®, USA)
- Estándar perclorato de lupanina (Toronto Research Chemicals) y esparteína. (Chromadex. Inc.)
- Gas portador helio (Agilent Technologies)
- Gas de hidrógeno (Agilent Technologies)
- Gas de aire (Agilent Technologies)

3.6. SOFTWARES

- Varian Resolutions Pro (Versión 4.0)
- Modelado Quimiométrico Integral Pirouette ® (Infometrix) (Versión 4.0) Modelo quimiométrico SIMCA y PLS (ver en Anexo 5 el instructivo de obtención de los espectros que se cargaran en el programa Pirouette, ver en los Anexos 6 y 7 el manejo del programa para el modelo SIMCA y en el Anexo 8 para el modelo PLS).

3.7. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.7.1. Preparación de la muestra de tarwi amargo

Se preparó tomando 100 gramos (g) de cada ecotipo de tarwi (*Lupinus mutabilis S.*) que en su estado natural es el grano amargo. Fueron transformados en harina de acuerdo al procedimiento que se muestra en la Figura 7, así la muestra es la harina del grano amargo.

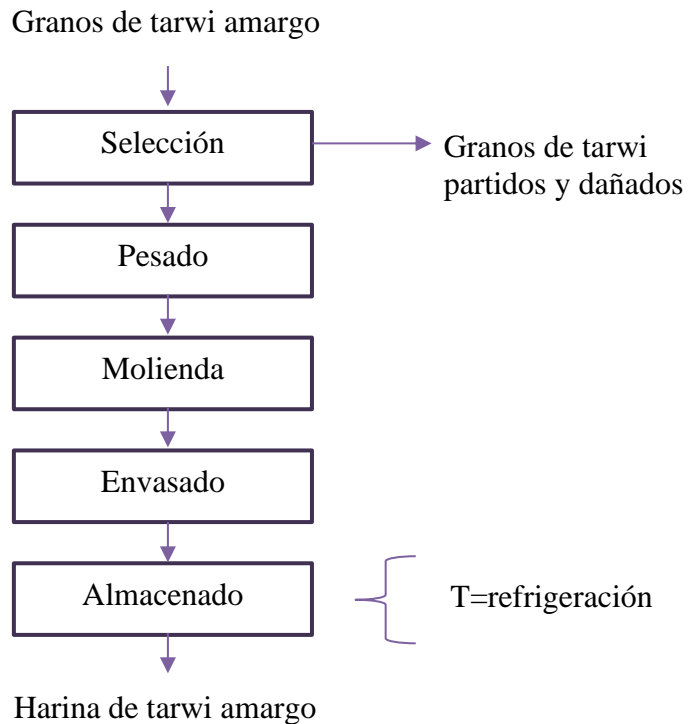


Figura 7: Diagrama de flujo de preparación de muestra de tarwi amargo

Descripción de operaciones unitarias de la Figura 7:

- Selección: Se seleccionaron los granos que se encontraban enteros y en buen estado, se eliminaron los granos dañados y las materias extrañas.
- Pesado: Se pesó 100 g de los granos seleccionados de tarwi.
- Molienda: Se molieron los granos con un molino de tipo martillo con rotor giratorio.
- Envasado: La harina se envasó en bolsas de polietileno de alta densidad selladas al calor y debidamente rotuladas.
- Almacenado: Se almacenaron las muestras a temperatura de refrigeración (2 – 6°C).

3.7.2. Preparación de la muestra de tarwi desamargado

Se preparó tomando 100 g de cada ecotipo de tarwi (*Lupinus mutabilis* S.), dicha cantidad fue sometida a un proceso de desamargado acuoso y posterior transformación del grano

desamargado en harina de acuerdo al procedimiento que se muestra en la Figura 8 según el método de Jacobsen y Mujica (2006), así la muestra es la harina del grano desamargado.

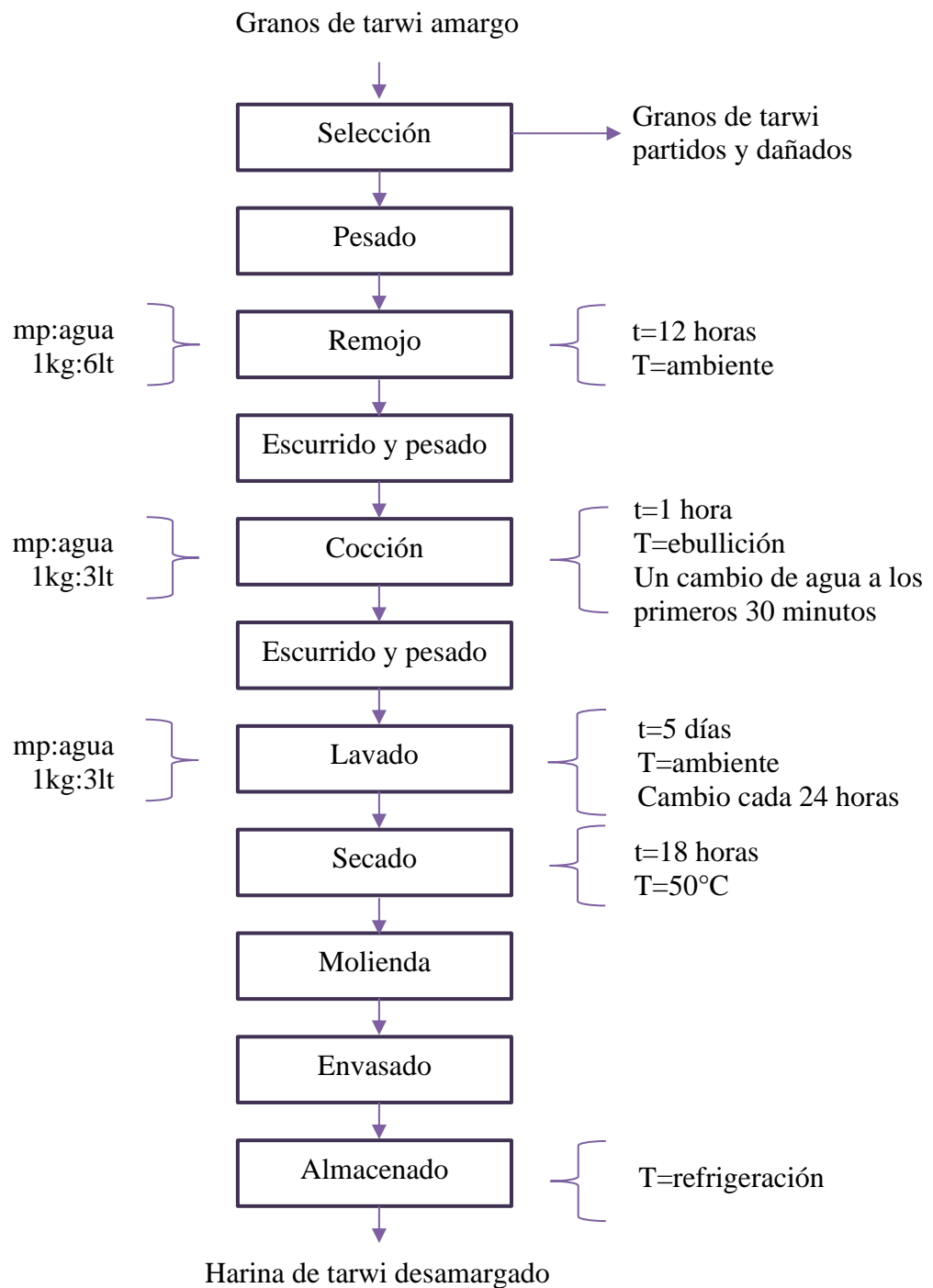


Figura 8: Diagrama de flujo de preparación de la muestra de tarwi desamargado por método acuoso, adaptado de Jacobsen y Mujica (2006)

Descripción de operaciones unitarias de la Figura 8:

- Selección: Se seleccionaron los granos que se encontraban enteros y en buen estado, se eliminaron los granos dañados y las materias extrañas.
- Pesado: Se pesó la materia prima (mp) y se midió el agua de acuerdo a la proporción mp:agua de 1kg:6lt, es decir, 100 g de los granos de tarwi y 600 ml de agua.
- Remojo: Se colocó en un recipiente los granos de tarwi y el agua ya medidos, se dejó el recipiente mediadamente cerrado, en sombra, a temperatura ambiente por 12 horas.
- Ecurrido y pesado: Se escurrió con un colador, se pesaron los granos de tarwi hidratados y escurridos y se midió el volumen de agua limpia (mp:agua de 1 kg:3 lt).
- Cocción: Se cocinaron los granos de tarwi en agua a temperatura de ebullición y en constante agitación. Transcurrido los primeros 30 minutos se procedió a realizar un cambio de agua, para ello se volvió a pesar los granos de tarwi y a medir agua limpia de acuerdo a la proporción mp:agua de 1kg:3lt, se continuó la cocción por 30 minutos más para completar 1 hora de cocción.
- Ecurrido y pesado: Se escurrió con un colador, se pesaron los granos de tarwi hidratados y se midió el agua limpia de acuerdo a la proporción mp:agua de 1kg:3lt.
- Lavado: Se colocó en un recipiente limpio los granos de tarwi y el agua previamente medidos, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 días. Se realizaron cambios de agua cada 24 horas cumpliendo en cada cambio con la proporción mp:agua de 1kg:3lt.
- Secado: los granos de tarwi fueron secados en una estufa a 50°C durante 18 horas.
- Terminado el secado se obtuvo como producto granos de tarwi desamargados, los cuales se prepararon en forma de harina con la misma descripción de operaciones de la Figura 7.

En los Anexos 9, 10, 11, 12 y 13 se muestran las fotos tomadas de algunas operaciones del método de desamargado acuoso que se realizó con materiales caseros para la obtención de muestras de tarwi desamargado y en el Anexo 14 se muestra la foto de algunas muestras envasadas de las harinas de tarwi amargo y desamargado de acuerdo a la metodología descrita en la presente investigación.

3.7.3. Análisis del contenido de alcaloides del tarwi por GC-FID

El análisis cuantitativo de los 49 ecotipos de tarwi (*L. mutabilis Sweet*) se realizó en dos etapas:

- La primera etapa fue la determinación cuantitativa de los alcaloides, para ello se procedió con la extracción química de los alcaloides de los granos de tarwi y la cuantificación de los extractos de alcaloides por lectura en GC-FID.
- La segunda etapa fue la exploración de los valores cuantitativos de los alcaloides, para ello se procedió con el análisis del contenido de alcaloides totales y de alcaloides residuales.

a. Determinación cuantitativa de alcaloides

a.1. Extracción de alcaloides

Se usó las muestras de tarwi amargo y desamargado obtenidas del procedimiento de las Figuras 7 y 8 respectivamente. La extracción de alcaloides quinolizidínicos se realizó por triplicado en cada muestra lo que dió un total de 294 extracciones. Se aplicó la técnica de Muzquiz *et al.* (1993) con el siguiente procedimiento:

- Se pesó en tubo falcon de 15 ml la muestra de tarwi la cual fue de 0.134 gramos en el caso de los amargos y de 1 gramo para los desamargados.
- Se le agregó 5 mL de ácido tricloroacético al 5%, se agitó, se sonicó a 26 grados Celsius (°C) por 5 minutos, se centrifugó la mezcla por 15 minutos a 5000 revoluciones por minuto (r.p.m.) y a 4 °C.

- Se separó el sobrenadante en un tubo falcon de 50 ml, el mismo procedimiento desde la adición de ácido tricloroacético se realizó dos veces más sobre el precipitado separando los sobrenadantes en el mismo tubo.
- A la recuperación de los tres sobrenadantes se le adicionó 1mL de NaOH 10M para lograr su neutralización.
- Se pasó esta mezcla a una pera de decantación y se le adicionó 5mL de diclorometano, se manipuló la pera de decantación con movimientos suaves y repetidos hacia un lado y otro para mezclar los componentes, esto se realizó dentro de una campana extractora a temperatura ambiente y con la pera de decantación destapada para la fácil salida de los gases producidos, se la colocó en un soporte metálico para la separación de dos fases, se decantó la fase inferior que corresponde a la fase de diclorometano (transparente) en un balón limpio y se dejó en la pera la fase superior que es la perteneciente a la del ácido tricloroacético (color amarillento), este procedimiento de lavado con diclorometano se realizó dos veces más sobre la fase amarillenta recibiendo el decantado en el mismo balón.
- La recuperación de las tres fases de diclorometano fue evaporada hasta la sequedad a 25°C.
- Se adicionó 1mL de metanol para disolver los restos de la evaporación, se realizó suaves movimientos giratorios al balón para que el metanol tuviera contacto con sus paredes y se filtró con filtro de jeringa, se recuperó el filtrado en un vial para GC siendo este el extracto de alcaloides.

Los extractos de alcaloides de las muestras de tarwi (amargo y desamargado) fueron almacenados en congelación a una temperatura de -18°C para conservar su contenido y volumen hasta el momento de su uso.

En los Anexos 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 se muestran las fotos tomadas de algunas operaciones de la extracción química de alcaloides por método Muzquiz *et al.* (1993) de acuerdo a la metodología descrita en la presente investigación.

a.2. Cuantificación de alcaloides por lectura en GC-FID

La cuantificación de alcaloides quinolizidínicos se realizó por GC-FID de acuerdo a la técnica de Muzquiz *et al.* (1993). Se usó un equipo de GC del sistema Agilent 7890A acoplada con detector FID y equipado con una columna capilar Agilent DB-1 (30 m x 0.4 mm d.i.). En el Anexo 2 se presenta la foto de dicho equipo y en el Anexo 22 se presenta la foto de un cromatograma generado por la lectura de un extracto de alcaloides.

Se trabajó con la versión del controlador software 4.02(031), se programó el análisis de alcaloides con parámetros de, horno a temperatura de 150°C a 235°C con 5°C por minuto y permaneciendo por 15 minutos, inyector a temperatura de 240°C presión de 26.58 psi flujo de 24.89 mL/min y flujo de purga del tabique de 3.0 mL/min, detector a temperatura de 260°C flujo de combustible de 30.0 mL/min flujo de utilidad de 300.0 mL/min flujo de reposición de 8.626 mL/min y valor de la señal de 11.5 pA; se programó la limpieza del inyector con tres tomas de metanol HPLC previo a la toma del extracto para el retiro de impurezas o de residuos de muestras anteriores, el tiempo de operación del GC-FID por cada extracto fue de aproximadamente 32 minutos.

a.2.1. Construcción de curva de calibración de lupanina y esparteína

Se usaron dos estándares de alcaloides: perclorato de lupanina y esparteína, a partir de los cuales se prepararon patrones (alcaloide diluido en metanol HPLC) en viales para GC cuya unidad de cuantificación fue miligramos de alcaloide por mililitro de metanol (mg/ml).

La presentación de la lupanina TRC fue de 25 miligramos de perclorato de lupanina, cuya fórmula molecular es $C_{15}H_{25}ClN_2O_5$, de la cual la correspondiente a la lupanina es $C_{15}H_{24}N_2O$ y al perclorato es $HClO_4$, siendo los pesos moleculares 348.82 g/mol, 248.36 g/mol y 100.46 g/mol respectivamente, por lo tanto, de los 25 mg de perclorato de lupanina, 17.8 mg fueron de lupanina, de acuerdo a esta relación se prepararon el Stock y los patrones P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆ y P₇ (Anexo 23) para la construcción de la curva de calibración de la lupanina. Se construyó dos curvas de calibración de lupanina, una para bajas concentraciones (Anexo 25) con los patrones detallados en el Anexo 24 y que se usó para la cuantificación de granos desamargados, y otra para altas concentraciones (Anexo 27) con los patrones detallados en el Anexo 26 que se usó para la cuantificación de granos amargos, se tomó de

referencia el trabajo de Boschini *et al.* (2008) donde obtuvo para el estándar lupanina una respuesta lineal entre el área bajo la curva y concentración entre los valores 0.1 – 0.9 mg/g usando cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS).

La presentación de la esparteína Chromadex. Inc fue de 1 gramo, cuya fórmula molecular es $C_{15}H_{26}N_2$ con peso molecular de 234.38 g/mol, con ella se prepararon el Stock y los patrones P_{1-a}, P_{1-b}, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇ y P₈ (Anexo 28) para la construcción de la curva de calibración de la esparteína (Anexo 30) con los patrones detallados en el Anexo 29, se tomó de referencia el trabajo de Erbas (2010) quien obtuvo una respuesta lineal para la estándar esparteína en metanol entre los valores 0.0000091 g/l – 0.091 g/l usando GC-FID.

Se identificó el tiempo de retención (TR) de la lupanina y la esparteína, el cual fue el tiempo correspondiente a la formación del pico más pronunciado. Se calculó el coeficiente de variación (CV) para cada TR para evaluar su reproducibilidad. Se calculó la ecuación de la curva de calibración “ $y = mx + b$ ”, donde “ y ” es correspondiente al área bajo la curva al TR del alcaloide (respuesta del GC-FID) y “ x ” es correspondiente a la concentración de los patrones (valor conocido).

a.2.2. Determinación de límite de detección y de cuantificación de alcaloides

Se determinaron el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOC) de la lupanina y esparteína a partir de las ecuaciones planteadas en el trabajo de Taverniers *et al.* (2004), usando los valores del área bajo la curva como valor de la señal:

Ecuación de la señal del límite de detección:

$$S_{LOD} = S_{blanco} + 3S_{ruido}$$

Ecuación de la señal del límite de cuantificación:

$$S_{LOC} = S_{blanco} + 10S_{ruido}$$

Donde “ S_{blanco} ” es la señal del blanco al tiempo de retención del estándar y el “ S_{ruido} ” es la señal del ruido del resto de los picos excepto al tiempo de retención del estándar. Los

valores de LOD y LOC se obtuvieron en concentración de lupanina y esparteína en metanol (mg/ml) sustituyendo el “ S_{LOD} ” y “ S_{LOC} ” en la variable “ y ” de la ecuación de la curva de calibración correspondiente a cada estándar.

a.2.3. Cuantificación de alcaloides de la muestra de tarwi

Se determinó el contenido de lupanina y esparteína a partir de sus respectivas ecuaciones de la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde “ x ” es la concentración del alcaloide (valor desconocido), “ m ” es la pendiente (valor conocido), “ b ” el intercepto (valor conocido) y “ y ” es el área bajo la curva al TR del alcaloide (respuesta del GC-FID).

Se reportó el promedio de las repeticiones de: g del alcaloide / 100 g harina de tarwi (% en base seca (b.s.)). El cálculo de base seca se realizó tomando los valores de humedad obtenidos en el trabajo de investigación de Sabelino (2020) donde usó las mismas muestras de los 49 ecotipos. Los resultados se describen como:

- Determinación cuantitativa del contenido de alcaloides totales en granos amargos.
- Determinación cuantitativa del contenido de alcaloides residuales en granos desamargados.

Los valores cuantitativos se presentaron usando las medidas estadísticas: promedio, desviación estándar, desviación relativa de la media y coeficiente de variabilidad.

b. Exploración de los valores cuantitativos de los alcaloides

b.1. Análisis del contenido de alcaloides totales en tarwi amargo

Se basó en la evaluación de la biodiversidad de los 49 ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) amargos mediante:

- Agrupación de ecotipos por su contenido similar de alcaloides totales.
- Comparación entre regiones por el contenido de alcaloides totales de sus ecotipos.

Para ello, se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas: prueba de normalidad “Shapiro Wilk”, prueba de homogeneidad de varianzas “Bartlett”, análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación múltiple “Tukey”.

b.2. Análisis del contenido de alcaloides residuales en tarwi desamargado

Se basó en la evaluación del nivel de desamargado que se logró mediante el proceso de desamargado acuoso de los 49 ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) desamargado mediante:

- Identificación de contenidos inocuos de alcaloides residuales.
- Determinación de la pérdida de alcaloides.

3.7.4. Análisis quimiométricos de los espectros FT-MIR del tarwi amargo y desamargado

Se usaron los espectros FT-MIR para el análisis quimiométrico multivariado por método SIMCA con el cual se evaluó la clasificación cualitativa de muestras de tarwi amargo y desamargado, y por método PLS con el cual se evaluó la calibración cuantitativa del contenido de alcaloides de tarwi. Ambos algoritmos se ejecutaron a través del Modelado Quimiométrico Integral Pirouette® (Infometrix). Se usaron las muestras de tarwi obtenidas de los procedimientos de las Figuras 7 y 8 y se usaron dos tipos de espectrómetros: portátil (rango de 4002.489 – 648.897 cm^{-1} , resolución de 2.87 cm^{-1}) y de mesa (rango de 4000 – 450 cm^{-1} , resolución de 1 cm^{-1}).

a. Obtención de espectros FT-MIR

Se realizó lectura de los espectros de las soluciones stock de los estándares de lupanina y esparteína y de las muestras (harina del grano de tarwi amargo y desamargado) por

duplicado. En el Anexo 5 se presenta el procedimiento de obtención de los espectros con el espectrómetro portátil y con el de mesa.

Se guardó cada archivo de los espectros y posteriormente se los convirtió a “spc.” con el programa Varian Resolutions Pro (Versión 4.0) para que fueran compatibles al programa quimiométrico. Las lecturas de los espectros en espectrómetro portátil y de mesa se realizaron a 8 y 16 scan respectivamente. El número de scan o barridos lo escoge el usuario y se introduce en el programa; como referencia Quintero *et al.* (2016) obtuvo un valor de 15 scan acumulados como valor óptimo para la determinación de fosfatos con espectroscópica FT-MIR con resultados que indicaron que el número de barridos por encima y por debajo de este valor generan una pequeña pérdida de la señal.

Los espectrómetros FT-MIR construyeron los espectros bajo un gráfico donde el eje de las ordenadas fue el correspondiente a la absorbancia y el eje de las abscisas al número de onda (cm^{-1}), cuya lectura se basa en la identificación de las moléculas por la zona del infrarrojo donde se observa su absorción y en la determinación de la cantidad de dichas moléculas por la intensidad del pico de absorción.

b. Clasificación por modelo independiente suave de analogía de clases (SIMCA)

La clasificación de los ecotipos del tarwi (*Lupinus mutabilis* S.) se realizó con el fin de discriminar dos grupos: granos amargos caracterizados por su alto contenido de alcaloides, y granos desamargados caracterizados por su bajo contenido de alcaloides (al nivel seguro de consumo el cual corresponde a un máximo de 0.07 % (b.s.) de alcaloides residuales según la NTP (2018) 205.090. Para dicho análisis se usaron los espectros obtenidos de acuerdo al ítem 3.7.4.1.

b.1. Análisis de las bandas de absorción de los estándares de alcaloides

Se identificaron en los espectros de los estándares de lupanina y esparteína, obtenidos de acuerdo a lo descrito en el ítem 3.7.4.1, las zonas del infrarrojo donde se formaron las bandas de absorción para ser consideradas como las zonas características de respuesta de los alcaloides.

b.2. Análisis de las zonas del infrarrojo de los espectros del tarwi

Se identificaron en los espectros de las muestras de tarwi las zonas de formación de bandas de absorción de los alcaloides de acuerdo a lo obtenido en el ítem 3.7.4.2.A con el fin de enfocar la discriminación sobre el nivel de contenido de alcaloides como referencia para aumentar la eficiencia en la respuesta de clasificación entre granos amargos y desamargados.

b.3. Análisis de clasificación por el algoritmo SIMCA del programa Pirouette

En el algoritmo SIMCA los números de onda del espectro son las “variables” y la absorbancia de las muestras son los “datos” para la construcción de un “Full data” que será el conjunto de entrenamiento para el análisis quimiométrico multivariado. En el Anexo 6 se presenta el procedimiento para la ejecución del algoritmo de clasificación por SIMCA con el programa Pirouette. El tiempo de ejecución fue entre 2 a 5 segundos. Luego se procedió con la evaluación de la eficiencia en la respuesta de clasificación: proyecciones de clase, separación entre clases, distancia entre clases, residuales entre clases, poder discriminatorio, poder de modelado total, clase predicha y clasificación incorrecta. En base a dichos resultados se procedió con pruebas de ajustes para optimizar el modelo: modificación en la selección de las variables, análisis de eliminación de muestras outliers y evaluación de las mejores opciones de procesamiento del algoritmo. El objetivo fue ofrecer la mejor selección de información (data de muestras y variables) y las mejores herramientas (opciones de procesamiento) en favor de la calidad del modelo.

Las opciones de procesamiento del método optimizado del algoritmo “SIMCA” fueron: Segunda derivada y Suavizamiento como transformaciones, Centro-medio como Pre-procesamiento, 15 como máximo número de factores, opción local en alcance y 0.95 de umbral de probabilidad.

b.4. Análisis de predicción de la clasificación por el algoritmo SIMCA del programa Pirouette

Se evaluó la eficiencia de la respuesta de clasificación del método SIMCA mediante la predicción de las clases de las muestras incógnitas. La predicción en SIMCA requiere un modelo y un objeto (conjunto de datos de las muestras incógnitas) el cual no se haya usado

para la construcción del modelo de clasificación. Se usaron como muestras incógnitas 5 ecotipos para muestras amargas y 5 ecotipos para muestras desamargadas con inclusión de muestras con contenido de alcaloides residuales superior al límite permitido para la comercialización en Perú. Se tomaron por duplicado sus espectros para obtener 20 espectros incógnitos, de los cuales 10 serían provenientes de muestras amargas y 10 de muestras desamargadas. En el Anexo 7 se presenta el procedimiento para la ejecución del algoritmo de predicción de la clasificación por SIMCA con el programa Pirouette.

Los resultados de la predicción indican: ubicación en la proyección de clases, ubicación en los cuadrantes de la separación entre clases, clase predicha y clasificación incorrecta. Como parte de la evaluación se calculó el porcentaje de acierto obtenido de la clase predicha y la eficiencia en la respuesta de predicción en base a la sensibilidad y selectividad obtenido de la clasificación incorrecta.

c. Método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La calibración se realizó usando las mismas variables seleccionadas en el análisis de clasificación (SIMCA) de acuerdo a los descrito en los ítems 3.7.4.2.A y 3.7.4.2.B. En el Anexo 8 se presenta el procedimiento para la ejecución del algoritmo de calibración por PLS con el programa Pirouette.

El tiempo de ejecución fue entre 2 a 5 segundos. Luego se procedió con la evaluación de la respuesta de calibración con: valores del SEC, SEV, Rcal, Rval, número de factores óptimos, regresión y vector de regresión. En base a dichos resultados se procedió con la optimización del modelo de la misma manera como se explicó para el método SIMCA.

Las opciones de procesamiento del método optimizado del algoritmo “PLS” fueron: Segunda derivada y Suavizamiento como transformaciones, 10 como máximo número de factores y validación cruzada como método de validación.

En la Tabla 8 se presenta la secuencia operacional de las etapas experimentales ya detalladas.

Tabla 8: Diseño experimental

ETAPA		Muestras de tarwi	Operaciones previas	Determinación de alcaloides	Evaluaciones Comparativas
PROCEDIMIENTO	CUANTITATIVO	Preparación de las muestras de tarwi amargo y desamargado de los 49 ecotipos según Figura 7 y 8	Extracción de alcaloides de las muestras	Cuantificación por GC-FID de alcaloides totales de las muestras de tarwi amargo y alcaloides residuales del tarwi desamargado	1) Explorar el contenido de alcaloides totales y residuales de los 49 ecotipos de tarwi (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>)
	CUALITATIVO			Obtención de espectros FT-MIR de las muestras con espectrómetro portátil, clasificación (SIMCA) y calibración (PLS) multivariada	
PARÁMETROS		- Bolsas de polietileno de alta densidad. - Método de desamargado acuoso estándar para todas las muestras.	Extracción química: - Temperatura y tiempo de sonicación. - Velocidad y temperatura de centrifuga. - Temperatura de Evaporación.	GC-FID: - Temperatura de trabajo. - Columna e inyector. - Fase móvil. FT-MIR: - 8 scan en equipo portátil. - 16 scan en equipo de mesa.	FT-MIR; SIMCA; PLS: - Cantidad de muestras. - Selección de variables. - Tipo de transformación y pre-procesamiento de espectros.
VARIABLES		- Humedad. - Grado de amargor del grano.	Extracción química: - Dilución de alcaloide en metanol.	GC-FID: - [] lupanina y esparteína. FT-MIR: - Absorbancia en el rango infrarrojo medio.	En (1): - Porcentaje de alcaloides totales y alcaloides residuales. En (2): - Distancia entre grupos de categorías.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES DEL TARWI POR GC-FID

Se determinó el contenido de alcaloides totales y residuales de tarwi en base al contenido de lupanina y esparteína obtenido de la extracción química y lectura en GC-FID de acuerdo al método Muzquiz *et al.* (1993). Para cuantificar en GC-FID con respuestas provocadas por los alcaloides se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOC) para la lupanina y la esparteína (Anexo 31) los cuales corresponden a la concentración más pequeña del analito que pudiera generar una señal con un nivel de confianza establecido y a la concentración más pequeña del analito que pudiera ser cuantificada con un nivel de confianza establecido según la IUPAC respectivamente (Currie, 1995; Boqué, 2004).

Para lupanina se obtuvo un LOD de 0.0892 mg/ml y un LOC de 0.1234 mg/ml, es así que para la lupanina se consideran confiables las lecturas de los patrones P₃, P₄, P₅ y P₆ del Anexo 23 y cuantificación a partir de una respuesta de área de 15.4. Los valores de LOD y LOC resultaron ser mayores a los reportados por Lee *et al.* (2019) y Boschín *et al.* (2008) en sus estudios con estándar lupanina. Lee *et al.* (2019) obtuvo al trabajar con GC-FID un LOD de 0.820 µg/ml (0.00082 mg/ml) y un LOC de 2.460 µg/ml (0.00246 mg/ml) e indica que estos valores sugieren una buena sensibilidad para detectar la baja concentración del alcaloide. Boschín *et al.* (2008) obtuvo al trabajar con GC-MS un LOD de 2 mg/l (0.002 mg/ml) y LOC de 3 mg/l (0.003 mg/ml), valores más altos que los obtenidos por Lee *et al.* (2019).

Para esparteína se obtuvo un LOD de 0.0637 mg/ml y un LOC de 0.0674 mg/ml, es así que para la esparteína se consideran confiables las lecturas de los patrones P_{1-a}, P_{1-b}, P₂, P₃, P₄, P₅ y P₆ del Anexo 28 y cuantificación a partir de una respuesta de área de 20.5. Los valores de LOD y LOC resultaron ser mayores a los reportados por Lee *et al.* (2019) y Boschín *et al.* (2008) en sus estudios con estándar esparteína. Lee *et al.* (2019) obtuvo un LOD de 1.054 µg/ml (0.001054 mg/ml) y un LOC de 3.161 µg/ml (0.003161 mg/ml).

Boschin *et al.* (2008) obtuvo un LOD de 1 mg/l (0.001 mg/ml) y LOC de 3 mg/l (0.003 mg/ml), valores muy cercanos a los reportados por Lee *et al.* (2019).

Por lo tanto, la técnica de GC-FID presentó menos sensibilidad a bajas concentraciones de alcaloides en comparación a lo reportado en la literatura. Acerca de la detección de pequeñas concentraciones de analitos Van *et al.* (2009) indica que parte del ruido en GC-FID es la señal que se produce nivel molecular por la formación de pares de iones en la llama del detector, que la mayor parte del ruido es aleatorio y que en general no puede reducirse.

En el Anexo 31 se presenta el TR y su indicador de reproducibilidad para ambos alcaloides, se obtuvo un TR promedio de 14.4 minutos (min) y 8.2 min para lupanina y esparteína respectivamente. Según Stashenko y Martínez (2010) el TR es característico para un analito si se usa un determinado tipo de columna, si la velocidad del gas de arraste es constante en la columna y si se mantienen las condiciones cromatográficas. Se obtuvo un CV de 0.04 % para el TR de lupanina y de 0.57 % para el de esparteína indicando buena reproducibilidad, según Smith (2010) un valor de CV menor al 5 % es aceptable para un adecuado nivel de precisión. Qian *et al.* (2010) menciona que los TR son reproducibles y precisos por lo que pueden usarse para análisis cuantitativos y cualitativos. Se obtuvo que el tiempo del recorrido en la columna y por ende del proceso de elución de la esparteína (8.2 min) fue menor que el de la lupanina (14.4 min) esto coincide con lo reportado por Ortega *et al.* (2010) quien obtuvo un TR menor para esparteína con 14.9 que para la lupanina con 30.1 min.

4.1.1. Análisis del contenido de alcaloides totales en tarwi amargo

Se determinó los alcaloides totales como la suma del contenido de lupanina y esparteína como los dos alcaloides mayoritarios en la especie *L. mutabilis* según reporta la literatura. Wink (1993) citado por Huamán y Choccare (2017) afirma que los alcaloides principales del *lupinus* silvestre son la lupanina y la esparteína y en su propio estudio de Huamán y Choccare (2017) considera que la lupanina es el 60% del total de alcaloides. Ortega *et al.* (2010) concluye para *L. mutabilis* que los alcaloides con mayor presencia en orden decreciente son la lupanina, la esparteína y la 1,3-hidroxilupanina. Cortés (2020) obtiene que la lupanina es el alcaloide más abundante en *L. mutabilis* Sweet seguido de la esparteína, Gross *et al.* (1988) reporta para cepas de bajo contenido de alcaloides denominadas como variedad dulce de *L. mutabilis* de Chile un contenido de lupanina de más del 80% de alcaloides totales.

a. **Determinación cuantitativa del contenido de alcaloides totales**

En la Tabla 9 se presenta el resumen de los contenidos de la lupanina, esparteína y alcaloides totales obtenido para los granos amargos de los 49 ecotipos de tarwi (*L. mutabilis Sweet*). Se obtuvo en promedio un contenido de lupanina de 3.400 % (b.s.) y de esparteína de 0.214 % (b.s.), estos resultados confirman al igual que la literatura que la lupanina se encuentra en mayor cantidad que la esparteína.

El promedio del contenido de alcaloides totales obtenido fue de 3.614 % (b.s.), valor que se encuentra por encima pero relativamente cercano a lo reportado por los siguientes autores: para *L. mutabilis* cultivadas en Perú Hatzold *et al.* (1983b) reporta un contenido total de 3.095 % en materia seca para una muestra mixta de semillas, Schoeneberger *et al.* (1982) reporta un promedio de 3.30 % en materia seca usando 25 muestras de semillas crudas de *L. mutabilis*. El promedio de alcaloides obtenido en la presente investigación se realizó a partir de 49 ecotipos, el cual constituye una mayor cantidad de muestras que las utilizadas en los estudios anteriormente mencionados, lo que indica la existencia de mayor variedad en cuanto a contenido de alcaloides. Sin embargo el valor obtenido coincide con lo reportado por Carvajal *et al.* (2013) en su estudio de *L. mutabilis Sweet* cultivados en Ecuador donde obtiene un promedio de 3.60 g/ 100 g (b.s.) y por lo reportado por Villacreses (2011) quien obtuvo para granos amargos de *L. mutabilis Sweet* de Ecuador un promedio de 3.60 %.

En cuanto al contenido mínimo se obtuvo un 1.150 % (b.s.) valor muy por debajo de lo reportado por Cortés (2020) quien obtuvo valores desde 3.905 g/ 100 g (b.s.) y por encima a lo obtenido por Quispe (2015) que fue de 0.880 % (b.s.) ambos autores trabajando con 10 ecotipos de *L. mutabilis Sweet* cultivados en Perú, y se obtuvo un máximo de 6.529 % (b.s.), valor cercano pero por encima de lo reportado por Cortés quien obtuvo hasta 5.976 g/ 100 g (b.s.) y valor muy por encima a lo reportado por Quispe (2015) que fue de 2.98 % (b.s.). El rango obtenido en el presente estudio también es más amplio que los rangos reportados para diversas variedades de altramuces amargos, Trugo (2016) indica valores entre 1.0 a 4.5 g/ 100 g en su estudio de *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. mutabilis*, *L. consentinii* y *L. atlanticus*, Carvajal-Larenas (2015) menciona un valor mínimo para *L. albus* de 0.186 g/ 100 g (b.s.) y para *L. luteus* de 0.985 g/ 100 g (b.s.) y para *L. mutabilis* menciona un rango de 0.007 a 4.500 g/ 100 g (b.s.) entre sus variedades dulces y amargas citando a Gross *et al.* (1988), Hatzold *et al.* (1983), entre otros autores.

El contenido de lupanina que se obtuvo fue en promedio 3.400 % (b.s.), este valor fue más alto a lo obtenido por Hatzold *et al.* (1983b) quien reporta para lupanina 1.780 % (b.s.) usando un mix de *L. mutabilis Sweet* y fue cercano a lo obtenido por Cortés (2020) que fue de 3.848 % (b.s.) para 10 ecotipos de *L. mutabilis Sweet*. Se obtuvo un mínimo y máximo de 1.036 y 6.412 % (b.s.) respectivamente y un rango de 5.376 % (b.s.), este rango fue mucho más amplio pero incluyó el mínimo y máximo reportado por Cortés (2020) quien obtuvo un contenido de lupanina de 2.504 a 5.231 g/ 100 g (b.s.), dando un rango de 2.727 g/ 100 g (b.s.), los valores mínimo y máximo obtenidos fueron más altos a lo reportado por Carvajal-Larenas (2015) quien cita valores de 0.003 y 3.802 g/ 100 g (b.s.) respectivamente entre variedades dulces y amargas de *L. mutabilis*.

El contenido de esparteína que se obtuvo fue en promedio 0.214 % (b.s.), este valor fue cercano y ligeramente más bajo a lo obtenido por Hatzold *et al.* (1983b) quien reporta para esparteína 0.230 % (b.s.) para *L. mutabilis Sweet* y por lo mencionado por Ortega *et al.* (2010) que fue de 0.2673 g/ 100 g para *L. mutabilis* cultivado en Colombia. Se obtuvo un mínimo y máximo de 0.074 y 0.566 % (b.s.) respectivamente y un rango de 0.493 % (b.s.), este rango fue mucho menos amplio y con un mínimo y máximo más bajos que lo reportado por Cortés (2020) quien obtuvo un contenido de esparteína de 0.196 a 0.890 g/ 100 g (b.s.), dando un rango de 0.694 g/ 100 g (b.s.), los valores máximo y mínimo obtenidos estuvieron dentro de lo reportado por Carvajal-Larenas (2015) quien cita valores de 0.001 a 0.859 g/ 100 g (b.s.) respectivamente entre variedades dulces y amargas de *L. mutabilis*.

De modo comparativo, se puede observar que el contenido de lupanina y de esparteína obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro del rango reportado por la literatura, y la variabilidad en el contenido entre muestras es debido a que se analizó un tamaño de muestra más representativo (49 ecotipos en nueve regiones del Perú), así el territorio peruano cuenta con más ecotipos aún sin evaluar. Se debe considerar que lo obtenido son valores de referencia debido a que no todos se obtuvieron a partir de tres repeticiones como se puede observar en los Anexos 32 y 48. Esto debido al alto costo de uso del cromatógrafo de gases.

En la Tabla 9 se presentan los resultados del coeficiente de variabilidad (CV), que es la relación entre la desviación estándar y el promedio, con el fin de medir la dispersión relativa del contenido de alcaloides en el grupo de 49 ecotipos. Según Rustom *et al.* (2012) un CV alrededor del 20.0 % indica una población moderadamente homogénea mientras que un valor

superior al 50.0 % indica una población grandemente heterogénea, Ramos *et al.* (2000) interpreta para fenómenos naturales que no son controlados que un valor de CV mayor del 25.0 % significan datos muy heterogéneos. Se obtuvo un CV de 39.3 % en alcaloides totales, es decir, que la desviación estándar es 39.3 % tan grande como el promedio, y se obtuvo un CV de 40.9 y 49.8 % para lupanina y esparteína respectivamente lo que indica una menor dispersión de los valores de lupanina respecto a esparteína. Los valores de CV obtenidos fueron cercanos al 50.0 %, por lo tanto, se puede decir que la población de *Lupinus mutabilis Sweet* en cuanto a contenido de alcaloides tiene un comportamiento heterogéneo con alto nivel de variabilidad.

Tabla 9: Cuantificación del contenido lupanina, esparteína y alcaloides totales (%) en granos amargos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*)

	Contenido de lupanina (%) (b.s.)	Contenido de esparteína (%) (b.s.)	Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.)
Promedio	3.400	0.214	3.614
Valor mínimo	1.036	0.074	1.150
Valor máximo	6.412	0.566	6.529
Rango	5.376	0.493	5.379
Desviación estándar	1.393	0.107	1.419
Coefficiente de variabilidad (%)	40.986	49.784	39.258

La diversidad en el contenido de alcaloides se muestra en la Figura 9 donde se aprecia el mayor contenido de lupanina respecto al de esparteína. Se puede observar que el punto más alto es del A39 el cual corresponde al ecotipo con máximo contenido de alcaloides totales (6.529 % en b.s.) siendo también el ecotipo con máximo contenido de lupanina (6.412 % en b.s.) pero no de esparteína (0.117 % en b.s.), y se observa que el punto más bajo es del A37 el cual corresponde al ecotipo con mínimo contenido de alcaloides totales (1.150 % en b.s.)

siendo también el ecotipo con mínimo contenido de lupanina (1.036 % en b.s.) pero no de esparteína (0.114 % b.s.).

La mayor influencia de la lupanina sobre el contenido de alcaloides totales se puede apreciar en la similitud de dirección entre las líneas de tendencia de la lupanina y alcaloides totales, también se observa entre ecotipos que el contenido de esparteína no necesariamente es mayor ante un mayor contenido de lupanina lo que se puede apreciar con la disimilitud de dirección entre las líneas de tendencia de la lupanina y la esparteína siendo esta última casi horizontal. Por lo tanto, se puede evaluar la biodiversidad en el contenido de alcaloides asumiendo como alcaloides totales solo a la lupanina y esparteína, ya que los alcaloides minoritarios no deberían alterar significativamente el análisis.

En el Anexo 32 se presentan los resultados del contenido de lupanina y esparteína (% en b.s.) que se obtuvo para cada ecotipo y las medidas de precisión de las repeticiones que constaron en la desviación estándar (DE) y coeficiente de variabilidad (CV) para los promedios obtenidos de tres repeticiones, desviación relativa de la media (DRM) para los promedios obtenidos de 2 repeticiones. La decisión de precisión fue con un máximo permitido de 5.0 % para CV y de 2.0 % para DRM, límites que la teoría estadística considera (Smith, 2010; Herrera *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el contenido de alcaloides de los ecotipos que obtuvieron un índice de precisión por encima de los límites aceptables son considerados de baja precisión con dificultad para predecir su valor real; dado que se obtuvieron en su mayoría promedios con baja precisión los resultados obtenidos de alcaloides totales debe considerarse como valores referenciales.

Así, en el Anexo 32 se puede observar que los ecotipos con precisión aceptable para contenido de lupanina fueron: A2, A6, A8, A9, A13, A17, A19, A25, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A39, A47, A48 y A49 (19 ecotipos), y para contenido de esparteína fueron: A2, A10, A14, A17, A19, A20, A21, A23, A24, A28, A34, A37, A48 y A49 (14 ecotipos), para el resto de ecotipos su precisión es baja y será menos preciso cuanto mayor sea el valor de CV y DRM, de los cuales se obtuvo un máximo de 11.1 y de 12.9 % respectivamente para lupanina y de 12.9 y 16.6 % para esparteína, además se sumaron los porcentajes de CV y DRM de los 49 ecotipos para comparar la precisión en los valores de lupanina y esparteína, estos resultados indican menor precisión en la cuantificación del contenido de esparteína.

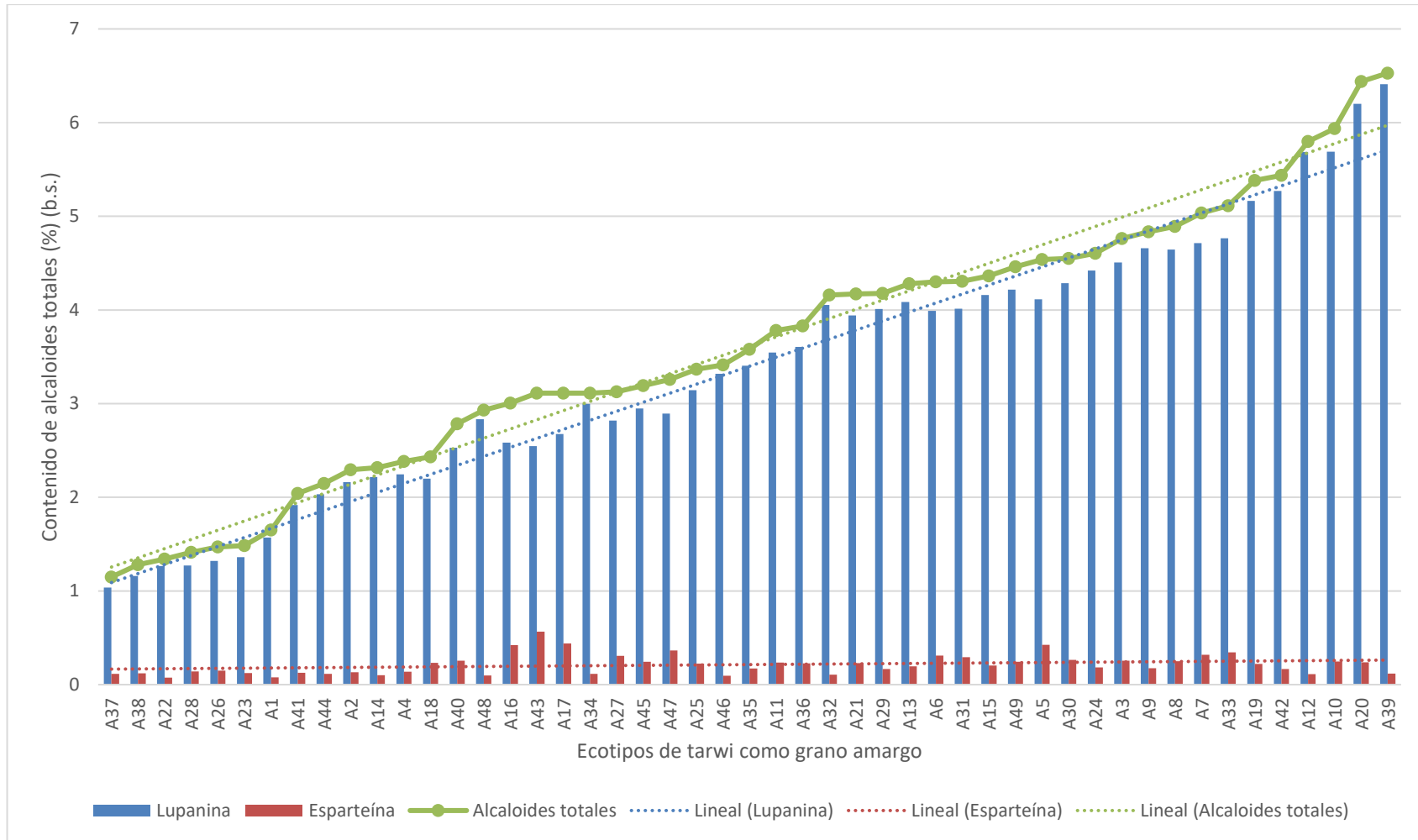


Figura 9: Cuantificación del contenido de los alcaloides lupanina, esparteína y alcaloides totales (%) de los granos amargos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)

Quispe (2015) calculó el CV para el contenido de alcaloides en los granos amargos de *Lupinus mutabilis* S. a partir de dos repeticiones calculados por el método de púrpura bromocresol que es cuantificación por espectrofotometría y obtuvo un mínimo y máximo de CV de 0.7 y 11.8 % respectivamente, es decir obtuvo una precisión cercana pero mejor a lo obtenido para alcaloides totales en la presente investigación con técnica de GC-FID, Cortés (2020) obtuvo un CV máximo para lupanina de 7.2 % y para esparteína de 3.8 % usando GC-FID, Erbas (2010) en su estudio de alcaloides de *L. albus* cultivado en Turquía aplicando GC-FID obtuvo un CV para esparteína de 38.8 % y para lupanina de 0.5 % como grano crudo y al analizar el grano durante el desamargado obtuvo un máximo de 46.7 %, y Muzquiz *et al.* (1993) obtuvo un CV máximo para lupanina en *L. albus Multolupa* de 16.2 % en la cuantificación por HPLC y de 5.0 % usando GC.

El ecotipo que presentó mayor contenido de lupanina con precisión aceptable fue el A39 con un DRM de 1.2 % (< 2.0 %), su contenido fue de 6.412 % (b.s.) el cual corresponde al valor máximo reportado en la Tabla 9. El ecotipo que presentó menor contenido de lupanina con precisión aceptable fue el A2 con un CV de 3.1 % (< 5.0 %), su contenido fue de 2.161 % (b.s.) y este sería un valor mínimo más confiable que lo reportado en la Tabla 9 y se acerca más a lo obtenido por Cortés (2020) (2.504 g/ 100 g en b.s.).

El ecotipo que presentó mayor contenido de esparteína con precisión aceptable fue el A17 con un DRM de 1.3 % (< 2.0 %), su contenido fue de 0.438 % (b.s.), este sería un valor máximo más confiable que lo reportado en la Tabla 9. El ecotipo que presentó menor contenido de esparteína con precisión aceptable fue el A48 con un CV de 4.8 % (< 5.0 %), su contenido fue de 0.098 % (b.s.), este sería un valor mínimo más confiable que lo reportado en la Tabla 9 y se acerca más a lo obtenido por Cortés (2020) (0.196 g/ 100 g en b.s.).

Se evaluó la normalidad del contenido de alcaloides totales en tarwi aplicando la prueba estadística de Shapiro Wilk (Anexo 33). Se concluyó que con un nivel de significancia (α) del 5 % se puede afirmar que los datos de alcaloides totales del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) provienen de una distribución normal ($\rho > \alpha$). En el Anexo 34 se presenta el histograma de los datos donde se puede observar un comportamiento gaussiano centrado a la media.

En cuanto a comparaciones de contenido de lupanina, esparteína y alcaloides totales % (b.s.), este último en Anexo 49, se tienen algunos trabajos con los mismos ecotipos de *L. mutabilis Sweet* cultivados en Perú los cuales se mencionan a continuación.

Para el ecotipo Compuesto blanco semiprecoz (E2) se obtuvo 2.294 % de alcaloides totales que fue cercano a 2.964 % (Quispe, 2015), para Cholo fuerte (E3) se obtuvo 4.506 % de lupanina que fue un valor mayor a 3.322 % (Cortés, 2020), para Andenes INIA (E4) se obtuvo 2.382 % de alcaloides totales que coincidió con 2.393 % (Quispe, 2015), para Pato grande (E6) se obtuvo 3.989 % de lupanina que fue cercano a 4.262 % (Cortés, 2020), para Cajamarca (E11) se obtuvo 3.545 % de lupanina que fue mayor pero cercano a 2.958 % (Cortés, 2020), para Moteado beige (E12) se obtuvo 5.686 % de lupanina que fue cercano a 5.231 % (Cortés, 2020), para H6 INIA (E14) se obtuvo 2.218 % de lupanina que fue menor a 3.354 % (Cortés, 2020), para Yunguyo (E16) se obtuvo 2.583 % de lupanina que fue mucho menor a 4.980 % (Yucra, 2021) y menor pero más cercano a 3.612 % (Cortés, 2020) y se obtuvo 3.004 % de alcaloides totales valor muy cercano a 2.982 % (Quispe, 2016), para Vicos (E40) se obtuvo 2.786 % de alcaloides totales que coincidió con 2.791 % (Quispe, 2015).

b. Agrupación de ecotipos por su contenido similar de alcaloides totales

Con el fin de evaluar la biodiversidad de los ecotipos por su contenido de alcaloides se formaron tres grupos tomando de referencia el análisis de Cortés (2020) quien describe como variedades amargas a los de contenido mayor a 5.000 g/ 100 g (b.s), como nivel intermedio a los de casi 5.000 g/ 100 g (b.s.) y como variedades de menor contenido a los de menos de 4.000 g/ 100 g (b.s.).

Así, se agruparon los ecotipos por nivel de contenido de alcaloides en alto (Anexo 35), intermedio (Anexo 36) y bajo (Anexo 37) a los que corresponden valores mayor a 5, entre 4 y 5, y menor a 4 % (b.s.) respectivamente. Se puede observar que el grupo que contiene mayor cantidad de ecotipos es el de nivel bajo, es decir, se tiene mayores opciones de selección de ecotipos con los que se puede disminuir esfuerzos para el proceso de desamargado.

En la Tabla 10 se observa que las regiones Puno, Áncash y Junín contienen ecotipos del grupo alto, intermedio y bajo dando lugar a una amplia biodiversidad a diferencia de la menor biodiversidad que se observa para Apurímac con ecotipos solo del alto y Cajamarca con ecotipos solo del bajo. Se observa que se obtuvo un CV bajo en cada grupo lo que indica muestras homogéneas, también se observa una ligera mayor variabilidad en los ecotipos del grupo bajo.

Tabla 10: Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) de acuerdo a agrupación de ecotipos por nivel de alcaloides: alto, intermedio y bajo

Nivel de contenido de alcaloides	Localidad de origen	De acuerdo a localidad de origen	De acuerdo a nivel de contenido de alcaloides		
			Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
Alto (n = 8)	Apurímac (n = 1)	6.529	5.709	0.568	0.323
	Puno (n = 1)	5.937			
	Ancash (n = 2)	5.912			
	Junín (n = 3)	5.449			
	Huancavelica (n = 1)	5.034			
Intermedio (n = 14)	Huancavelica (n = 1)	4.892	4.457	0.248	0.061
	Ancash (n = 2)	4.611			
	Puno (n = 2)	4.558			
	Junín (n = 5)	4.400			
	Huánuco (n = 2)	4.355			
	La Libertad (n = 1)	4.299			
	Cusco (n = 1)	4.159			

«continuación»

	Cajamarca (n = 1)	3.781			
	s.d. (n = 1)	3.414			
	Puno (n = 2)	3.292			
Bajo (n = 27)	Huánuco (n = 2)	2.845	2.556	0.838	0.702
	Cusco (n = 3)	2.596			
	Ancash (n = 7)	2.541			
	Junín (n = 10)	2.231			
	La Libertad (n = 1)	1.650			

n = cantidad de ecotipos

Se realizó un análisis de varianza agrupando los ecotipos con cercano contenido de alcaloides totales para determinar si existe diferencia significativa entre ellos, el detalle de las agrupaciones se presenta en el Anexo 38. Previo a ello se determinó si existe homogeneidad de varianzas entre dichos grupos mediante la prueba estadística de Bartlett cuyo resultado fue que con un α del 5 % se puede afirmar que las varianzas son homogéneas ($Q < X^2$), ver Anexo 39, por lo tanto se cumple con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

En el análisis de varianza se obtuvo que con un α del 5 % al menos un grupo es significativamente diferente ($p < 0.05$) (Anexo 40 y 41) por lo que se determinó los grupos diferentes con la prueba de comparación múltiple de test de Tukey (Anexo 42 y 43) donde se obtuvo que con un α del 5 % solo no existe diferencia significativa entre los grupos G4-G5, G7-G8, G9-G10 y G11-G12. Es así que el contenido de alcaloides totales en tres pares de grupos pertenecientes al nivel bajo de alcaloides y en un par perteneciente al nivel intermedio se pueden considerar iguales. Estos fueron agrupados para dar una clasificación más significativa como se presenta en la Figura 10 donde se clasificaron los ecotipos por el nivel de contenido de alcaloides totales en: Bajo 1, Bajo 2, Bajo 3, Bajo 4, Intermedio 1,

Intermedio 2, Alto 1 y Alto 2, niveles que son significativamente diferentes entre ellos. Quispe (2015) también agrupó a sus ecotipos de *L. mutabilis* Sweet formando tres grupos de acuerdo a su contenido de alcaloides totales: 3 %, 2 % y 1 %, con diferencia significativa.

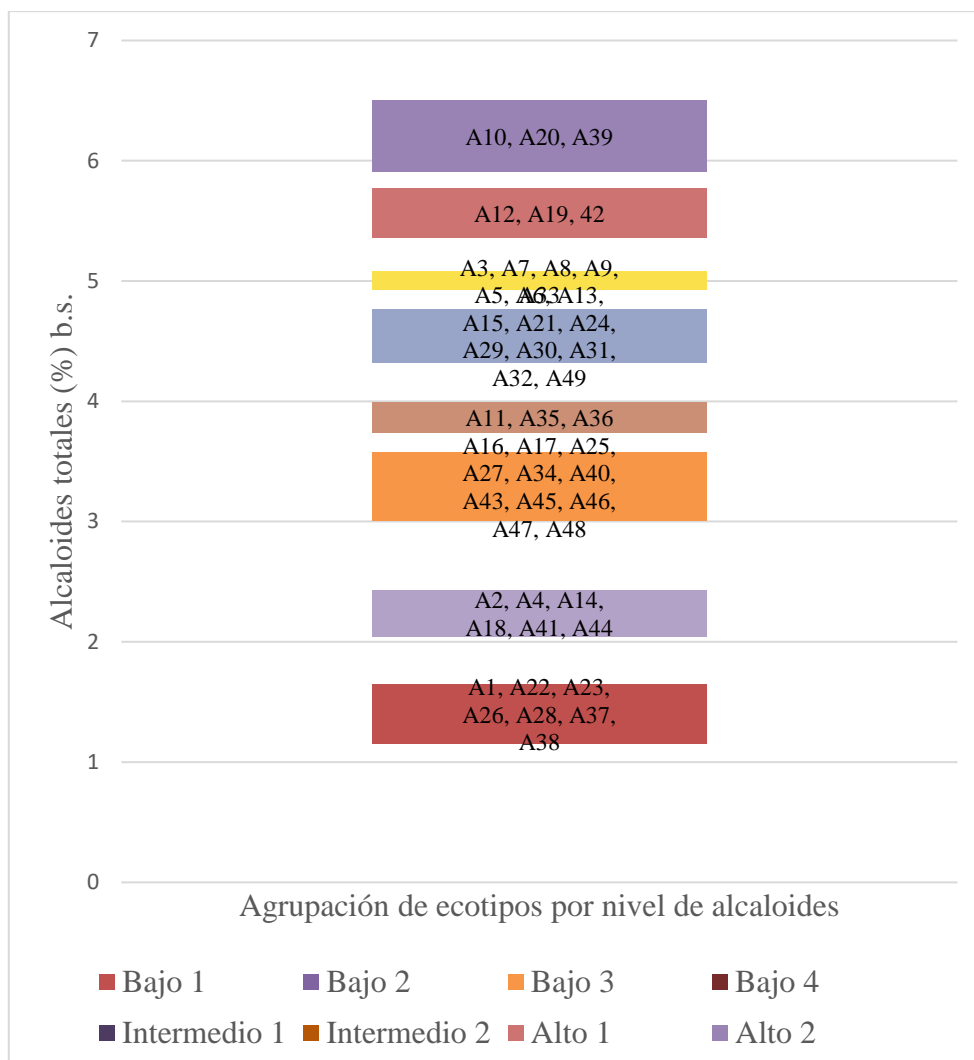


Figura 10: Clasificación de ecotipos por nivel de contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) significativamente diferentes

Respecto a la Figura 10 ver en Anexo 1 la información de los códigos de los granos.

c. Comparación entre regiones por el contenido de alcaloides totales de sus ecotipos

Se agruparon los ecotipos por región de origen como se detalla en el Anexo 44. Con la prueba de Bartlett se obtuvo que las varianzas son homogéneas, ver Anexo 45, y con el análisis de

varianza se obtuvo que los grupos no son significativamente diferentes, ver Anexo 46 y 47, por lo tanto según lo obtenido se puede afirmar que las regiones de Puno, Junín, Áncash, Huánuco, Cusco y La Libertad son iguales en cuanto a contenido de alcaloides totales conformado por su diversidad de ecotipos, esto se puede observar en el diagrama de cajas que es una comparación de medias (Figura 11) donde se aprecia que las cajas se encuentran casi en un mismo nivel pero con distintos tamaños y distribuciones.

Entre los más dispersos se observan que son los correspondientes a las regiones Áncash y Junín mientras que los menos dispersos son las cajas de Cusco y Huánuco, el nivel de variabilidad se puede interpretar por los valores de CV que se muestran en el Anexo 44 donde Áncash obtiene el valor más alto con 46.0 %, al que le sigue Junín con 44.5 % y La Libertad con 43.2 % siendo los de menor variabilidad Cusco con 28.9 %, Huánuco con 26.3 % y Puno con 26.2 %, todas las regiones obtuvieron un CV mayor al 25.0 % lo que indican que todas ellas presentan alta variabilidad con datos muy heterogéneos según la clasificación de Ramos *et al.* (2000).

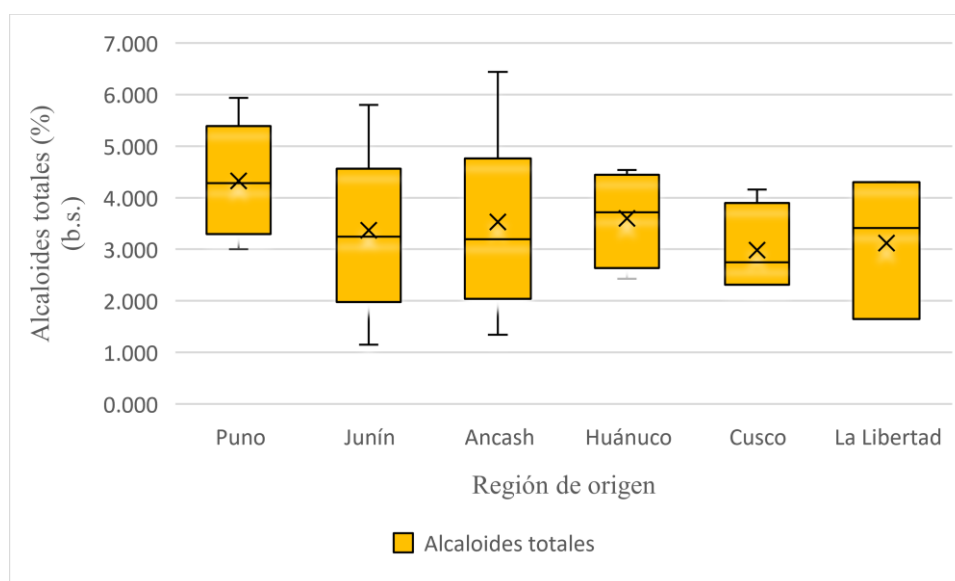


Figura 11: Diagrama de cajas para grupos de ecotipos por región de origen

Respecto a la Figura 11 la cantidad de ecotipos es de 5 para Puno, 18 para Junín, 11 para Áncash, 4 para Huánuco, 4 para Cusco y 3 para La Libertad. Ver información de los grupos en Anexo 44.

Cabe indicar que no se incluyeron en este análisis a las regiones Huancavelica, Apurímac y Cajamarca debido a que se contaron con solo 2, 1 y 1 ecotipo en dichas regiones respectivamente. La variación en el contenido de alcaloides en los granos de tarwi puede deberse a las condiciones del lugar de cultivo generadas por su ubicación geográfica. Según el Anuario de Estadísticas Ambientales (2013) la altitud de los departamentos en estudio son para Puno 3827, Huancavelica 3660, Cusco 3399, Junín 3249, Áncash 3052, Cajamarca 2720, Apurímac 2378, Huánuco 1894 y La Libertad 34 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

De acuerdo a lo indicado por Cortés (2020) los departamentos de Puno, Huancavelica y Cusco deberían contener a los ecotipos más amargos, puesto indica que aquellos provenientes de zonas con elevación mayor a los 3280 (m.s.n.m.) presentan mayor contenido de alcaloides. Esto se cumple para Puno y Huancavelica quienes obtuvieron los mayores valores promedio, 4.327 y 4.963 % respectivamente, sin embargo no se cumple para Cusco, también se cumple que La Libertad es el de menor altitud y es uno de los departamentos con menor contenido de alcaloides promedio (3.121 %) pero no se cumple para Cusco quien obtuvo el menor promedio (2.987 %).

Por ello, se requiere conocer la altitud exacta en la que sus ecotipos fueron cultivados y considerar otros aspectos ambientales, según Jacobsen y Mujica (2006) la composición nutricional y contenido de alcaloides de la semilla del tarwi se genera de acuerdo a la diversidad genética de la planta la cual se construye para adaptarse a diferentes suelos y diversas condiciones ambientales que varían en temperatura, precipitación y altitud, lo que ha permitido que su cultivo sea resistente a ambientes templados y fríos del Altiplano. Además se debe considerar un mayor número de muestras en cada departamento para concluir las diferencias por lugar de origen, en la presente investigación no se obtuvo diferencia significativa entre lugares de origen.

4.1.2. Análisis del contenido de alcaloides residuales en tarwi desamargado

Se determinó el contenido de alcaloides residuales para los granos desamargados de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) como la suma de lupanina y esparteína debido a que, al igual que en los granos amargos, estos dos alcaloides son los mayoritarios después del proceso de desamargado tal como lo indica la literatura, Paola Cortés (2020) identificó solo estos dos

alcaloides después de aplicar el método de desamargado acuoso en los granos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) en su estudio de cuantificación de ocho alcaloides donde obtuvo que para el grano desamargado la suma de lupanina y esparteína representaron el 100% del total de alcaloides con un resultado de no detectable para el contenido del resto de alcaloides.

Se aplicó el método de desamargado acuoso adaptado de Jacobsen y Mujica (2006) en la cual el lavado se realizó con agua en reposo. Se cuantificó por encima de los valores de LOC de la lupanina y la esparteína y se reportaron como “menor al LOC (< LOC)” los resultados obtenidos por debajo de dicho límite.

a. Determinación cuantitativa del contenido de alcaloides residuales

En la Tabla 11 se presenta el resumen de los contenidos de la lupanina, esparteína y alcaloides residuales obtenido para los granos desamargados de los 49 ecotipos de tarwi (*L. mutabilis Sweet*). Se obtuvo en promedio un contenido de lupanina de 0.025 % (b.s.) que resultó ser un valor mucho mayor a lo obtenido por Cortés (2020) con 0.001 % (b.s.), y se obtuvo para esparteína 0.009 % (b.s.) que fue un valor mucho mayor a lo obtenido por Cortés (2020) con 0.001 % (b.s.).

El promedio del contenido de alcaloides residuales obtenido fue de 0.031 % (b.s.), este valor fue mayor a lo obtenido por Carrión *et al.* (2008) quién reportó para granos desamargados de *L. mutabilis Sweet* cultivados en Ecuador un contenido de 0.007 % de alcaloides residuales, y fue menor a lo obtenido por los siguientes autores, como por Quispe (2015) quien obtuvo un promedio de 0.087 % de alcaloides en granos desamargados por método acuoso de diez ecotipos cultivados en Perú, Sosa (2000) citado por Quispe (2015) quien obtuvo en grano desamargado de *L. mutabilis* un 0.100 % de alcaloides, Villacreses (2011) quien obtuvo para granos desamargados por seis días de *L. mutabilis Sweet* cultivado en Ecuador un contenido de alcaloides residuales de 0.200 % en b.s., con respecto a otras especies de *Lupinus* se obtuvo un promedio cercano a lo obtenido por Gutiérrez y Barbosa (2003) quienes trabajaron con la especie *L. campestris* y lograron un contenido de alcaloides quinolizidínicos del grano desamargado de 0.030 %, y fue menor a lo indicado por Koleva *et al.* (2011) sobre los altramuces europeos que al desamargarlos por un proceso que se basa en las operaciones de remojo y lavado con agua logran un nivel de alcaloides aproximadamente de 0.050 %.

Para el caso del contenido de lupanina se obtuvo un mínimo y máximo de 0.013 y 0.084 % (b.s.) respectivamente mientras que Cortés (2020) obtuvo valores de 0.001 a 0.003 % (b.s.), y en el caso de esparteína se obtuvo un mínimo y máximo de 0.007 y 0.020 % (b.s.) respectivamente y Cortés (2020) valores desde 0.001 a 0.002 % (b.s.), es así que los valores obtenidos en la presente investigación estuvieron por encima y dieron un rango más amplio que lo reportado en la literatura. Esta diferencia pudo ser causado porque la operación de lavado en el desamargado acuoso fue con agua en reposo en el presente estudio mientras que fue con agua corriente en el estudio de Cortés (2020), esta última forma de lavado generó mayor eliminación de alcaloides por lo que debe se debe sugerir este método para próximos estudios. Se obtuvo un mayor CV en lupanina que en esparteína con valores de 59.0 y 24.6 % respectivamente lo que indica mayor inestabilidad en cuanto a contenido de lupanina residual.

Tabla 11: Cuantificación del contenido de lupanina, esparteína y alcaloides residuales (%) en granos desamargados de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*)

	Contenido de lupanina (%) (b.s.)	Contenido de esparteína (%) (b.s.)	Contenido de alcaloides residuales (%) (b.s.)
Promedio	0.025	0.009	0.031
Valor mínimo	0.013	0.007	0.007
Valor máximo	0.084	0.020	0.104
Rango	0.071	0.013	0.097
Desviación estándar	0.015	0.002	0.018
Coeficiente de variabilidad (%)	59.042	24.609	58.148

La diferencia en el resultado de alcaloides residuales se observa en la Figura 12 donde se aprecia que el residuo de lupanina ha sido mayor que el de esparteína. Los ecotipos que obtuvo menor contenido de alcaloides residuales fueron el D12, D27 y D32 quienes

obtuvieron valores por debajo del LOC, por este motivo se los representa gráficamente como valor cercano a cero para ayudar en la comparación visual, el ecotipo al que corresponde el valor mínimo de alcaloides residuales fue el D29 (0.007 % b.s.) y el correspondiente al valor máximo fue el D47 (0.104 % b.s.) cuyo valor dio un pico muy alto a comparación de las pequeñas subidas que se dieron para el resto de ecotipos como se puede observar en la curva de alcaloides residuales que inicialmente presenta una tendencia más horizontal, lo que puede indicar que para el D47 no se logró la máxima eliminación de alcaloides posiblemente causado por características intrínsecas del mismo grano como tamaño, forma, porosidad (Rosas, 2019). Al igual que en el análisis de la Figura 9 para granos amargos, en la Figura 12 para granos desamargados también se observa la mayor influencia de la lupanina sobre el contenido de alcaloides residuales dada la similitud de dirección entre las líneas de tendencia. Se observa que los ecotipos que presentaron solo esparteína residual fueron el D29, D30 y D46 mientras que los que presentaron solo lupanina residual fueron el D33, D36, D48, D9, D9, D35, D49, D2.

En el Anexo 48 se presentan los resultados del contenido de lupanina y esparteína (% en b.s.) para cada ecotipo con sus respectivas medidas de precisión (CV y DRM), se debe inferir que para los ecotipos que no presentan cualquiera de dichas medidas entonces su resultado es el valor de una sola medida (sin repeticiones), es así que los resultados de alcaloides residuales debe considerarse como estimada y por ende como valores referenciales.

Se puede observar que los ecotipos con precisión aceptable para el contenido de lupanina fueron: D4, D22, D25 y D41 (4 ecotipos), y para el contenido de esparteína fueron: D3, D6, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D20, D21, D22, D25, D26, D29, D31, D37, D41, D44, D45 y D47 (21 ecotipos), del resto de ecotipos con baja precisión se obtuvo un máximo de CV y DRM de 13.7 y 11.4 % respectivamente para lupanina y de 11.5 y 7.4 % para esparteína, además se muestra el total de la suma de los porcentajes de CV y DRM de los 49 ecotipos para lupanina y esparteína, estos resultados indican menor precisión en la cuantificación del contenido de lupanina. Quispe (2015) calculó el CV para el contenido de alcaloides en los granos desamargados de *L. mutabilis Sweet* a partir de dos repeticiones calculados por el método de púrpura bromocresol que es cuantificación por espectrofotometría y obtuvo un mínimo y máximo de 8.7 y 99.8 %, es decir obtuvo mucho menor precisión que lo obtenido para alcaloides residuales en la presente investigación con técnica de GC-FID.

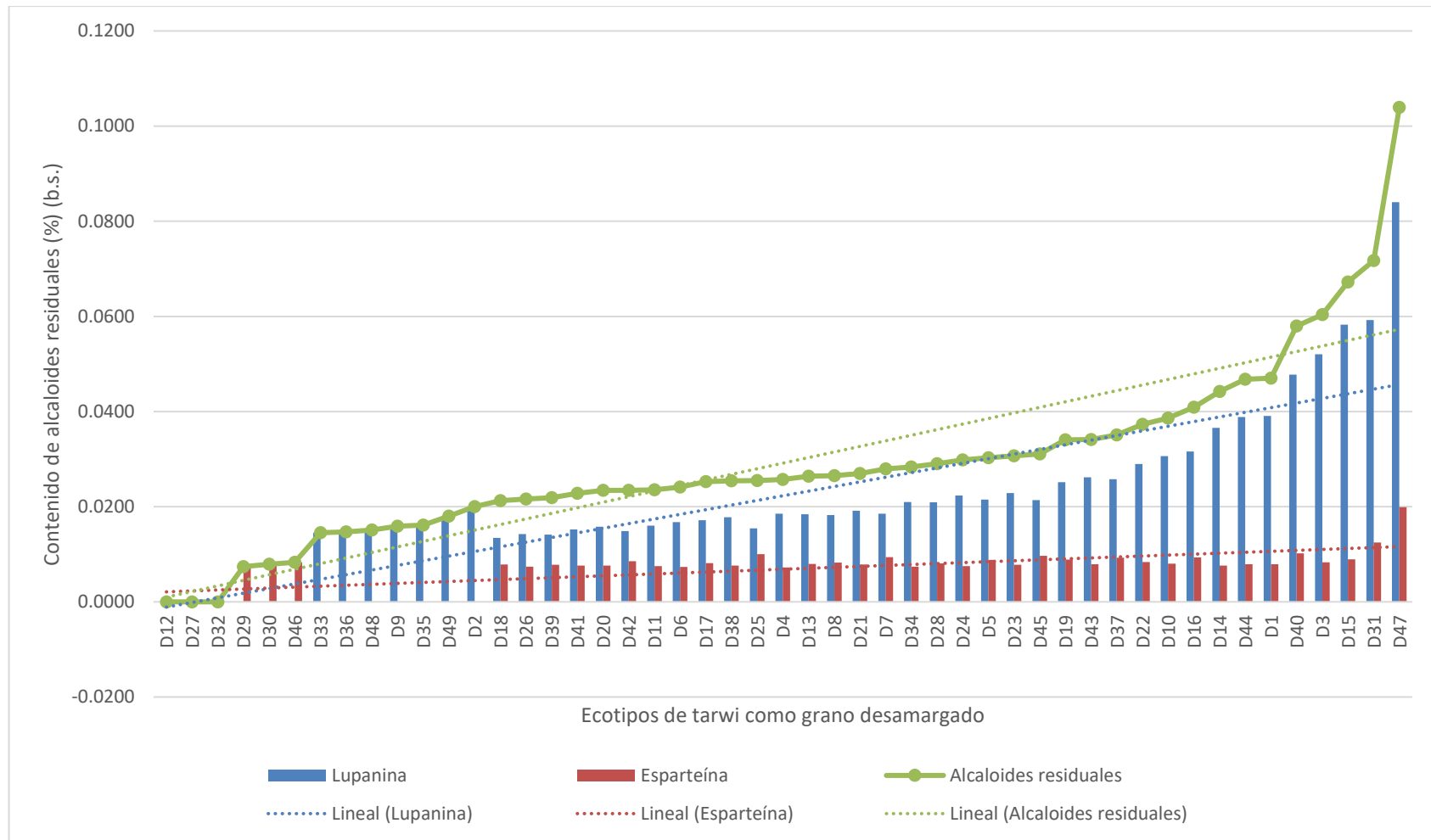


Figura 12: Cuantificación del contenido de los alcaloides lupanina, esparteína y alcaloides residuales (%) en granos desamargados de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*)

En cuanto a comparaciones de alcaloides residuales % (b.s.), indicados en el Anexo 49, se tienen algunos trabajos con los mismos ecotipos de *L. mutabilis Sweet* cultivados en Perú: para el ecotipo Compuesto blanco semiprecoz (E2) se obtuvo 0.020 % que fue mucho menor a 0.146 % (Quispe, 2015), para Cholo fuerte (E3) se obtuvo 0.060 % que fue menor a 0.101 % (Quispe, 2015), para Andenes INIA (E4) se obtuvo 0.026 % que fue menor a 0.054 % (Quispe, 2015), para Moteado beige (E12) se obtuvo menor al LOC que fue menor a 0.131 % (Quispe, 2015), para Vicos (E40) se obtuvo 0.058 % que fue menor pero cercano a 0.086 % (Quispe, 2015).

Es sí que para los mismos ecotipos y con la misma metodología de desamargado se obtuvo menor contenido de alcaloides residuales en el presente estudio a comparación de lo obtenido por Quispe (2015), sin embargo Cortés (2020) obtuvo con los mismos ecotipos valores aún más reducidos que lo obtenido en el presente estudio usando también la misma metodología de desamargado con la única diferencia de que aplicó agua corriente durante la etapa de lavado. Ante ello, cabe mencionar la importancia de la aplicación de cada etapa del desamargado acuoso para lograr una máxima lixiviación del metabolito, el remojo para suavizar la estructura del grano e hidratarlo con el fin de facilitar una posterior difusión de sus componentes entre ellos los alcaloides, la cocción para detener el proceso germinativo del grano y su proceso de deterioro además de mejorar su permeabilidad y el lavado para continuar con dicha difusión por varias horas o días adicionales sin que el grano se vea afectado por una posible descomposición (Gutiérrez *et al.*, 2016; Carvajal *et al.*, 2013).

Debido a que el nivel de dificultad de difusión del agua puede variar de acuerdo a las características de estructura y de composición de la cubierta del grano la cual a su vez puede variar por ecotipo (Miano *et al.*, 2015, citado por Cortés, 2020), es que diversos autores adicionan elementos en la cocción y/o en el lavado para optimizar el proceso de desamargado acuoso. Así, se podría considerar que la aplicación de agua no estacionaria durante la etapa de lavado en el estudio de Cortés (2020) es una manera de mejorar la lixiviación al generar un mayor movimiento de la materia y sobretodo una constante fuente de agua limpia que permita menor saturación del metabolito y con ello mayor arrastre, sin embargo, se debe considerar la dificultad que menciona Quispe (2015) de mantener un flujo constante, el cual es necesario para lograr una buena reproducibilidad y motivo por el cual se requeriría adaptar un equipo especial para dicha operación conllevando a un costo adicional.

b. Identificación de contenidos inocuos de alcaloides residuales

El grano desamargado de tarwi debe cumplir con las normativas vigentes del país donde será comercializado para operar su libre venta y consumo dado su potencial tóxico debido a la presencia de alcaloides. En el Perú la seguridad alimentaria se rige por las Normas Técnicas Peruanas (NTP), según la NTP (2018) 205.090 el grano desamargado de tarwi debe cumplir con un contenido de alcaloides de 0.020 a 0.070 % en b.s para asegurar la inocuidad del grano, el método de ensayo establecido para la determinación de alcaloides en dicha norma técnica es la sugerida por Von Baer *et al.* (1979) el cual se diferencia del método Muzquiz *et al.* (1993) aplicado en el presente trabajo al basarse en una técnica de titulación haciendo uso de otros reactivos y al reportar el resultado como contenido de lupanina. El promedio obtenido de alcaloides residuales (0.031 % en b.s.) se encuentra dentro del límite aceptado para el consumo humano. En el Anexo 49 se observa que solo el ecotipo E47 obtuvo un valor superior a dicho límite, con 0.104 % en b.s., el resto de ecotipos cumplió con la norma en mención. El límite de alcaloides residuales varía por autores, Culvenor y Petterson (1986) citado por Gross *et al.* (1988) y Hatzold (1983b) recomiendan un valor por debajo de 0.020 % de alcaloides quinolizidínicos para el grano y para productos derivados respectivamente, Cortés (2020) indica que internacionalmente el límite máximo recomendado es 0.020 % b.s., Keeler (1989) citado por Muzquiz (1994) y Muzquiz (1989) citado por Gutiérrez y Barbosa (2003) indican que un contenido entre 0.040 a 0.050 % de alcaloides se considera seguro para el consumo humano.

c. Determinación de la pérdida de alcaloides

En la Tabla 12 se presenta el porcentaje de pérdida de lupanina, esparteína y la pérdida total de alcaloides que se obtuvo tras someter a los granos amargos al proceso de desamargado acuoso y se calculó tomando como valor inicial a los alcaloides totales y como valor final a los alcaloides residuales.

Se obtuvo una pérdida de lupanina y esparteína de 99.0 y 95.2 % respectivamente, por lo tanto se obtuvo más pérdida de lupanina que de esparteína. En el caso de la lupanina se obtuvo una pérdida del 97.1 al 99.8 % con un CV de 0.7 % y en esparteína del 88.7 al 98.6 % con un CV de 2.3 %, lo que indica mayor variación en la pérdida de esparteína. Se obtuvo una pérdida total del 98.9 %, este valor fue menor a lo obtenido por Gutiérrez y Barbosa

(2003) quienes aplicando el método de desamargado acuoso usando *L. campestri* lograron una reducción del 99.0 % de alcaloides totales e indicaron que se puede aumentar esta pérdida aplicando un tratamiento alcalino debido a que el ambiente alcalino aumenta la hidratación de la semilla. Se obtuvo un promedio mayor a lo reportado por Villacreses (2011) quien obtuvo para *L. mutabilis Sweet* de Ecuador una pérdida del 94.4 % con un proceso de remojo, cocción y lavado por seis días que fue un tiempo mayor a lo aplicado en la presente investigación que fue de cinco días e indica que a partir de los cuatro días disminuye la eficiencia del desamargado al considerar la cantidad de agua y tiempo que se consume, también se obtuvo un mayor valor a lo obtenido por Abeshu y Kefale (2017) quienes en su estudio de comparación de técnicas de desamargado en lupinu aplicaron por separado la técnica de cocción y remojo donde obtuvieron una reducción de alcaloides de 56.8 y 82.4 % respectivamente para una variedad dulce y de 23.7 y 37.3 % respectivamente para una variedad amarga, la técnica de remojo superó a la de germinado y fermentado mientras que la de cocción estuvo cercano a lo obtenido con fermentado, Quispe (2015) indica que las operaciones de influencia significativa en el desamargado acuoso son el remojo y la cocción.

Tabla 12: Porcentaje de pérdida de lupanina, esparteína y alcaloides totales de los 49 ecotipos de tarwi sometidos a proceso de desamargado acuoso

	Pérdida de lupanina (%) (b.s.)	Pérdida de esparteína (%) (b.s.)	Pérdida total de alcaloides (%) (b.s.)
Promedio	99.036	95.193	98.909
Valor mínimo	97.097	88.687	96.811
Valor máximo	99.780	98.599	99.826
Desviación estándar	0.703	2.236	0.816
Coefficiente de variabilidad (%)	0.710	2.349	0.825

Quispe (2015) indica que se debe considerar un adecuado tiempo de remojo debido a que diversos autores han comprobado la pérdida de nutrientes a tiempos largos de remojo como

lo son 24 horas, cabe indicar que en el presente estudio el tiempo de remojo fue de 12 horas. Abeshu y Kefale (2017) obtuvieron que el remojo y la cocción fueron mejores para mantener la composición nutricional, ambas operaciones forman parte del método de desamargado acuoso aplicado en la presente investigación. Carrión *et al.* (2008) menciona que el proceso de desamargado logra una reducción del 99.9 % de alcaloides e indica que la cocción es la etapa principal por lograr el mayor nivel de desamargado el cual además puede ser acelerado con la adición de sal.

La variación en la pérdida de alcaloides que se genera entre ecotipos al aplicar las mismas operaciones de desamargado acuoso pueden ser debido al tamaño de sus granos puesto Rosas (2019) obtuvo mayor remoción de alcaloides durante el lavado del grano al trabajar con partículas de menor tamaño y cita a Ramírez *et al.* (2016) para explicar que la superficie interfacial aumenta con la disminución del tamaño de partícula lo que promueve la mayor salida de alcaloides. Con la misma lógica se puede indicar que la facilidad de pérdida de alcaloides también va a depender de la forma del grano y de su porosidad, Tapia (1997) citada por Zavaleta (2018) indica que las condiciones de cultivo generan variabilidad en la forma y tamaño de las semillas del tarwi pudiendo ser redondas, ovaladas o incluso tender a ser cuadrículadas con un tamaño entre 0.5 a 1.5 cm de largo.

4.2. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICOS DE LOS ESPECTROS FT-MIR DEL TARWI AMARGO Y DESAMARGADO

Se obtuvieron los espectros FT-MIR, usando equipo portátil y de mesa, de los estándares de alcaloides y de las muestras de tarwi amargo y desamargado como parte de la optimización del modelado quimiométrico de clasificación.

4.2.1. Análisis de las bandas de absorción de los estándares de alcaloides

En la Figura 13 se observa que los picos predominantes para el espectro de la lupanina fueron 1620, 1451, 1259, 1077, 801 y 622 cm^{-1} con un par de picos ligeramente pronunciados en 2959 y 2872 cm^{-1} , y los picos predominantes para el espectro de la esparteína fueron 1261, 1100, 1035 y 801 cm^{-1} con un par de picos ligeramente pronunciado en 2931 y 2759 cm^{-1} . Para interpretar la identificación de los picos con especies químicas se debe considerar que los espectros MIR se analizan dividiendo el espectro en dos zonas: zona de diagnóstico que

se usa para detectar grupos funcionales y zona de la huella dactilar la cual es única para cada molécula, Skoog *et al.* (2005) hace la división ubicando la zona de diagnóstico desde 2.5 a 8.5 μm ($4000 - 1180 \text{ cm}^{-1}$), Walczak e Intell (1995) citado por Macho (2002) y Skoog *et al.* (2008) hace esta división en aproximadamente 1300 cm^{-1} identificando hacia los 4000 cm^{-1} para frecuencias de grupos y hacia los 400 cm^{-1} como huella dactilar.

En el presente trabajo de investigación se realizó la división al 1500 cm^{-1} considerando de 4000 a 1500 cm^{-1} como la zona de diagnóstico y de 1499 a 450 cm^{-1} como zona de huella dactilar, esto de acuerdo al trabajo de Daoud *et al.* (2019) quien realizó la misma división en su estudio de aceites con FT-MIR. En la zona de diagnóstico se observó la formación de bandas de absorción a los 2959 , 2872 y 1620 cm^{-1} en el espectro de la lupanina y a los 2931 y 2759 cm^{-1} en el espectro de la esparteína. Skoog *et al.* (2005) indica que esta zona es útil para localizar la absorción de los grupos funcionales debido a que su señal no es considerablemente afectada por la estructura que contiene a dichos grupos, es así que se puede analizar a la especie química mediante datos recopilados en la literatura.

Para el análisis de los espectros se debe entender que la estructura de los alcaloides quinolizidínicos del *Lupinus* contiene al anillo de la quinolizidina y la quinolizidina es un compuesto bicíclico heterocíclico cuyo esqueleto es formado por átomos de carbono e hidrógeno con nitrógeno intracíclico (Bruneton, 1993).

Los picos entre 3000 y 2700 cm^{-1} señalados para lupanina y esparteína podrían corresponder a la unión C-H del esqueleto quinolizidínico. La literatura señala que la zona desde el 3000 al 2800 cm^{-1} está relacionada a los grupos alcanos C-H con vibración del tipo tensión y flexión (Skoog *et al.*, 2005; Walczak *et al.*, 1995, citado por Macho, 2002; Wehling, 2010). Respecto a los alcaloides quinolizidínicos se tiene el estudio de Skolik *et al.* (1968) quien afirmó que las bandas de absorción en la región de $2820 - 2760 \text{ cm}^{-1}$ se deben a las vibraciones del tipo estiramiento del C-H en grupos unidos a un átomo de nitrógeno en sistemas heterocíclicos no aromáticos y que si dos grupos están unidos a un átomo de nitrógeno entonces se formarán dos bandas en las zonas $2805 - 2780 \text{ cm}^{-1}$ y $2775 - 2765 \text{ cm}^{-1}$ cada una, y el estudio de Bohlmann (1958) citado por Mammarella (1970) quien en su análisis de estereoquímica y tendencias en las formas cis y trans de las estructuras de alcaloides quinolizidínicos afirmó la aparición de bandas de absorción provenientes de las vibraciones del enlace C-H en la zona de $2800 - 2700 \text{ cm}^{-1}$.

El pico en el 1620 cm^{-1} que se observa en el espectro de la lupanina estaría asignado al grupo carbonilo C=O presente en su anillo oxigenado de la quinolizidina. Esta suposición es por la información expuesta en la literatura donde se menciona que el rango $2000 - 1500\text{ cm}^{-1}$ es para vibraciones de tensión C=O, tensión C=N, tensión C≡C y flexión N-H (Walczak *et al.*, 1995, citado por Macho, 2002), y por lo señalado por Jasiewicz *et al.* (2004) quien en su estudio de análisis conformacional de derivados de la lupanina menciona que la banda de absorción asignada para el grupo carbonilo corresponde a los 1600 cm^{-1} .

En la zona dactilar se observó la formación de bandas de absorción a los $1451, 1259, 1077, 801$ y 622 cm^{-1} en el espectro de lupanina y a los $1261, 1100, 1035$ y 801 cm^{-1} en el espectro de esparteína, se debe entender que la distribución de las bandas de absorción en la zona dactilar puede cambiar de forma significativa ante pequeños cambios en la estructura de las moléculas el cual puede provenir de la interacción entre enlaces vecinos (Skoog *et al.*, 2008). De acuerdo a las asignaciones dadas por Baranska y Schulz (2009) las vibraciones del C–N se dan alrededor de $1302 - 1224\text{ cm}^{-1}$ el cual podría corresponder a los picos de 1259 cm^{-1} en lupanina y 1261 cm^{-1} en esparteína, estiramiento del C–N en $1099 - 1041\text{ cm}^{-1}$ que podría corresponder a los picos de 1077 cm^{-1} en lupanina y 1035 y 1100 cm^{-1} en esparteína, deformación del N–C–H en $920 - 800\text{ cm}^{-1}$ que podría corresponder al pico de 801 cm^{-1} presente en lupanina y esparteína.

En el Anexo 50 se presentan los espectros en el infrarrojo medio de la lupanina y la esparteína del *Lupinus Paniculatus Desr.* de origen argentino obtenido por Mammarella (1970) con un espectrómetro Perkin Elmer 137B, los espectros están expresados en transmitancia (%) versus el número de onda (cm^{-1}) de la luz infrarroja, por lo tanto, los picos deben interpretarse de acuerdo al porcentaje de la radiación que es transmitida a través de la muestra, así los picos más intensos indican menor transmitancia y por ende mayor absorción, se observa en el espectro de la lupanina que los picos más intensos se forman en la zona aproximadamente de 2900 cm^{-1} y en 1650 cm^{-1} y formación de picos menos intensos entre aproximadamente $1490 - 700\text{ cm}^{-1}$, y en el espectro de la esparteína se observa que el pico más intenso se forma en la zona aproximadamente de $2900\text{ cm}^{-1} - 2700\text{ cm}^{-1}$ con presencia de doble pico y formación de picos menos intensos entre aproximadamente los $1480 - 730\text{ cm}^{-1}$.

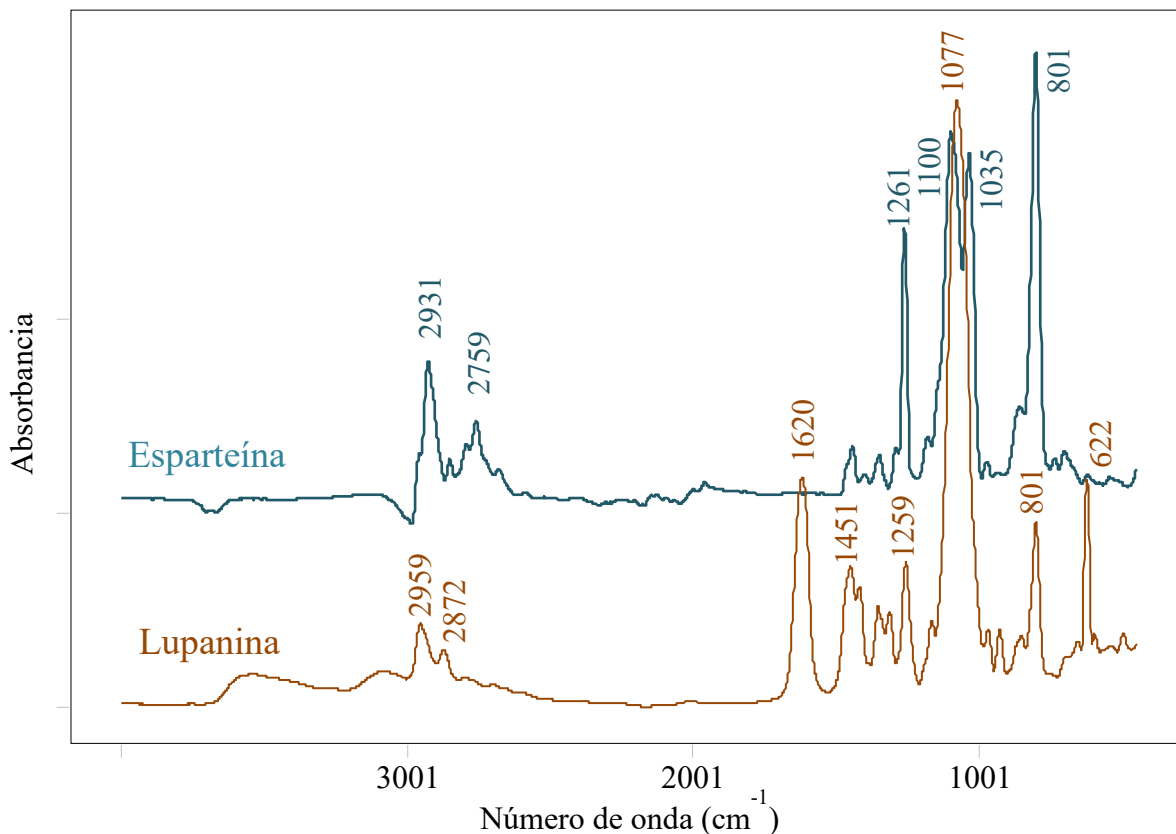


Figura 13: Espectros FT-MIR de la lupanina y la esparteína medidos en espectrómetro de mesa

Si comparamos el espectro del Anexo 50 con el espectro de la lupanina y de la esparteína respectivamente de la Figura 13 se puede decir que lo obtenido en la presente investigación está en concordancia en cuanto a zonas de aparición de bandas de absorción a lo obtenido por Mammarella (1970), sin embargo, se observan diferencias en cuanto a intensidad de absorción sobretodo en los picos superiores a 2700 cm^{-1} donde los picos fueron mucho más intensos en los espectros obtenidos por Mammarella (1970), se observan también diferencias en cuanto a intensidad y a los números de onda específicos en los cuales aparecieron las bandas de absorción aunque se coincidió en el rango de aparición.

El motivo puede ser la diferencia en la conformación tridimensional del alcaloide, tal como lo explican diversos autores. Skolik *et al.* (1968) indica que una disminución en la frecuencia con respecto a la región normal del estiramiento del C-H debe ser producto de una interacción específica entre enlaces C-H con el par de electrones libres del nitrógeno. Mammarella (1970) indica que en un sistema quinolizidínico pueden existir las formas trans y cis a temperatura ambiente y en equilibrio pero con tendencia hacia la forma trans, más

adelante explica acerca de la lupanina que este tipo de alcaloide presenta una conformación del tipo silla-bote debido a la inversión del nitrógeno con predominancia en la forma del bote, y acerca de la esparteína indica que la conformación silla ideal puede ser deformada debido a la inversión del nitrógeno. Es por ello que varios autores concluyeron que en el análisis de espectroscopia infrarroja de los derivados quinolizidínicos se debe interpretar la presencia de las bandas de absorción en conjunto dado a que ambas conformaciones, silla-silla y silla-bote, van a presentar absorción en dicha zona pero con diferente intensidad y puede variar su frecuencia por lo tanto los picos van a estar dispuestos de acuerdo a su conformación tridimensional.

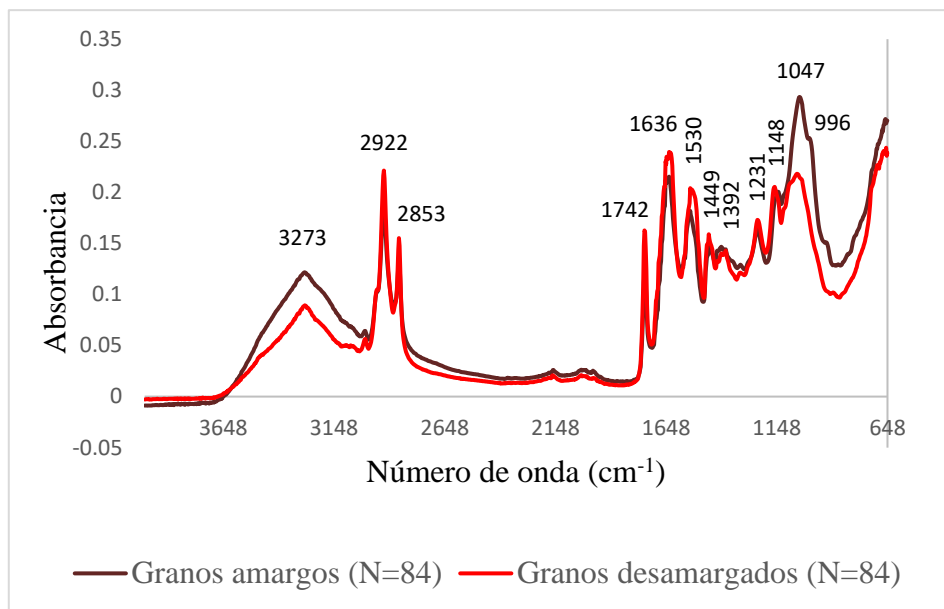
4.2.2. Análisis de las zonas del infrarrojo de los espectros del tarwi

En la Figura 14 se observa los promedios de los espectros de la matriz alimenticia del tarwi amargo y desamargado, que comprende información de sus diversos componentes químicos como lo son las grasas, proteínas, carbohidratos, humedad, entre otros.

La banda formada a los $\sim 3277\text{ cm}^{-1}$ está asociada a la vibración de los grupos O–H alifático y aromático (Skoog *et al.*, 2005; Macho, 2002), está incluido en $3700 - 3100\text{ cm}^{-1}$ relacionada con el estiramiento del grupo hidroxilo O–H proveniente del agua, y con productos de la oxidación de lípidos como aldehídos y cetonas según Daoud *et al.* (2019). La zona ~ 2922 y $\sim 2853\text{ cm}^{-1}$ está cercano a 2850 cm^{-1} asociado a los grupos C–H de los ácidos grasos de cadena larga (Aykas y Menevseoglu, 2021) y cercano a 2920 y 2860 cm^{-1} asociado a estiramientos de los grupos metilo de ácidos grasos. La zona del $\sim 1743\text{ cm}^{-1}$ está cercano a 1740 cm^{-1} asociado a la vibración tipo estiramiento de los enlaces ésteres presente en algunos lípidos (Macías *et al.*, 2004) o definido como éster carbonilo C–O de los ácidos grasos (Aykas y Menevseoglu, 2021; Shiroma y Rodriguez *et al.*, 2009), la zona del $\sim 1638\text{ cm}^{-1}$ es cercana al 1654 cm^{-1} que corresponde a la vibración tipo estiramiento del N–H de la amida I de las proteínas (Shiroma y Rodriguez *et al.*, 2009), la zona del $\sim 1535\text{ cm}^{-1}$ es cercana al 1560 cm^{-1} asociada a la vibración del tipo estiramiento del C–N y flexión del N–H de las amidas de las proteínas (Aykas y Menevseoglu, 2021), la zona $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1396\text{ cm}^{-1}$ es cercana al $1458 - 1375\text{ cm}^{-1}$ relacionadas con flexión de la unión C–H de grupos alifáticos (Shiroma y Rodriguez, 2009) que podría provenir de ciertos aminoácidos, la zona ~ 1235 y 1144 cm^{-1} es cercana a los $1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento C–H de los carbohidratos (Aykas y Menevseoglu, 2021) y cercana también, junto con $\sim 1046\text{ cm}^{-1}$

¹ y ~997 cm⁻¹, a los 1200 – 950 cm⁻¹ que es a vibraciones de la unión C–O–C de disacáridos y polisacáridos (Macías *et al.*, 2004).

(a): Espectrómetro portátil



(b): Espectrómetro de mesa

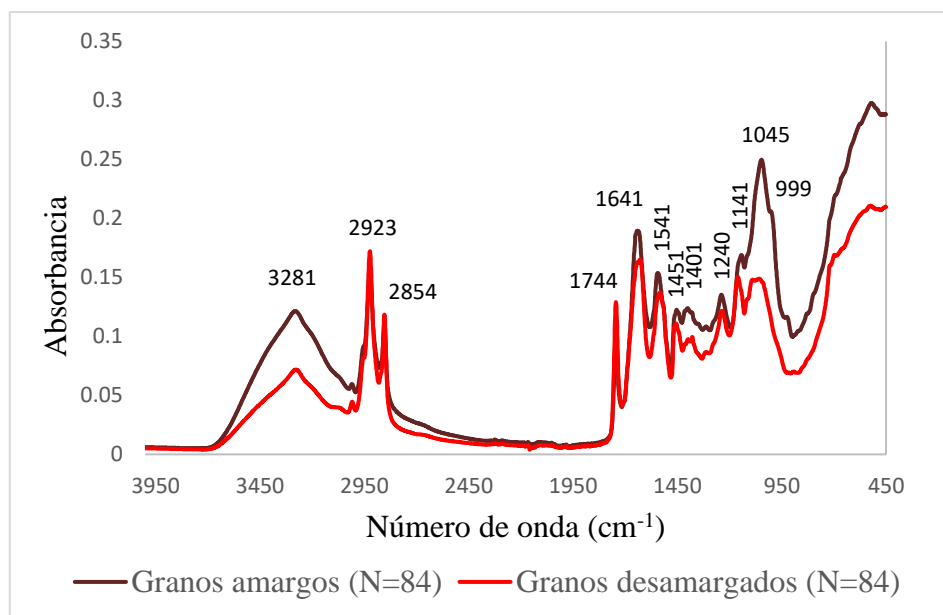


Figura 14: Espectros promedios de la harina de tarwi amargo y desamargado

Respecto a la Figura 14 el promedio se obtuvo a partir de las lecturas de las muestras con sus repeticiones detalladas en los Anexos 52 y 53 para (a) y (b) respectivamente.

Sabelino (2020) obtuvo para la harina de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) que las bandas relacionadas con proteínas fueron 1507, 1550 y 1691 cm^{-1} e indicó que las dos primeras posiblemente provengan de la vibración del grupo C=O de la amida II y la última de la vibración de los grupos N-H y C-N del grupo amida I de los compuestos proteicos y que las bandas relacionadas con fenoles fueron 1450 y 1654 cm^{-1} y las relacionó con anillos aromáticos y grupos carbonil respectivamente de los compuestos fenólicos.

Acerca de los cambios en el contenido de compuestos químicos generados por el proceso de desamargado del tarwi se tienen estudios como el de Abeshu y Kefale (2017) quienes obtuvieron en el grano desamargado un aumento en proteínas y carbohidratos, y disminución en grasas, cenizas, minerales y fibra con respecto al grano amargo. Quispe (2015) respecto a un proceso de desamargado con parámetros parecidos a lo aplicado en el presente estudio menciona que se genera aumento de proteína y de fibra, disminución del extracto etéreo, de carbohidratos y de ceniza. La causa puede ser por concentración (Villacrés *et al.*, 2006), por arrastre de compuestos solubles con el agua durante los lavados, y por desprendimiento de la cáscara del tarwi (Quispe, 2015). Estas variaciones deberían manifestarse en los espectros, así se observa en (a) y en (b) de la Figura 14 que la mayor parte del espectro promedio de los granos desamargados se dibuja por debajo del espectro promedio de los granos amargos.

Se trabajó el análisis quimiométrico en el rango de 1719.9 – 1602.1 cm^{-1} y 1487.3 – 752.3 cm^{-1} con los espectros del portátil y de 1720 – 1600 cm^{-1} y 1489 – 750 cm^{-1} con los espectros del de mesa (Anexo 51). Dicho rango fue seleccionado de acuerdo a la formación de bandas de absorción de la lupanina y la esparteína incluyendo sus bandas más intensas (1620, 1451, 1259, 1077 y 801 cm^{-1} para lupanina; 1261, 1100, 1035 y 801 cm^{-1} para esparteína) y obviando sus bandas menos intensas (2959 y 2872 cm^{-1} para lupanina, 2931 y 2759 cm^{-1} para esparteína). Se excluyó la zona del ~1599 al ~1490 cm^{-1} debido a la influencia de los compuestos proteicos (1507 y 1550 cm^{-1} por Sabelino, 2020) y al verificar que su exclusión aumentaba la eficiencia en la respuesta de clasificación durante la optimización del modelo.

4.2.3. Respuestas de clasificación del tarwi mediante análisis multivariado (SIMCA) de los espectros FT-MIR usando espectrómetro portátil y de mesa

En el análisis cuantitativo por GC-FID se obtuvo que solo la muestra D47 superó el límite permitido de alcaloides residuales de la NTP (2018) 205.090, dicha muestra no fue incluida

en el grupo de entrenamiento de los granos desamargados para la clasificación. La clasificación usando los espectros del espectrómetro portátil se realizó con 299 variables (números de onda), 84 espectros para la Clase 1 y 84 para la Clase 2 (Anexo 52). La clasificación usando los espectros del espectrómetro de mesa se realizó con 861 variables (números de onda), 84 espectros para la Clase 1 y 84 para la Clase 2 (Anexo 53).

Las proyecciones de clases que se presentan en la Figura 15 brinda información sobre el análisis de componentes principales de tres factores que el método SIMCA realiza al conjunto de entrenamiento donde los cuadrados del gráfico representan los datos de las muestras y los puntos pequeños del gráfico representan los intervalos de confianza. Tanto en (a) como en (b) de la Figura 15 se observa una clara distinción en la agrupación de los datos entre las clases 1 y 2 lo que informa sobre una adecuada separación entre clases, no se revela ningún grupo de superposición entre clases y se observa que ciertos datos quedaron ubicados por fuera de los intervalos de confianza, estas observaciones se afinaron con el análisis de la rotación en 3D de ambas proyecciones.

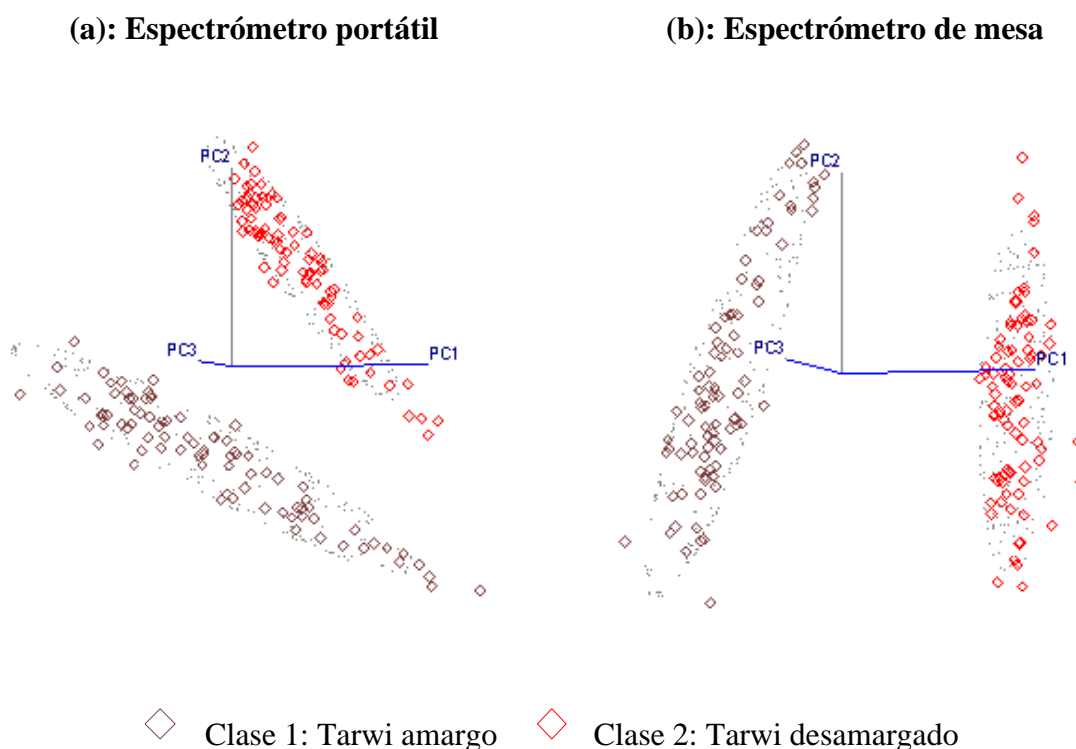


Figura 15: Proyecciones de clases de la clasificación SIMCA

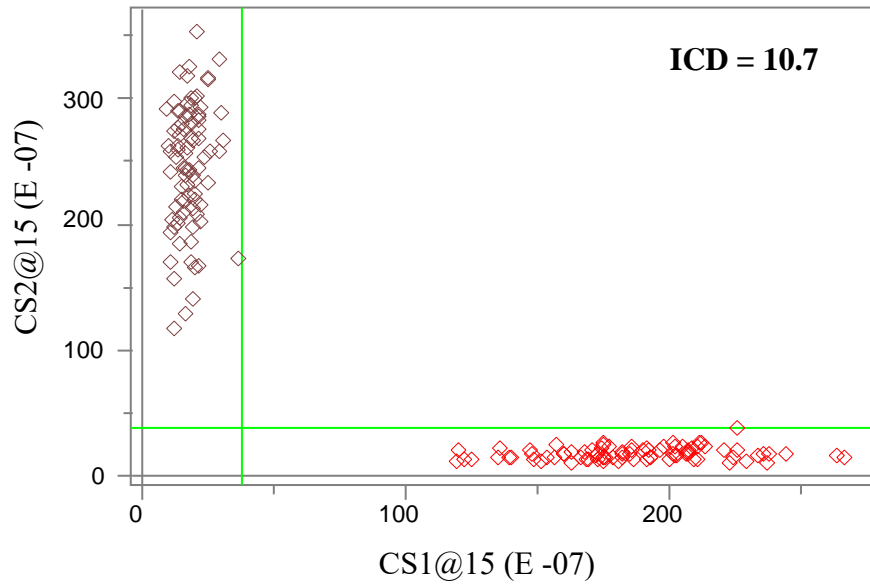
La separación entre clases que se presentan en la Figura 16 está representada en cuatro cuadrantes donde el superior izquierdo es específicamente para muestras de la Clase 1, la inferior derecha es para la Clase 2, el inferior izquierdo es para muestras con características de ambas clases lo que dificulta la distinción de su cercanía a alguna de ellas, y el superior derecho es para muestras donde el algoritmo no pudo encontrar similitud con algunas de las clases. Se observa tanto en (a) como en (b) que todos los datos de las muestras de las Clases 1 y 2 se encuentran agrupadas en los cuadrantes específicos para su clase, por lo tanto, no se evidenciaron muestras cuyas características no pudieran ser adecuadamente discriminadas.

La manera objetiva de analizar las agrupaciones gráficas es mediante la medición de la distancia entre clases (ICD), el cual resultó ser de 10.7 y 32.9 para (a) y (b) respectivamente. Por regla general un ICD mayor a 3 es suficiente para que exista diferenciación entre las clases (Kvalheim y Karstang, 1992, citado en Infometrix, 2014; Massart *et al.*, 1988 citado por Aykas y Menevseoglu, 2021). Por lo tanto, la clasificación a partir de (a) y de (b) lograron una discriminación aceptable entre las Clases 1 y 2 al presentar un ICD mayor a 3 y con ello el modelo se considera adecuado. Se obtuvo un valor mucho más alto de ICD en (b) que en (a) por lo tanto el algoritmo SIMCA pudo ejecutar una mejor clasificación al trabajar con los espectros FT-MIR del espectrómetro de mesa (b) que con los obtenidos con el portátil (a).

En la literatura se encuentran diversos estudios donde la clasificación por método SIMCA usando espectros del MIR logran óptimos valores de ICD, Aykas y Menevseoglu (2021) obtuvo un ICD mínimo de 3.5 y máximo de 99.8 entre categorías de pistacho puro y pistacho adulteradas con adiciones de guisante verde y maní recomendando su uso para el control rutinario del pistacho como alternativa ante métodos de cromatografía. Rubio *et al.* (2010) obtuvo un ICD mínimo de 3.1 y máximo de 29.4 entre ocho categorías (variedades) de tomates diferenciadas por su contenido en carotenoides indicando la producción de grupos bien separados y compactos como alternativa de cromatografía líquida. Shiroma y Rodriguez (2009) obtuvo una buena separabilidad para el 78 % de muestras de papas fritas distinguibles por el tipo de aceite usado durante la fritura presumiendo que la clasificación sería por el contenido de grasas hidrogenadas, entre los ICD que indicaron similitud fueron entre 0.54 a 2.99 y los ICD que indicaron diferencias fueron entre 3.08 a 31.18. Uribe *et al.* (2015) obtuvo un ICD de 8.1 y 13.3 entre grupos de muestras de miel pura contra grupos de miel

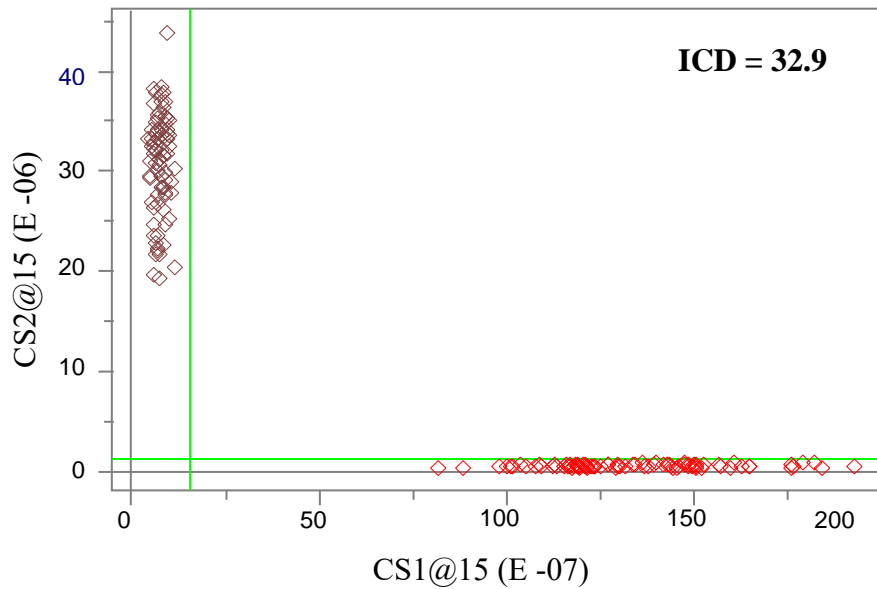
contaminada con dos tipos de antibióticos, y de 6.93 entre los dos grupos contaminados e indica que dicha separabilidad permitió la adecuada detección de los antibióticos.

(a): Espectrómetro portátil



◇ Clase 1: Tarwi amargo ◇ Clase 2: Tarwi desamargado

(b): Espectrómetro de mesa



◇ Clase 1: Tarwi amargo ◇ Clase 2: Tarwi desamargado

Figura 16: Separación entre clases y distancia entre clases (ICD) de la clasificación SIMCA

Los residuos entre clases se presentan en la Tabla 13. Se considera un buen ajuste cuando los valores indicados en las diagonales (residuos de una clase ajustada a sí misma) son menores a los valores fuera de la diagonal (Infometrix, 2014). Se observa tanto en (a) como en (b) que los valores dentro de la diagonal son mucho más pequeños que los que se encuentran fuera, por lo tanto, se puede decir que las Clases 1 y 2 se ajustan bien a sí mismas, comparativamente se observa menor residuo en la diagonal de (b) que en (a) lo que indicaría que se logra mayor ajuste al trabajar con los espectros del espectrómetro de mesa, lo que va en concordancia con el mayor ICD obtenido en (b).

Tabla 13: Residuos entre clases de la clasificación SIMCA

	(a): Espectrómetro portátil		(b): Espectrómetro de mesa	
	CS1@15	CS2@15	CS1@15	CS2@15
CS1	2E-6	25E-6	1E-6	31E-6
CS2	19E-6	2E-6	14E-6	1E-6

CS1: Clase 1

CS2: Clase 2

CS1@15: Clase 1 con 15 factores máximos

CS2@15: Clase 2 con 15 factores máximos

El poder discriminatorio determinado por el algoritmo SIMCA se presenta en la Figura 17, el cual indica las variables (números de onda) identificadas con mayor influencia para la distinción entre clases. Los valores del poder discriminatorio van desde 2.9 a 1438.6 para el caso de (a) y de 7.2 a 9509.4 para el caso de (b). Una baja capacidad se representa con valores próximos a “0” y una aceptable capacidad se representa con valores superiores a “1”. Se observa en (a) y en (b) que todas las variables resultaron con valores mayores a “1” lo que indica una buena capacidad de discriminación para la clasificación de granos amargos y desamargados. Se observa también que al trabajar con los espectros de mesa (b) se alcanzan valores mucho más altos en el poder de discriminación que al trabajar con los espectros del portátil (a).

Se destacan nueve picos más pronunciados en el gráfico (a) correspondientes a las variables 1665, 1613, 1487, 1171, 1134, 1091, 1053, 1013 y 984 cm^{-1} y dieciséis picos más

pronunciados en el gráfico (b) correspondientes a las variables 1672, 1651, 1620, 1433, 1244, 1220, 1175, 1144, 1115, 1097, 1043, 990, 966, 924, 902 y 817 cm^{-1} , por lo tanto, se identifican más variables destacados por su alto poder discriminatorio entre las Clases 1 y 2 al usar los espectros del espectrómetro de mesa que los espectros del espectrómetro portátil.

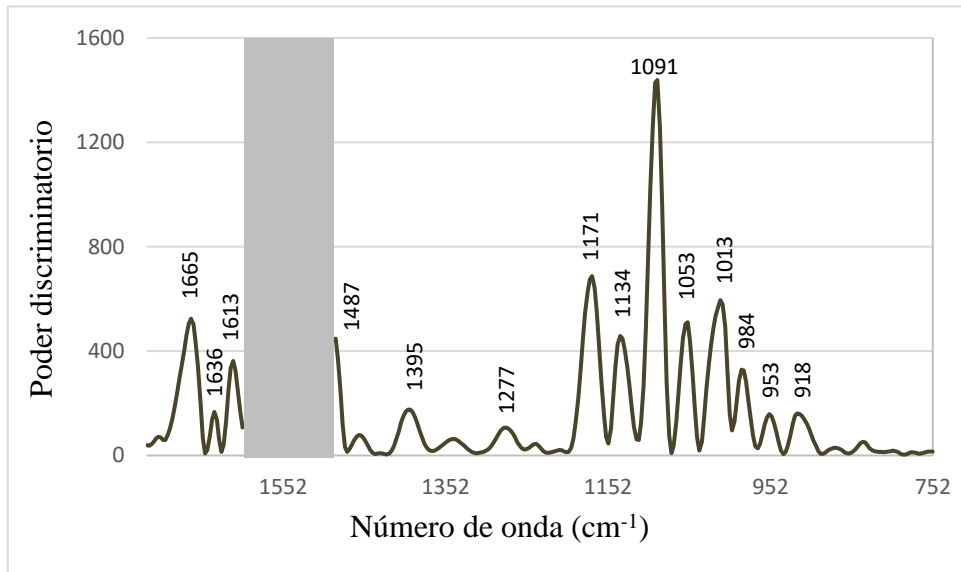
Respecto a la zona de diagnóstico ($4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) de la Figura 17 ambos gráficos coinciden en las siguientes variables (números de onda) de alto poder discriminatorio por su proximidad: 1665 y 1672 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente y 1613 y 1620 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente los cuales son próximos al pico 1620 cm^{-1} del espectro de la lupanina el cual podría estar asociado a la vibración del tipo tensión del grupo carbonilo C=O (Walczak *et al.*, 1995, citado por Macho, 2002, Jasiewicz *et al.*, 2004) discutidos anteriormente. Coincidiendo por su proximidad en 2 zonas de la zona de diagnóstico del MIR.

Respecto a la zona de la huella dactilar ($1499 - 450 \text{ cm}^{-1}$) de la Figura 17 ambos gráficos coinciden en las siguientes variables (números de onda) de alto poder discriminatorio por su proximidad: 1171 y 1175 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente, 1134 y 1144 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente, 1091 y 1097 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente los cuales son próximos al pico 1100 cm^{-1} del espectro de la esparteína el cual podría estar asociado a la vibración del tipo estiramiento del enlace C-N (Baranska y Schulz, 2009) discutidos anteriormente, 1053 y 1043 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente y 984 y 990 cm^{-1} en (a) y (b) respectivamente. Coincidiendo por su proximidad en 5 zonas de la huella dactilar del MIR.

La diferencia de variables (números de onda) con mayor poder para discriminar entre (a) y (b) podría ser causado por la diferencia en cantidad de variables y en calidad del espectro, que incluye la presencia de ruido y de superposiciones de bandas las cuales se minimizan con el tratamiento de las transformaciones, que el espectrómetro es capaz de obtener.

En comparación, los espectros del espectrómetro de mesa contienen mayor cantidad de variables, 861 versus a 299 en el caso del portátil, lo que le brinda mayor información al modelo, y sus espectros aparentemente son de mejor calidad según se observa en el Anexo 54 donde el espectro inicial (sin el pre-tratamiento de la transformación) obtenido del espectrómetro de mesa presenta mayor definición que el obtenido por el espectrómetro portátil el cual presenta fluctuaciones provocadas posiblemente por ruido.

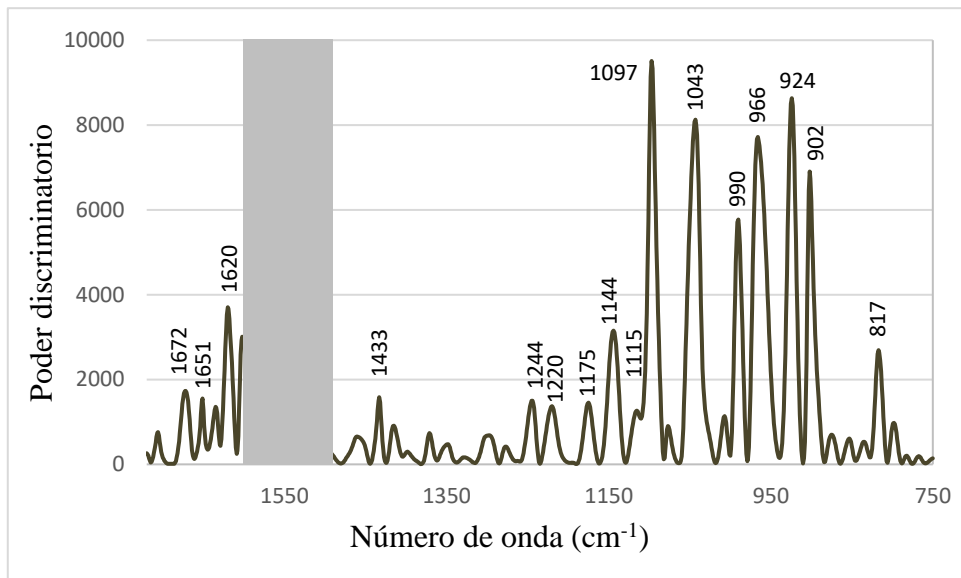
(a): Espectrómetro portátil



Valor mínimo de poder discriminatorio: 2.9

Valor máximo de poder discriminatorio: 1438.6

(b): Espectrómetro de mesa



Valor mínimo de poder discriminatorio: 7.2

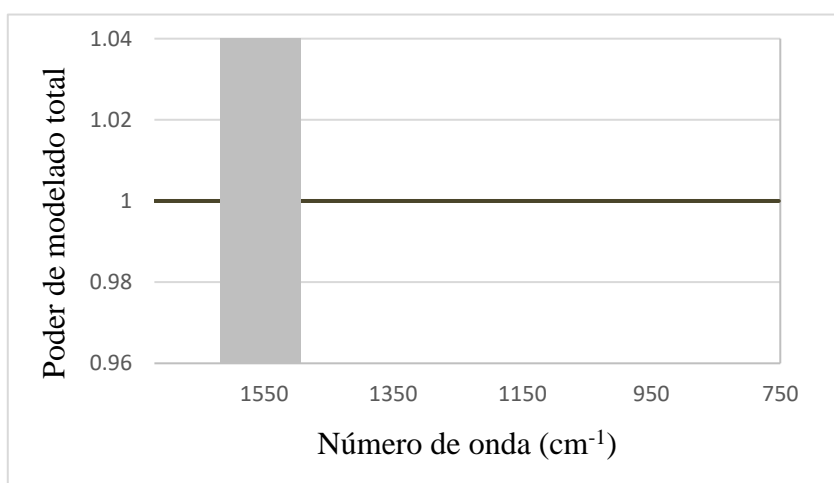
Valor máximo de poder discriminatorio: 9509.4

Figura 17: Poder discriminatorio de la clasificación SIMCA

El poder de modelado total se presenta en la Figura 18 el cual indica el nivel de importancia de las variables (números de onda) en un rango de “0” a “1” cuyo significado es “sin

discriminación” y “discriminación excelente” respectivamente. Se observa tanto en (a) como en (b) que todas las variables usadas resultaron útiles para la clasificación con un nivel de importancia de excelente al obtener un poder de modelado igual a “1” lo que confirma una buena selección de variables y la no presencia de variables que no aporten información para discriminar. Respecto a este parámetro no se observaron diferencias al trabajar con los espectros del espectrómetro portátil y de mesa.

(a): Espectrómetro portátil



(b): Espectrómetro de mesa

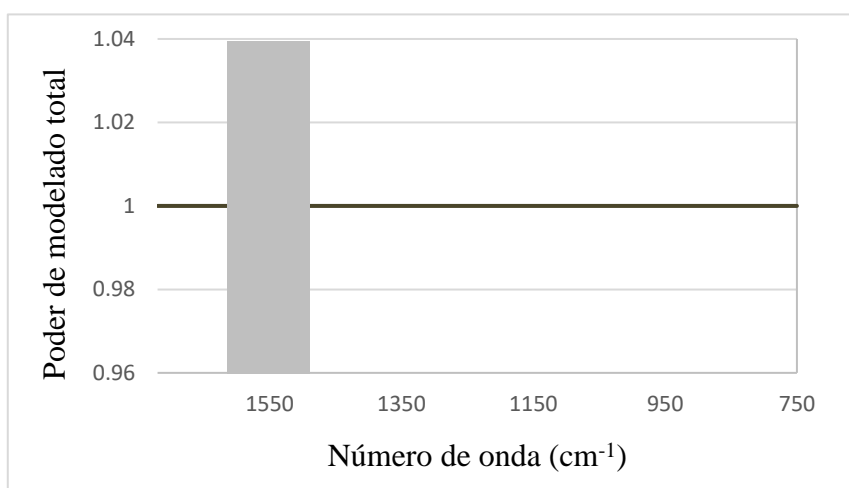


Figura 18: Poder de modelado total de la clasificación SIMCA

La clase predicha se presenta en la Tabla 14 donde se indica para cada muestra del conjunto de entrenamiento la clase a la que es asignada por el modelo, en la opción “Best” se presenta

la clase a la que más se ajusta y en “Next Best” la siguiente clase a la que se ajusta en menor medida (Infometrix, 2014). Se observa tanto en (a) como en (b) que todas las muestras amargas fueron asignadas solamente a la Clase 1 (granos amargos) y todas las muestras desamargadas fueron asignadas solamente a la Clase 2 (granos desamargados) lo que resultó en un valor de Next Best igual a cero indicando que todas las muestras obtuvieron una asignación correcta inequívoca.

Tabla 14: Clase predicha de la clasificación SIMCA

Muestras	(a): Espectrómetro portátil		(b): Espectrómetro de mesa	
	Best	Next Best	Best	Next Best
	Para todos los ecotipos amargos	1	0	1
Para todos los ecotipos desamargados	2	0	2	0

Best: Mejor clase predicha

Next Best: Siguiete mejor clase predicha

“1”: Clase 1 (granos amargos)

“2”: Clase 2 (granos desamargados)

La clasificación incorrecta se muestra en la Tabla 15 la cual funciona como una validación interna del algoritmo para evaluar la autoconsistencia de la clasificación obtenida con el conjunto de entrenamiento. Así, si las muestras y las variables utilizadas son idóneas para el análisis entonces no se produciría una clasificación incorrecta, por lo tanto, el éxito total de clasificación se alcanza al obtener cero muestras por fuera de la diagonal principal (Infometrix, 2014). Se observa tanto en (a) como en (b) que el total de muestras amargas fueron clasificadas en la Clase 1 y que el total de las muestras desamargadas fueron clasificadas en la Clase 2, por lo tanto, en ambos casos se logró una correcta clasificación como producto de una adecuada homogeneidad y representabilidad de las muestras y de un buen nivel de descripción e importancia de las variables. Los estudios de Aykas y Menevseoglu (2021) y Shiroma y Rodriguez (2009) obtuvieron cero errores de clasificación en sus análisis multivariados de los espectros MIR por método SIMCA con resultados favorables de caracterización.

Tabla 15: Clasificación incorrecta de la clasificación SIMCA

	(a): Espectrómetro portátil			(b): Espectrómetro de mesa		
	Pred 1@15	Pred 2@15	Sin coincidencia	Pred 1@15	Pred 2@15	Sin coincidencia
Actual 1	84	0	0	84	0	0
Actual 2	0	84	0	0	84	0

Actual 1: Clase 1

Actual 2: Clase 2

Pred 1@15: Predicción de muestras de la Clase 1 con 15 factores máximos

Pred 2@15: Predicción de muestras de la Clase 2 con 15 factores máximos

Sin coincidencia: indica los falsos negativos

Los resultados del PCA de cada clase se presenta en la Tabla 16 con el número óptimo de factores y el porcentaje de varianza que es explicada por cada factor. Respecto a la comparación entre clases, se observa tanto en (a) como en (b) que el PCA de la Clase 1 obtuvo menor número de factores óptimos que el de la Clase 2, lo que indica que el conjunto de datos de las muestras amargas presentaron menor varianza en su distribución que el de las muestras desamargadas, lo que podría estar asociado al menor CV de los alcaloides totales (39 %) respecto a los alcaloides residuales (58 %) que se obtuvo en el análisis cuantitativos. Respecto a la comparación entre (a) y (b) se observa que el PCA de (a) obtuvo menor número de factores óptimos que el de (b), lo que indica que la información brindada por el portátil presentó menor varianza que el de mesa lo que podría estar asociado a la menor cantidad de variables (números de onda) que presenta es decir a la menor cantidad de información que brinda al análisis.

En base a los resultados presentados, se obtiene que la espectroscopia FT-MIR permite una excelente clasificación SIMCA entre granos amargos y desamargados. Se obtiene mayor eficiencia al trabajar con el equipo de mesa respecto al portátil dado el mayor valor obtenido de ICD, mayor valor de poder discriminatorio, mayor cantidad de variables (números de onda) destacadas por dicha capacidad y por el menor valor de residuos entre clases obtenido con el primero. Pese a dichas diferencias, ambos equipos dieron buenos resultados puesto en ambos casos se obtuvo un ICD mayor a 3, poder de modelado igual a 1 en todas sus variables, totalidad de acierto en clase predicha y en clasificación incorrecta.

Tabla 16: Análisis de componentes principales de la clase amargo y desamargado en la clasificación SIMCA

Parámetro		(a): Espectrómetro portátil	(b): Espectrómetro de mesa
Clase 1 (granos amargos)	Número de factores	3	5
	Porcentaje de varianza acumulado	95.8 %	95.2 %
Clase 2 (granos desamargados)	Número de factores	5	7
	Porcentaje de varianza acumulado	95.7 %	95.5 %

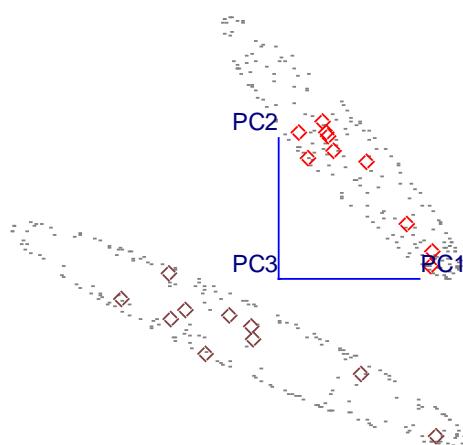
Se tiene el estudio de Fernández *et al.* (2003) quien clasificó tipos de té por su contenido de alcaloides mediante el análisis de cromatogramas por SIMCA con resultados regulares al no lograr la diferenciación para todos los alcaloides. Y el estudio de Rubio *et al.* (2010) con resultados satisfactorios en la clasificación de tomates por su contenido de carotenoides analizando espectros FT-MIR por SIMCA indicando que es una técnica robusta y simple.

4.2.4. Respuesta de predicción de la clasificación SIMCA obtenido con los espectros FT-MIR de los espectrómetros portátil y de mesa

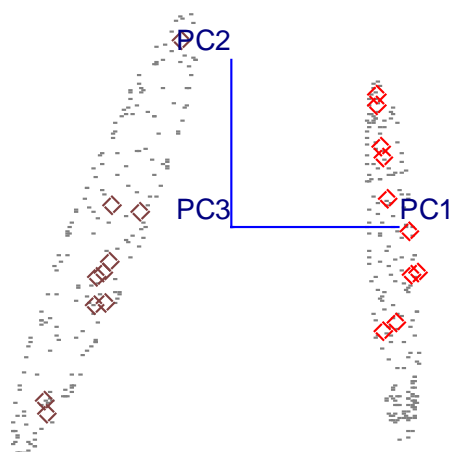
Se realizó la predicción usando como muestras incógnitas a los siguientes ecotipos de granos amargos: A1, A2, A3, A4 y A5, y de granos desamargados: D1, D2, D3, D4 y D47 como se indica en los Anexos 46 y 47. La asignación de una muestra desconocida a una categoría se basa en la comparación de la varianza residual promedio del conjunto de cada categoría con la de la muestra para encontrar similitudes, así, una muestra es atípica cuando su varianza residual excede el límite de cada clase (Lavine, 2000, citado por Rubio *et al.*, 2010).

En la Figura 19 se presenta la ubicación de las muestras incógnitas sobre las proyecciones de clases del modelo SIMCA. Se observa en (a) y (b) que las muestras de tarwi amargo fueron ubicadas dentro del espacio tridimensional de la Clase 1 (granos amargos) y que las muestras de tarwi desmargado fueron ubicadas dentro del espacio tridimensional de la Clase 2 (granos desamargados), ubicando a las incógnitas a su clase correcta conocida.

(a): Espectrómetro portátil



(b): Espectrómetro de mesa



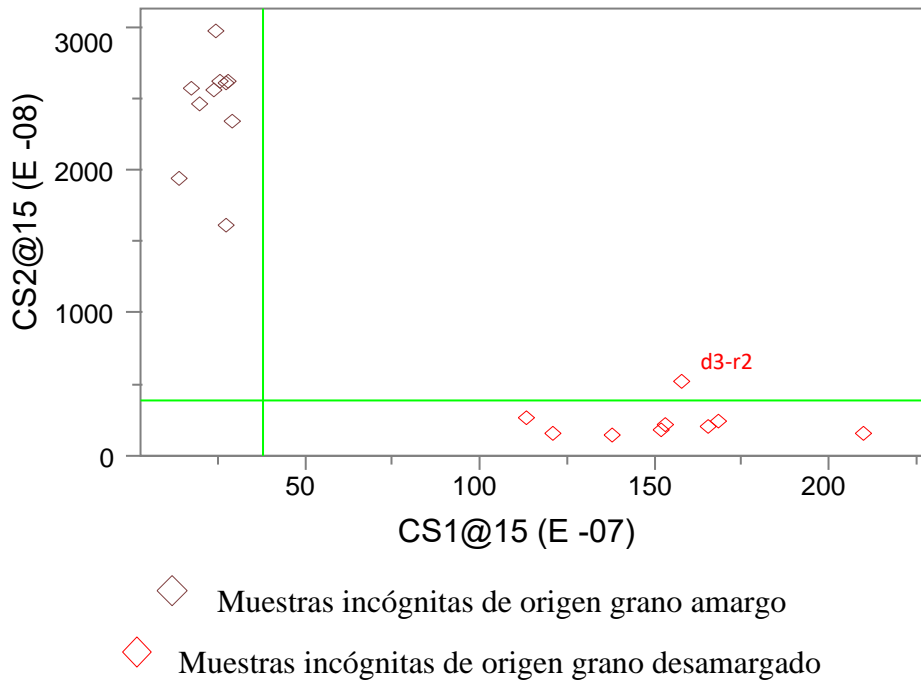
- ◇ Muestras incógnitas de origen grano amargo
- ◇ Muestras incógnitas de origen grano desamargado

Figura 19: Proyecciones de clases de la predicción de la clasificación SIMCA

En la Figura 20 se presenta la ubicación de las muestras incógnitas sobre los cuadrantes de la separación entre clases. Se observa en (a) y (b) que las muestras de tarwi amargo fueron ubicadas dentro del cuadrante de la Clase 1 (granos amargos) y que las muestras de tarwi desamargado fueron ubicadas dentro del cuadrante de la Clase 2 (granos desamargados) excepto por una muestra en el caso de (a) correspondiente al “d3-r2” (muestra desamargada) que fue ubicada en el cuadrante superior derecho, dicha ubicación indica que el algoritmo no le encontró suficiente similitud con el cuadrante de la Clase 2 aunque se encuentra muy cercano.

Así, en (a) la muestra desamargada “d3-r2” puede ser interpretada como un outlier mientras que el resto de las muestras fueron correctamente ubicadas en su cuadrante respectivo. En (b) todas las incógnitas fueron ubicadas en su clase correcta conocida.

(a): Espectrómetro portátil



(b): Espectrómetro de mesa

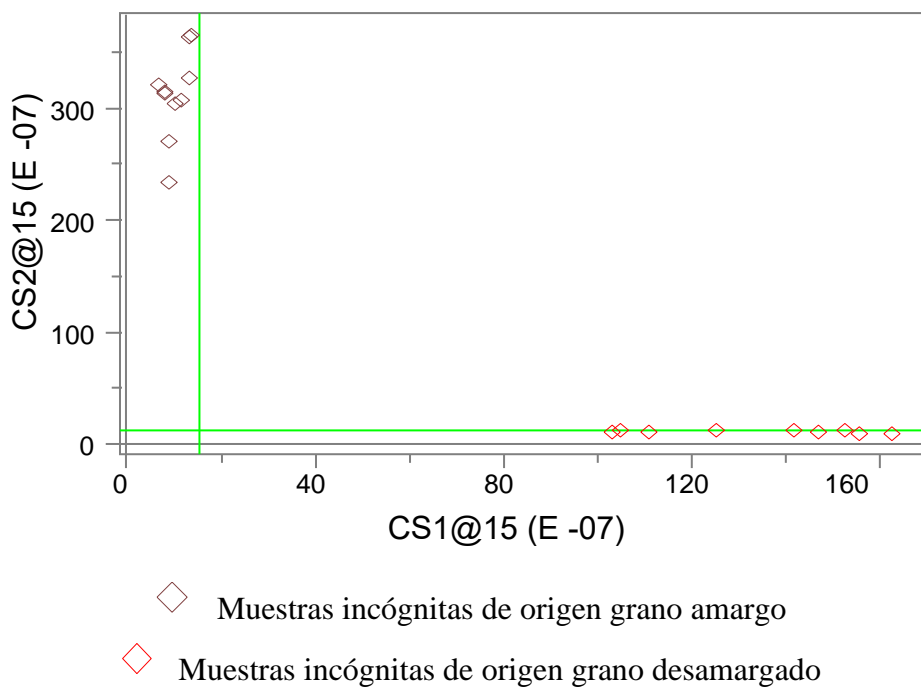


Figura 20: Separación entre clases de la predicción de la clasificación SIMCA

En la Tabla 17 se presenta la clase predicha de las muestras incógnitas. Se obtuvo en (a) y en (b) que las muestras de tarwi amargo se ajustaron a la Clase 1 (granos amargos) y que las muestras de tarwi desamargado se ajustaron a la Clase 2 (granos desamargados) excepto por una muestra en el caso de (a) correspondiente al “d3-r2” que no se ajustó a alguna de las clases. El porcentaje de acierto de la clase predicha fue del 95 % en (a) y del 100 % en (b).

Tabla 17: Clase predicha de la predicción de la clasificación SIMCA y porcentaje de acierto y error

Muestras	(a): Espectrómetro portátil		(b): Espectrómetro de mesa	
	Best	Clase correcta (*)	Best	Clase correcta (*)
Para: a1-r1, a1-r2, a2-r1, a2-r2, a3-r1, a3-r2, a4-r1, a4-r2, a5-r1, a5-r2.	1	1	1	1
Para: d1-r1, d1-r2, d2-r1, d2-r2, d3-r1, d4-r1, d4-r2, d47-r1, d47-r2	2	2	2	2
Para: d3-r2	0	2	2	2
Acierto	95 %		100 %	
Error	5 %		0 %	

Best: Mejor clase predicha

(*): Conocido previamente

“1”: Clase 1 (granos amargos)

“2”: Clase 2 (granos desamargados)

“0”: es a ninguna clase

En la Tabla 18 se presenta la clasificación incorrecta de las muestras incógnitas. Se obtuvo en (a) y en (b) que las muestras de tarwi amargo fueron clasificadas como perteneciente a la Clase 1 (granos amargos) y las muestras de tarwi desamargado fueron clasificadas como pertenecientes a la Clase 2 (granos desamargados) excepto por una muestra en el caso de (a), el cual se asume es el “d3-r2” según lo obtenido anteriormente.

La sensibilidad de predicción es resultado de las muestras que son correctamente clasificadas por lo que es afectado por la presencia de falsos negativos, fue del 95 % en (a) y del 100 % en (b). La selectividad es resultado de las muestras que son correctamente clasificadas como

diferentes a las categorías del modelo por lo que es afectado por la presencia de falsos positivos, fue del 100 % en (a) y (b) tanto para Actual 1 y 2. Por lo tanto, la calidad de predicción fueron buenos y cercanos en ambos pero con ligera superioridad en (b) donde no se obtuvo errores de clasificación en su predicción.

Tabla 18: Clasificación incorrecta de la predicción de la clasificación SIMCA y porcentajes de sensibilidad y de selectividad

	(a): Espectrómetro portátil			(b): Espectrómetro de mesa		
	Pred 1@15	Pred 2@15	Sin coincidencia	Pred 1@15	Pred 2@15	Sin coincidencia
Actual 1	10	0	0	10	0	0
Actual 2	0	9	1	0	10	0
Sin modelar	0	0	0	0	0	0
Sensibilidad		95 %			100 %	
Selectividad Actual 1		100 %			100 %	
Selectividad Actual 2		100 %			100 %	

Actual 1: Clase 1 (granos amargos)

Actual 2: Clase 2 (granos desamargados)

Pred 1@15: Predicción de muestras de la Clase 1 con 15 factores máximos

Pred 2@15: Predicción de muestras de la Clase 2 con 15 factores máximos

Sin coincidencia: indica los falsos negativos

Sin modelar: indica los falsos positivos

Estos resultados van en concordancia con la mejor respuesta de clasificación SIMCA que se obtuvo también al trabajar con el equipo de mesa. Respecto al código D47 fue clasificado dentro de la Clase 2 a pesar de que su contenido de alcaloides residuales, 0.104 %, estuviera fuera del rango de dicha clase (0.007 a 0.072 %). Es decir, que la diferencia entre dichos contenidos de alcaloides no genera una suficiente diferencia de residuos como para detectar una no similitud. Por lo que, asumiendo que el dato cuantitativo es correcto, la predicción SIMCA no detectaría separabilidad a niveles tan pequeños de diferencias, se requiere aumentar la sensibilidad de dicha detección para que el método SIMCA pueda ser estudiado

como posible herramienta analítica que pueda ser aplicada para el aseguramiento de la inocuidad del tarwi.

Algunos estudios sobre respuestas de predicción SIMCA utilizando espectros del MIR son los siguientes mencionados. Casalea *et al.* (2012) identificó la autenticidad de aceites de oliva extra virgen por su contenido de ácidos grasos y obtuvo 43.7 y 91.7 % de especificidad (selectividad) para dos modelos definidos por el lugar de cultivo de las aceitunas mientras que logró obtener hasta 100 % de especificidad (selectividad) usando otras técnicas espectroscópicas (infrarrojo cercano o NIR, luz ultravioleta visible o Uv-Visible).

Aykas y Menevseoglu (2021) obtuvieron 100 % de especificidad (selectividad) y sensibilidad en modelado SIMCA usando espectros FT-MIR de pistachos. Uribe *et al.* (2015) obtuvo 100 % de sensibilidad y 100 % de especificidad (selectividad) en modelado SIMCA usando espectros FT-MIR de grupos de miel diferenciados por la adición de contaminantes.

4.2.5. Respuesta de calibración del contenido de alcaloides mediante análisis multivariado (PLS) de los espectros FT-MIR usando espectrómetro portátil y de mesa

Se realizó la calibración de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) usando los mismos espectros utilizados en el análisis de espectroscopia FT-MIR con SIMCA con la intención de conocer la afinidad de la información espectral con el contenido de alcaloides y determinar en qué medida la clasificación se debe a estos componentes.

La calibración usando los espectros del espectrómetro portátil se realizó con 299 variables (números de onda) y 118 espectros (64 correspondiente a granos amargos y 54 a granos desamargados) (Anexo 55). La calibración usando los espectros del espectrómetro de mesa se realizó con 861 variables (números de onda) y 145 espectros (62 correspondiente a granos amargos y 83 a granos desamargados) (Anexo 56). En total se usó 74 (38 ecotipos amargos y 36 desamargados) y 83 (40 ecotipos amargos y 43 desamargados) muestras de tarwi en la calibración usando equipo portátil y de mesa respectivamente. Estas cantidades son considerables para obtener resultados de una calibración PLS robusta, en comparación a la cantidad de 70 muestras del estudio de Lu *et al.* (2012).

En la Tabla 19 se presenta la respuesta de la calibración PLS que se obtuvo con los espectros del espectrómetro portátil (a) y con el de mesa (b) que constan del SEC, Rcal, SEV y Rval como medidas de la calidad de la calibración. Se obtuvo en (a) y (b) un número óptimo de factores de “2” de acuerdo al mínimo valor que toma el SEV en las gráficas del Anexo 57. Entonces, se puede decir que si el presente modelo trabaja con un solo factor estaría subajustado con dificultad para modelar la totalidad de la variación de la data, mientras que si trabajara con 3 o más factores se generaría un sobre ajuste con tendencia a predicciones engañosas por incluir la varianza del ruido (Bjorsvik y Martens, 2001; Lu *et al.*, 2012), se observa preponderancia a que esto último ocurra en (a) que en (b) debido a la ligera mayor irregularidad en la curva. A dicho número de factores se explica el 99.59 % de varianza de los datos en (a) y 99.36 % de varianza en (b).

Los residuos entre el valor real del contenido de alcaloides introducido en el conjunto de entrenamiento y el valor estimado corresponden a los errores estándar SEC y SEV provenientes de la validación por calibración y de la validación cruzada respectivamente.

En (a) se obtuvo un SEC de 0.85 % y un SEV de 0.86 %. En (b) se obtuvo un SEC de 0.79 % y un SEV de 0.80 %. Los errores estándar de (a) y (b) fueron muy superiores a los resultados del estudio de Lu *et al.* (2012) quien obtuvo un SEV de 0.000088, 0.000183 y 0.000323 % para los alcaloides protopine, palmatine y tetrahydropalmatine respectivamente de una especie de hierba china en la calibración PLS de espectros del infrarrojo cercano (NIR), y menos lejano pero por encima respecto al estudio de Schulz *et al.* (1999) quien obtuvo un SEV de 0.17 y 0.04 % para los alcaloides cafeína y teobromina respectivamente de hojas de té verde en la calibración PLS de espectros NIR. De acuerdo a los resultados de la literatura y a que se debe cumplir con un 0.07 % (b.s.) máximo de alcaloides, se puede decir que el error estándar obtenido es muy alto e inadecuado para la discriminación necesaria en la cuantificación de alcaloides residuales.

Los coeficientes de correlación Rcal y Rval son provenientes de la calibración y validación cruzada respectivamente. En (a) se obtuvo un Rcal y Rval de 0.8749 y 0.8702 respectivamente. En (b) se obtuvo un Rcal y Rval de 0.8997 y 0.8959 respectivamente. En (a) y (b) se obtuvieron valores por debajo de 0.9, lo que significa que la correlación fue moderada y que debe ser mejorada, para ello se podría probar con adición de muestras o repeticiones espectrales para otorgar una data de información más amplia al modelo.

Un valor de coeficiente de correlación de 0.9 a 1 indica que el modelo de regresión es excelente (Urbano *et al.*, 2005, citado por Aykas y Menevseoglu, 2021; Lu *et al.*, 2012). Sin embargo, para que pueda ser considerado como adecuada para aplicaciones de control de la calidad debe ser mayor a 0.92 según Lu *et al.* (2012). Valores de Rval de 0.70 a 0.89 es definido por Llano (2016) como una calibración buena, (a) y (b) obtuvieron valores de Rval en dicho rango.

Los coeficientes de correlación de (a) y (b) fueron inferiores a los resultados encontrados en el estudio de calibración de los espectros del NIR por PLS de los alcaloides protopine, palmatine y tetrahydropalmatine de una especie de hierba china por Lu *et al.* (2012) donde obtuvo un Rcal de 0.99, 0.98 y 0.97 y un Rval de 0.98, 0.96 y 0.97, inferior también respecto al estudio de Schulz *et al.* (1999) quien obtuvo un Rval de 0.97 para cafeína y muy cercano al Rval de 0.86 para teobromina analizados en el NIR por PLS, Wang *et al.* (2017) obtuvo valores de coeficiente de correlación desde 0.9841 a 0.9987 en el estudio de PLS con NIR para cinco alcaloides presentes en la planta *Coptis* considerada medicinal.

Tabla 19: Respuesta de calibración del contenido de alcaloides (%) en b.s. por análisis quimiométrico de los espectros FT-MIR por método PLS

Factores óptimos	Porcentaje de varianza	Valores de calibración		Valores de validación	
		SEC (%)	Rcal	SEV (%)	Rval
(a): Espectrómetro portátil					
2	99.59	0.8508	0.8749	0.8582	0.8702
(b): Espectrómetro de mesa					
2	99.36	0.7911	0.8997	0.7996	0.8959

SEC: Error estándar de calibración

SEV: Error estándar de validación cruzada

Rcal: Coeficiente de correlación de calibración

Rval: Coeficiente de correlación de validación

En la Tabla 19 se obtuvo menor error estándar SEC y SEV y mayor correlación Rcal y Rval en (b) que en (a), lo que indicaría que con el equipo de mesa se obtiene mayor confiabilidad en el modelo de calibración con el contenido de los alcaloides en comparación con el equipo

portátil. Un modelo de regresión es considerado bueno a valores más bajos de SEC y de SEV y valores más altos de Rcal y Rval (Li y He, 2006, citado por Lin *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2012). Estos resultados están en concordancia con la mejor respuesta de clasificación y predicción por método SIMCA que se obtuvo al usar el equipo de mesa respecto al portátil.

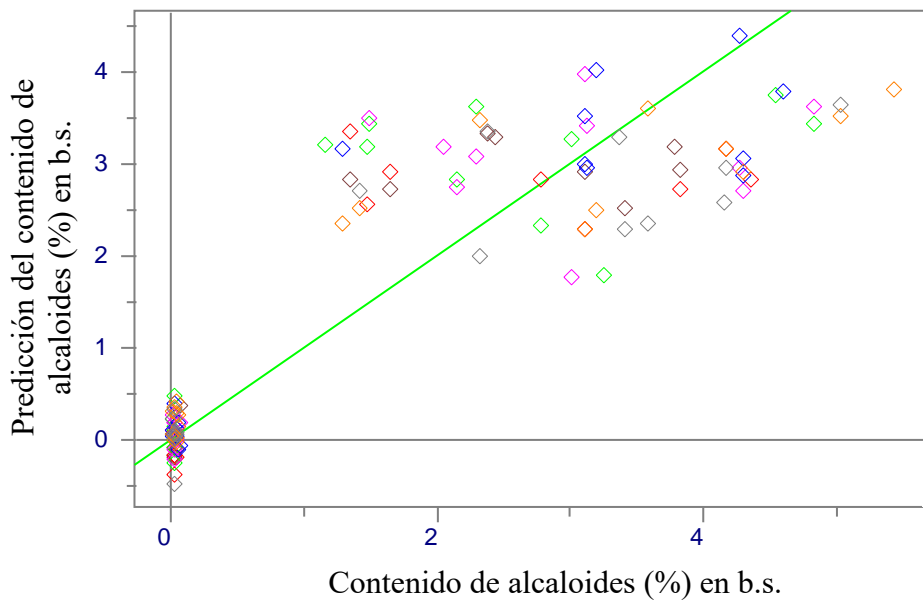
No se tienen estudios previos de espectroscopia FT-MIR junto a calibración PLS en el estudio de alcaloides quinolizidínicos, pero se cuentan con estudios respecto a otros componentes.

Aykas y Menevseoglu (2021) analizaron pistachos adulterados y obtuvieron para los niveles de adulterantes un SEV de 1.25 y 0.50 % para maní y guisante verde respectivamente y un Rval de 0.9 para ambos definiendo a su modelo de predicción como excelente. Kocaoglu *et al.* (2009) analizó la calidad del queso de acuerdo a sus puntajes sensoriales y obtuvo un SEV de 0.04 a 0.29 y un Rval de 0.69 a 0.96 para un total de quince descriptores sugiriendo trabajar con mayor cantidad de muestra para optimizar sus resultados.

Shiroma y Rodríguez (2009) calibró el contenido de grasa y de humedad de papas fritas como parámetros de calidad, obtuvo un SEV de 1.6 % y Rval de 0.96 para grasa, SEV de 0.26 % y Rval de 0.97 para humedad, permitiendo la determinación precisa de dichas características. Casalea *et al.* (2012) al calibrar el contenido de ácido oleico y linoleico en dos variedades de aceites de oliva extra virgen obtuvo que el uso de espectroscopia MIR no fueron útiles para la predicción debido a que las bandas de absorción de dichos analitos no estaban representados en dicha información espectral e indica una mejora de resultados al combinar los datos del MIR, NIR y Uv-Vis.

En la Figura 21 se presenta la relación entre el valor de la predicción con el valor conocido del contenido de alcaloides. Se observa en (a) y en (b) que se forman dos agrupaciones de datos en los extremos de la recta lo que representa una importante diferencia del contenido de alcaloides de las muestras amargas (agrupación de datos del extremo superior) con el de las muestras desamargadas (agrupación de datos del extremo inferior). Es posible que esto haya disminuido la calidad de regresión, por lo que se recomienda para futuras investigaciones trabajar con valores intermedios que cubran dicha falta de información sobre la recta.

(a): Espectrómetro portátil



(b): Espectrómetro de mesa

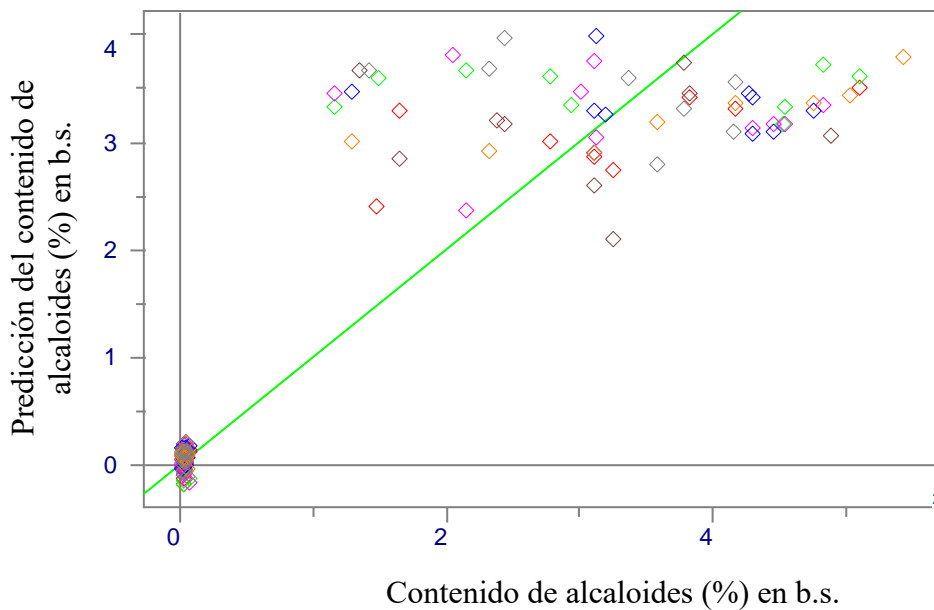


Figura 21: Regresión de la calibración por el método PLS

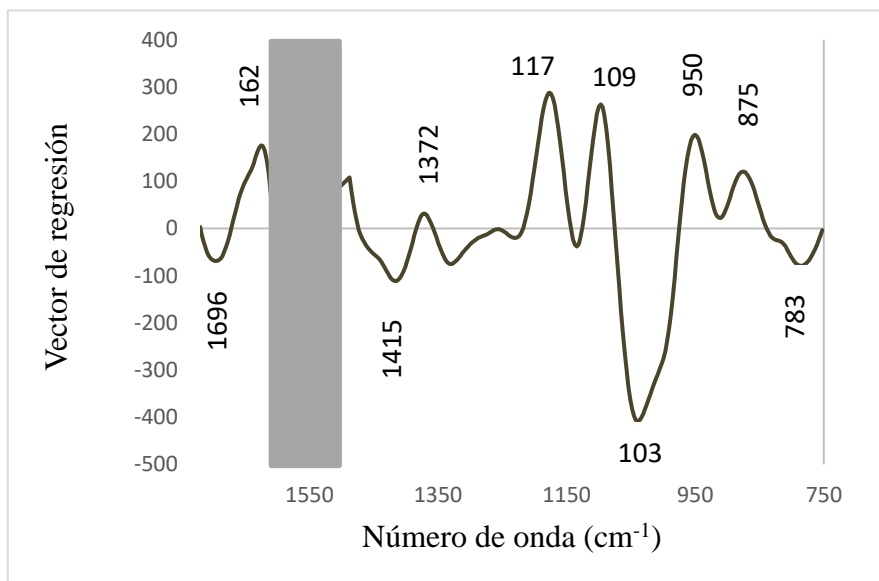
El vector de regresión determinado por el algoritmo PLS se presenta en la Figura 22 el cual indica las variables (números de onda) con mayor importancia para el modelado del contenido de alcaloides (Infometrix, 2014). Se observa una mayor cantidad de variables relacionadas con alcaloides en (b) que en (a), lo mismo que ocurrió en el análisis del poder discriminatorio de la clasificación SIMCA donde hay que tener en cuenta que su análisis fue

en base al cambio de la composición general del tarwi, pero cuya selección de variables se realizó seleccionando las zonas donde se obtendría una mayor respuesta de alcaloides. En (a) se obtuvo diez variables relacionadas con alcaloides las cuales fueron 1696, 1625, 1415, 1372, 1177, 1096, 1039, 950, 875 y 783 cm^{-1} , mientras que en (b) se obtuvo dieciocho las cuales fueron 1695, 1675, 1645, 1617, 1414, 1372, 1175, 1141, 1096, 1074, 1046, 1015, 992, 966, 923, 899, 817 y 799 cm^{-1} .

En la zona de diagnóstico (4000 a 1500 cm^{-1}) de la Figura 22 ambos gráficos coinciden por su proximidad en las siguientes variables relacionadas con alcaloides: 1696 y 1695 en (a) y (b) respectivamente, 1625 y 1617 en (a) y (b) respectivamente. El primer par coincide con la banda 1691 cm^{-1} relacionada a la vibración de los enlaces N–H y C–N de las proteínas del tarwi obtenido en la calibración PLS de espectros FT-MIR por Sabelino (2020), lo que podría sugerir una posible interferencia o una coincidente respuesta de enlaces que comparten ambos compuestos, proteínas y alcaloides, al recordar que las quinolizidinas presentan también en su estructura enlaces entre el C, N e H por su naturaleza nitrogenada. El segundo par está relacionado a la lupanina por la formación de una banda de absorción a los 1620 cm^{-1} en su espectro (ver Figura 13) cuya vibración se presume provenga del grupo carbonilo C=O presente en uno de sus anillos quinolizidínicos (Walczak *et al.*, 1995, citado por Macho, 2002, Jasiewicz *et al.*, 2004) como se discutió en el análisis SIMCA.

En la zona de la huella dactilar (1499 – 450 cm^{-1}) de la Figura 22 ambos gráficos coinciden por su proximidad en las siguientes variables (números de onda) relacionadas con alcaloides: 1415 y 1414 en (a) y (b) respectivamente, 1372 igual en (a) y (b), 1177 y 1175 en (a) y (b) respectivamente, 1096 igual en (a) y (b), 1039 y 1046 en (a) y (b) respectivamente, y 783 y 799 en (a) y (b) respectivamente. El penúltimo par coincide con la banda de absorción formada a los 1100 cm^{-1} del espectro de la esparteína y está cercano a la respuesta del 1077 cm^{-1} del espectro de la lupanina relacionados con el enlace C–N (Baranska y Schulz, 2009). El último par coincide con la banda de absorción formada a los 801 cm^{-1} de los espectros de la lupanina y esparteína (ver Figura 13) relacionado con el enlace N–C–H (Baranska y Schulz, 2009). El resto de pares no coinciden con las bandas de absorción obtenidas en los espectros de los estándares de lupanina y esparteína, al igual que lo analizado en SIMCA, esto puede ser debido a la complejidad de la matriz alimentaria donde la interacción de los alcaloides con el resto de compuestos puede generar cambios en su respuesta de absorción a comparación con el alcaloide estándar.

(a): Espectrómetro portátil



(b): Espectrómetro de mesa

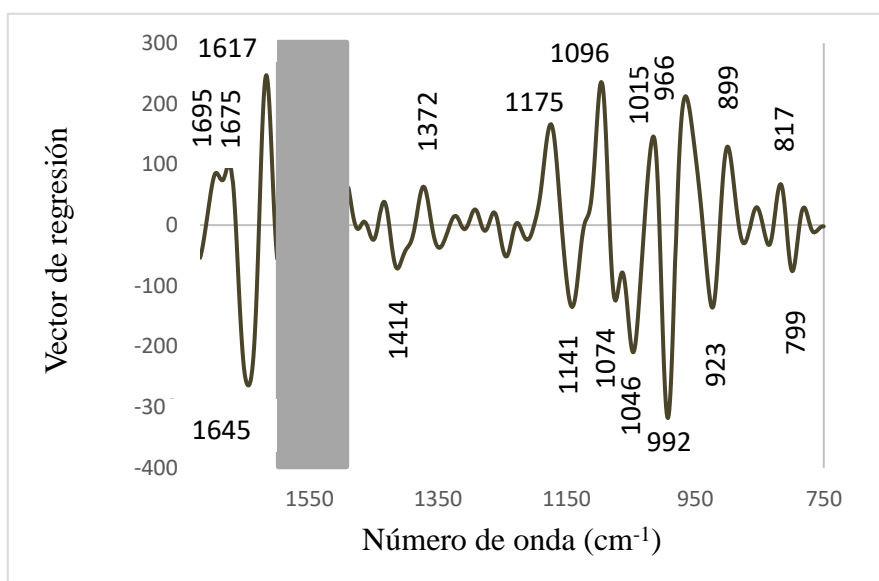


Figura 22: Vector de regresión de la calibración por el método PLS

4.2.6. Comparación entre las zonas espectrales de mayor relevancia para el análisis SIMCA y PLS

En la Tabla 20 se presenta el resumen de las zonas del MIR que resultaron de mayor influencia en los análisis de clasificación SIMCA y de calibración PLS. Se observa una amplia cantidad de variables (números de onda) involucradas en las respuestas de

clasificación y de calibración, de los cuales se podría destacar por su repetición en ambos análisis quimiométricos a las zonas próximas a ~1620, ~1174, ~1095, ~1045 y ~804 cm⁻¹. Por lo tanto, la región espectral del MIR seleccionada para el análisis SIMCA se puede considerar adecuada para ser relacionada con los alcaloides.

Tabla 20: Relación de las zonas de los espectros FT-MIR con mayor poder discriminatorio en SIMCA y de mayor relación de regresión en PLS con las zonas de las bandas de absorción de los estándares de lupanina y esparteína

Zonas de mayor poder discriminatorio en clasificación SIMCA		Zonas de mayor relación de regresión de la calibración PLS		Bandas de la lupanina	Bandas de la esparteína
(a): Espectrómetro portátil	(b): Espectrómetro de mesa	(a): Espectrómetro portátil	(b): Espectrómetro de mesa		
-	-	1696	1695		
-	1672	-	1675		
1665	-	-	-		
-	1651	-	1645		
1613	1620	1625	1617	~ 1620	-
1487	-	-	-		
-	1433	-	-	~ 1451	-
-	-	1415	1414		
-	-	1372	-		
-	-	-	1372		
-	1244	-	-	~ 1259	~ 1261
-	1220	-	-		
1171	1175	1177	1175		
1134	1144	-	1141		
-	1115	-	-	-	~ 1100
1091	1097	1096	1096	~ 1077	~ 1100
-	-	-	1074	~ 1077	-

«continuación»

1053	1043	-	1046	-	~ 1035
-	-	1039	-	-	~ 1035
1013	-	-	1015	-	~ 1035
984	990	-	992		
-	966	-	966		
-	-	950	-		
-	924	-	923		
-	902	-	899		
-	-	875	-		
-	817	-	817	~ 801	~ 801
-	-	-	799	~ 801	~ 801
-	-	783	-		

De esta manera la espectroscopia FT-MIR puede continuar siendo explorada para su uso en técnicas de quimiometría en relación con el contenido de alcaloides. En los Anexos 3 y 4 se presentan el equipo FT-MIR portátil y de mesa respectivamente, usados en el presente estudio. Existe un amplio desarrollo de dichos equipos, presentados en diferentes modelos y especificaciones según su marca (Pekin Elmer, Jasco, Thermo Scientific, Agilent Technologies, Alpha, Lumex, MesuLab, Laboao). Ello permite la continuidad y mejora en los análisis de alimentos de origen vegetal (tarwi) para trabajos en campo (equipos portátiles) y en laboratorios de control de calidad (equipos de mesa) con resultados confiables y que además permiten el análisis de ciertos analitos específicos (alcaloides).

La mayor eficiencia de clasificación, de predicción de clasificación y de calibración obtenida con los espectros del espectrómetro de mesa a comparación del portátil puede ser debido a ciertos factores internos y externos. Respecto a los internos, factores intrínsecos del equipo, está para el equipo de mesa la mayor cantidad de variables (números de onda) con la que construye sus espectros (equipo de mesa construye espectros con 861 variables y el equipo portátil construye espectros con 299 variables) y a la aparente mejor calidad y definición del espectro (observado en el Anexo 54) el cual puede estar influenciado también por la cantidad

de scan aplicado en las lecturas de los espectros (se usó 16 scan para las lecturas con el equipo de mesa y 8 scan para las lecturas con el equipo portátil). Respecto a los factores externos, factores ambientales y de manipulación, está para el equipo de mesa la mayor estabilidad en sus mediciones al no estar sujeto a variaciones de las condiciones ambientales y a movimientos provocados por el transporte del equipo como sí lo está sujeto el equipo portátil al ser trasladado para las mediciones en campo.

V. CONCLUSIONES

1. En la evaluación de la biodiversidad del contenido de alcaloides totales de 49 ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) distribuidos en nueve regiones del Perú se obtuvo un amplio rango de dicho valor, de 1.2 a 6.5 % (b.s.) con promedio de 3.6 % (3.4 % de lupanina y 0.2 % de esparteína), de acuerdo a lo obtenido se identificaron ocho grupos de ecotipos significativamente diferentes ($p < 0.05$): Bajo 1 (1.2 – 1.7 %), Bajo 2 (2 – 2.4 %), Bajo 3 (3 – 3.4 %), Bajo 4 (3.6 – 3.8 %), Intermedio 1 (4.2 – 4.6 %), Intermedio 2 (4.8 – 5.1 %), Alto 1 (5.4 – 5.8 %) y Alto 2 (5.9 – 6.5 %), y de acuerdo a su distribución geográfica de cultivo se identificaron seis regiones significativamente iguales ($p > 0.05$): Puno (4.3 %), Junín (3.4 %), Áncash (3.5 %), Huánuco (3.6 %), Cusco (3.0 %) y La Libertad (3.1 %).
2. En la evaluación del nivel de desmargado del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) aplicando un método de desamargado acuoso se obtuvo que todos los ecotipos (excepto uno) cumplieron con el nivel seguro de consumo permitido para la comercialización en Perú, con un promedio de alcaloides residuales de 0.031 % (b.s.) (0.025 % de lupanina y 0.009 % de esparteína), como consecuencia se obtuvo un alto porcentaje de pérdida de alcaloides cuyo promedio fue de 98.9 % (b.s.) (99.0 % de lupanina y 95.2 % de esparteína).
3. La eficiencia obtenida en la respuesta de clasificación de granos amargos y desamargados de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) mediante el análisis multivariado de los espectros FT-MIR por método SIMCA fue excelente en las condiciones de ensayo, y la respuesta de predicción fue buena. Los resultados obtenidos usando los espectros del equipo de mesa fueron mejores respecto al portátil dada su mayor distancia entre clases donde se obtuvo 32.9 (mesa) y 10.7 (portátil) y su mayor sensibilidad donde se obtuvo 100 (mesa) y 95 % (portátil).

4. La eficiencia obtenida en la respuesta de calibración del contenido de alcaloides del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) mediante el análisis multivariado de los espectros FT-MIR por método PLS fue moderada en las condiciones de ensayo. Los resultados obtenidos usando los espectros del equipo de mesa fueron mejores respecto al portátil dada su menor valor de SEC donde se obtuvo 0.7911 (mesa) y 0.8508 (portátil) y de SEV donde se obtuvo 0.7996 (mesa) y 0.8582 (portátil), y su mayor valor de Rcal donde se obtuvo 0.8997 (mesa) y 0.8749 (portátil) y de Rval donde se obtuvo 0.8959 (mesa) y 0.8702 (portátil). Valores que pueden ser mejorados con la inclusión de muestras con contenido de alcaloides más variados. Esta calibración realizada con el algoritmo PLS demostró que la región espectral utilizada, que fue la misma para el algoritmo SIMCA, sí está relacionada con el contenido de alcaloides.

5. La exploración de la aplicación de la espectroscopia FT-MIR en análisis multivariados en relación con el contenido de alcaloides de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) ha permitido la obtención de resultados de carácter cualitativo y cuantitativo con información coherente y relevante pero que aún requiere ser optimizada. Dichos resultados permiten ser una base a futuras investigaciones dado el potencial de dicha técnica (FT-MIR) de poder ser una alternativa confiable de mayor facilidad de uso, menor tiempo de operación, menor costo, no requerimiento de personal altamente calificado, sobre los tradicionales métodos cromatográficos que son acompañados por un proceso de extracción química del analito y que son de alta complejidad de aplicación y de elevado costo monetario y de tiempo. Se brindó información con el cual el analista puede evaluar la idoneidad para el uso del equipo portátil o de mesa de acuerdo a su aplicación entendiendo que la ventaja del primero es su facilidad de transporte para determinaciones en el momento y lugar donde se encuentran las muestras y que la ventaja del segundo es su mayor sensibilidad en las respuestas de los análisis multivariados.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda revisar la metodología de extracción química de alcaloides a fin de optimizar los tiempos y formas de ejecución de las operaciones manuales, para mejorar la precisión en los resultados de las repeticiones que pueden ser posiblemente alterados debido a las numerosas operaciones y a la ejecución manual de muchas de ellas que el método comprende.
- Se recomienda la cuantificación de alcaloides en más grupos de ecotipos homogéneamente distribuidos en diversas regiones del Perú para complementar la reducida data con que se cuenta hasta la actualidad, con el fin de contar con una vasta información que permita la exploración del tarwi en materia de optimización de procesos de desamargado, alternativas de uso en la industria alimentaria, tratados de comercialización, mejoramiento genético, uso de los alcaloides quinolizidínicos presentes en el agua de lavado por sus efectos en el control de plagas, y de otras áreas de interés.
- Se recomienda la obtención de espectros FT-MIR de muestras con distintos números de días en la etapa de lavado del proceso de desamargado acuoso, y así obtener muestras con una mayor variabilidad en el contenido de alcaloides, para discriminar muestras por método SIMCA de acuerdo a su nivel de desamargado como posible aporte en el monitoreo del proceso de desamargado acuoso.
- Se recomienda la obtención de espectros FT-MIR de muestras con distintos números de días en la etapa de lavado del proceso de desamargado acuoso, y así obtener muestras con una mayor variabilidad en el contenido de alcaloides, para mejorar la calidad de regresión en el análisis de calibración del contenido de alcaloides por método PLS como posible aporte de una técnica analítica confiable en la determinación de alcaloides totales y sobretodo de alcaloides residuales dada su importancia para el consumo inocuo del tarwi.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abeshu, Y.; Kefale, B. (2017). Effect of Some Traditional Processing Methods on Nutritional Composition and Alkaloid Content of Lupin Bean. *Journal of Natural Sciences Research*, 7(21), 17-21. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/234657566.pdf>
- Alva, J.; Chicata, A.; Delfín, Y.; Muller, N.; Rojas, Y. (2013). Planeamiento estratégico del tarwi. (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Católica Del Perú. Recuperado de: http://dalessio.pearsonperu.pe/el_proceso_estrategico_3/recursos/2_tarwi_de_peru.pdf
- Anuario de Estadísticas Ambientales. (2013). Capítulo Territorio y Suelos. Recuperado de: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1140/cap01.pdf
- Aykas, D.; Menevseoglu, A. (2021). A rapid method to detect green pea and peanut adulteration in pistachio by using portable FT-MIR and FT-NIR spectroscopy combined with chemometrics. *Food Control*, 121, 107670. Doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107670
- Baranska, M.; Schulz, H. (2009). Determination of alkaloids through infrared and raman spectroscopy. En: *The Alkaloids: Chemistry and Biology. Spectroscopy* 67, 217-255. Doi: 10.1016/S1099-4831(09)06704-2
- Bjorsvik, H.; Martens, H. (2001). Data analysis: calibration of NIR instruments by PLS regression. En Burns y Ciurczak, *Handbook of near-infrared analysis* 27, 185-208. Practical spectroscopy series. Editorial Marcel Dekker, Inc. Recuperado de:

https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=XkALgZVXxQQC&oi=fnd&pg=PA185&dq=PLS+CALIBRATION+ANALYSIS+factors+optimal&ots=l-frCXK7Uq&sig=WtvwmqT9Nc7_LC4ap4oWokyGKa0&redir_esc=y#v=onepage&q=PLS%20CALIBRATION%20ANALYSIS%20factors%20optimal&f=false

Boqué, R. (2004). El límite de detección de un método analítico. Técnicas de laboratorio, 296, 878-81. Recuperado de: <http://rodi.urv.es/quimio/general/lod.pdf>

Boschin, G.; Annicchiarico, P.; Resta, D.; D'Agostina, A.; Arnoldi, A. (2008). Quinolizidine alkaloids in seeds of Lupin genotypes of different origins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(10), 3657-3663. Doi: 10.1021/jf7037218

Brereton, R. (2003). Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons. Recuperado de: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=2VMhevgIAIwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Chemometrics+Data+Analysis+for+the+Laboratory+and+Chemical+Plant&ots=0zjZWb0zpL&sig=DRhaX5jQgKoJ_cZVbhlK-6-p6AE&redir_esc=y#v=onepage&q=Chemometrics%20Data%20Analysis%20for%20the%20Laboratory%20and%20Chemical%20Plant&f=true

Bruneton, J. (1993). Farmacología: fitoquímica, plantas medicinales. Editorial Acribia, S.A. Segunda edición. Recuperado de: https://tejadarossi.files.wordpress.com/2017/01/farmacognosia_bruneton.pdf

Bunsupa, S.; Saito, K.; Yamazaki, M. (2013). Molecular biology and biotechnology of quinolizidine alkaloid biosynthesis in Leguminosae plants. Biotechnology for Medicinal Plants, Recuperado de: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=molecular+biology+and+biotechnology+of+quinolizidine+alkaloid+biosynthesis+in+leguminosae+plants&btnG=

Caicedo, C.; Peralta, E. (2001). El cultivo de chocho *Lupinus mutabilis Sweet*: Fitonutrición, enfermedades y plagas, en el Ecuador. Boletín Estación Experimental Santa Catalina

Programa Nacional de Leguminosas, 103, por FUNDACYT e INIAP. Recuperado de: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/444/4/iniapscbt103.pdf>

Caicedo, C; Peralta, E; Villacrés, E; Rivera, M. (2001). Poscosecha y mercado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) en Ecuador. Publicaciónn miscelánea 105. Programa Nacional de Leguminosas Estación Experimental Santa Catalina, por FUNDACYT e INIAP. Recuperado por: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2700/1/iniapscpm105.pdf>

Carrión, J.; Villacrés, E.; Peralta, E.; Ramos, M. (2008). Reutilización del efluente del desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Recuperado de: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2766/1/iniapscR2008v17n1p85.pdf>

Carvajal, F.; Van, M.; Koziol, M.; Nout, M.; Linnemann, A. (2013). Effect of processing on the diffusion of alkaloids and quality of *Lupinus mutabilis Sweet*. Journal of Food Processing and Preservation 38 (2014), 1461-1471. Doi:10.1111/jfpp.12105

Carvajal-Larenas, F.; Linnemann, A.; Nout, M.; Koziol, M.; Van, M. (2015). *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology and Debittering. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(9), 1454-1487. Doi: 10.1080/10408398.2013.772089

Casalea, M.; Oliveri, P.; Casolino, C.; Sinelli, N.; Zunin, P.; Armanino, C.; Forina, M.; Lanteri, S. (2012). Characterisation of PDO olive oil *Chianti Classico* by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques. Analytica Chimica Acta, 712, 53-63. Doi: 10.1016/j.aca.2011.11.015

Chirinos-Arias, M. (2015). Andean Lupin (*Lupinus mutabilis Sweet*) a plant with nutraceutical and medicinal potencial. Revista Bio Ciencias 3(3): 163-172.

Cortés, P; Tarvainen, M; Pekka, J; Glorio, P; Yang, B; Repo, Ritva. (2020). Profile and content of residual alkaloids in ten ecotypes of *Lupinus mutabilis Sweet* after aqueous debittering process. Plant Foods for Human Nutrition, 75(2), 184-191

- Currie, L.I. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*, 67(10), 1699-1723. Doi: 10.1351/pac199567101699
- Cutipa, 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 ingeniería). Universidad Nacional Del Altiplano. Recuperado de: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3421/Cutipa_Huarcaya_Willy.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Daoud, S.; Bou-Maroun, E.; Dujourdy, L.; Waschatko, G.; Billecke, N.; Cayot, P. (2019). Fast and direct analysis of oxidation levels of oil-in-water emulsions using ATR-FTIR. *Food Chemistry* 293, 307-314. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.005>
- De la Cruz, N. (2018). Caracterización fenotípica y de rendimiento preliminar de ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*), bajo condiciones del callejón de huaylas Áncash. (Tesis de Ingeniería). Universidad Nacional La Molina. Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3727/delacruz-delacruz-nestor-jesus.pdf?sequence=1>
- Dos Santos, H.; De Oliveira, A.; De Melo, P.; Freitas, W.; Rodriguez, A. (2012). Chemometrics: Theory and application. En Valim L. y Rodriguez A. (Eds.), *Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*. Book on Demand, (p. 121-132). Rijeka, Croatia: Editorial IntechOpen. Recuperado de: https://books.google.com.pe/books?id=KfqdDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true
- Efenberger, M; Nowak, A; Kregiel, D. (2017). Implementation of chemometrics in quality evaluation of food and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1747-1766. Doi:10.1080/10408398.2016.1276883

- Erbas, M. (2010). The effects of different debittering methods on the production of lupin bean snack from bitter *Lupinus Albus L.* Seeds. *Journal of Food Quality* 33 (2010) 742-757. Doi: 10.1111/j.1745-4557.2010.00347.x
- FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1982). El cultivo y la utilización del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*). *Plant production and protection papers*, 36, 1-236.
- Fernández, P.; López, A.; Pablos, F.; Gonzáles, A.; Martín, M. (2003). The use of catechins and purine alkaloids as descriptors for the differentiation of tea beverages. *Microchim Acta* 142, 79-84. Doi: 10.1007/s00604-003-0002-8
- GC y GC/MS. Su recurso imprescindible para columnas y consumibles. (2014). Catálogo esencial de cromatografía y espectroscopia. Agilent Technologies, 5991-5213ES. Recuperado de: <https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5991-5213ES.pdf>
- Gross, R; Von, E.; Koch, F; Marquard, R; Trugo, L; Wink, M. (1988). Chemical Composition of a New Variety of the Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with Low-Alkaloid content. *Journal of food composition and analysis* 1, 353-361.
- Guerrero, A. (1999). Cultivos herbáceos extensivos. Barcelona, España. México: Mundi-Prensa. Recuperado de: https://books.google.com.pe/books?id=ImiIbPnsKr0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Gutiérrez, A.; Infantes, M.; Pascual, G.; Zamora, J. (2016). Evaluación de los factores en el desmargado de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*). *Agroindustrial Science*, 6(1), 145-149. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/312397430_Assessment_of_the_factors_in_the_debittering_of_tarwi_Lupinus_mutabilis_Sweet
- Gutiérrez, G.; Barbosa, G. (2003). *Food Science and Food Biotechnology* (p. 274). Boca Ratón: CRC Press. Recuperado de:

https://books.google.com.pe/books?id=jaiYC60XSgAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Hatzold, T.; Elmadfa, I.; Gross, R. (1983a). Edible oil and protein concentrate from *Lupinus mutabilis*. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition.*, 32(2), 125-132. Doi: 10.1007/BF01091333

Hatzold, T.; Elmadfa, I.; Gross, R.; Wink, M.; Hartmann, T.; Witte L. (1983b). Quinolizidine Alkaloids in Seeds of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(5), 934-938. Doi: 10.1021/jf00119a003

Herrera, V.; Ticona, J.; Udaeta, E.; Chuqui, R.; Giménez, A. (2008). Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. *Biofarbo* 16, 47-53. Recuperado de: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/06/997955/validacion-del-metodo-analitico-para-la-cuantificacion-de-alcal_dGGr8VQ.pdf

Huamán, H.; Choccare, A. (2017). Tratamiento del agua residual del desamargado del tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante resinas de intercambio iónico. (Tesis de ingeniería). Universidad Nacional del Callao. Recuperado de: http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/UNAC/3182/Huaman%20Torrejon%20y%20Choccare%20Huisa_Tesis%20Preg_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Huyghe, C. (1997). White lupin (*Lupinus albus L.*). *Field Crops Research*, 53(1-3), 147-160. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378429097000282>

Infometrix. (2014). *Pirouette Multivariate Data Analysis Software*. Versión 4.5.

Ismael, B.; Nielsen, S. (2010). *Basic Principles of Chromatography*. En Nielsen S.S. (Eds.), *Food Analysis, Food Science Texts Series*, (p. 475-498). West Lafayette, USA: Editorial Springer Science+Business Media, LLC 2010. Doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1

- Jacobsen, S.; Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los andes centrales*, 28(1), 458-482. Recuperado de: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>
- Jacobsen, S.; Mujica, A. (2008). Geographical distribution of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis Sweet*). *Plant Genetic Resources Newsletter* (Roma, Italia), 155: 1-8. Recuperado de: http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/NL_155_complete.pdf#page=5
- Jasiewicz, B.; Boczón, W.; Kurek, J. (2004). Synthesis and conformational analysis of new 17-alkyl derivatives of lupanine and their perchlorate salts. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 69(11), 2068-2080. Doi: <https://doi.org/10.1135/cccc20042068>
- Kocaoglu, N.; Eliardi, A.; Drake, M.; Rodriguez, L.; Harper, W. (2009). Rapid profiling of swiss cheese by attenuated total reflectance (ATR) infrared spectroscopy and descriptive sensory analysis. *Journal of food science*, 74(6), 232-239. Doi: [10.1111/j.1750-3841.2009.01188.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01188.x)
- Koleva, I.; Van Beek, T.; Soffers, A.; Dusemund, B.; Rietjens, I. (2011). Alkaloids in the human food chain – Natural occurrence and possible adverse effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(1), 30-52. Doi: [10.1002/mnfr.201100165](https://doi.org/10.1002/mnfr.201100165)
- Llano, P. (2016). Desarrollo y validación de modelos quimiométricos cuantitativos para la predicción del perfil de ácidos grasos en leche. (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo. Recuperado de: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/39005/TFM_Pablo%20Llano%20Su%20C3%A1rez.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- Lee, H.-W.; Hwang, I.-M.; Lee, H.; Yang, J.-S.; Park, E.; Choi, J.; Seo, H.; Kim, S. (2019). Validation and Determination of Quinolizidine Alkaloids (QAs) in Lupin Products by Gas Chromatography with flame ionization detection (GC-FID). *Analytical Letters*, 1-8. Doi: [10.1080/00032719.2019.1661423](https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1661423)

- Lin, C.; Chen, X.; Jian, L.; Shi, C.; Jin, X.; Zhang, G. (2014). Determination of grain protein content by near-infrared spectrometry and multivariate calibration in barley. *Food Chemistry* 162, 10-15. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.056
- Lock, O. (1994). *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*. Perú. Segunda edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Recuperado de: <https://books.google.com.pe/books?id=N36g2QOccXkC&pg=PA212&dq=estructura+molecular+de+la+esparte%C3%ADna+fitoquimica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj0nt3K6ujpAhW2ILkGHYH6D-YQ6AEIJjAA#v=onepage&q&f=true>
- López, P.; López, L.; Cerda, V.; Armador, J. (2006). Simultaneous determination and classification of riboflavin, thiamine, nicotinamide and pyridoxine in pharmaceutical formulations, by UV-Visible spectrophotometry and multivariate analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(4), 715-722. Doi:10.1590/S0103-50532006000400012
- Lu, H.; Wang, S.; Cai, R.; Meng, Y.; Xie, X.; Zhao, W. (2012). Rapid discrimination and quantification of alkaloids in *Corydalis Tuber* by near-infrared spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 59, 44-49. Doi: 10.1016/j.jpba.2011.09.037
- Lucio, J. (2012). *Aplicación de métodos quimiométricos para la caracterización y control de calidad de plantas medicinales*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2011/hdl_10803_96257/jrlg1de1.pdf
- Macho, S. (2002). *Metodologías analíticas basadas en espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariante. Aplicación a la industria petroquímica*. (Tesis doctoral). Universidad Rovira Virgili. Recuperado de: <http://repositori.urv.cat/fourrepopublic/search/item/TDX%3A759?label=Metodolog%C3%ADas+anal%C3%ADticas+basadas+en+espectroscopia+de+infrarrojo+y+ca>

- Moncayo, S. (2017). Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos para el estudio de muestras mediante Espectroscopia de Ablación Láser (LIBS). (Tesis doctoral). Universidad Complutense Madrid. Recuperado de: <https://eprints.ucm.es/42642/1/T38776.pdf>
- Mongay, C. (2005). Quimiometría. Edit. Universitat de Valencia. Recuperado de: <https://books.google.com.pe/books?id=3oix-tIRPAUC&printsec=frontcover&dq=QUIMIOMETRIA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewig7P6qmavqAhVMllkGHwxPB4YQ6AEwAHoECAQQAg#v=onepage&q=fitoqu%C3%ADmico&f=false>
- Muzquiz, M.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; De La Cuadra, C. (1993). Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas. I: Alcaloides. Inv Agraria. Producción y Protección Veg., 8(3), 351-361. Recuperado de: https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:pASRp3_EHa8J:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5
- Muzquiz, M.; Cuadrado, C.; Ayet, G.; De la Cuadra, C.; Burbano, C.; Osagie, A. (1994). Variation of Alkaloid Components of Lupin Seeds in 49 Genotypes of *Lupinus albus* L. from Different Countries and Locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(7), 1447-1450. Doi: 10.1021/jf00043a011
- Nielsen, S. (2010). Food Analysis. Food Science Texts Series. Doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1
- Norma Técnica Peruana. (2018). NTP 205.090. Leguminosas. Tarwi o chocho. Grano desamargado. Requisitos y método de ensayo. Lima. Perú. INACAL.
- Nota técnica de granos andinos. (junio, 2018). Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) (pp. 1-10). Perú: Dirección General de Políticas Agrarias / Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria.

- Ordóñez, J. L. (2012). Espectro electromagnético y espectro radioeléctrico. Manual formativo de ACTA, (62), 17-31. Recuperado de: https://www.acta.es/medios/articulos/ciencias_y_tecnologia/062017.pdf
- Ortega, E.; Rodríguez, A.; David, A.; Zamora, A. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. Acta Agronómica, 59(1), 111-118. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1699/169916223012.pdf>
- Peinado, A. (2005). Aplicación y desarrollo de técnicas quimiométricas para el seguimiento de fermentaciones alcohólicas. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/handle/10803/3229#page=1>
- Penner, M. (2010). Basic Principles of Spectroscopy. En Nielsen S. S. (Eds.), Food Analysis, Food Science Texts Series, (p. 375-385). West Lafayette, USA: Editorial Springer Science+Business Media, LLC 2010. Doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1
- Porcel, M. (2002). Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/handle/10803/3118#page=1>
- Pothier, J.; Cheav, S.; Galand, N.; Dormeau, C.; Viel, C. (1998). A comparative study of the effects of sparteine, lupanine and lupin extract on the central nervous system of the mouse. Revista de Farmacia y Farmacología, 50(8), 949-954. Doi: 10.1111 / j.2042-7158.1998.tb04013.x
- Qian, M.; Peterson, D.; Reineccius, G. (2010). Gas Chromatography. En Nielsen S.S. (Eds.), Food Analysis, Food Science Texts Series, (p. 515-536). West Lafayette, USA: Editorial Springer Science+Business Media, LLC 2010. Doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1
- Quintero, A.; Ayala, C.; Galignani, M.; Quiroz, C.; Brunetto, M.; Delgado, Y. (2016). Determinación de fosfatos en fertilizantes mediante espectroscopia en el infrarrojo

medio por transformadas de Fourier en modo Reflectancia Total Atenuada. Avances en Química de la Universidad de los Andes, 11(3). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/933/93349879001/html/index.html>

Quispe, D. (2015). Composición nutricional de diez genotipos de Lupino (*L. mutabilis* y *L. albus*) desamargados por proceso acuoso. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperada de: http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1816/Q04_Q8_T%20BAN%20UNALM.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ramos, J.; Del-Águila, V.; Bazalar, A. (2000). Estadística básica para los negocios. Universidad de Lima. Fondo Editorial. Recuperado de: https://repositorio.ulima.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12724/10771/Ramos_Estadistica_basica_de_los_negocios.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ringuelet, J.; Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. Argentina. Primera edición. Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata. Recuperada de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27885>

Rodríguez, A. (2009). Evaluación “in vitro” de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de desamargado del chocho (*lupinus mutabilis Sweet*). (Tesis profesional bioquímica). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/219/1/56T00193.pdf>

Rodríguez, S. (2014). Predicción de la composición elemental de fracciones del proceso de delayed coking de fondos de vacío de crudos colombianos empleando espectroscopia de fluorescencia y métodos quimiométricos. (Tesis para el título de Química). Universidad Industrial de Santander. Recuperado de: <http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2014/152138.pdf>

Rubio-Díaz, D.; De Nardo, T; Santos, A; de Jesus, S; Francis, D; Rodriguez-Saona, L. (2010). Profiling of nutritionally important carotenoids from genetically-diverse tomatoes by infraed spectroscopy. Food Chemistry 120(1), 282-289. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.06

- Ruiz, J. (1995). Composición química y determinación de alcaloides en tres especies silvestres de *Lupinus L.* (Leguminosae) de Jalisco. (Tesis de ingeniería). Universidad de Guadalajara. Recuperada de: http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/411/Ruiz_Moreno_J_Jesus.pdf?sequence=1
- Rustom, A.; Espinoza, A.; Fernández, L.; Mansilla, M. (2012). Estadística descriptiva, probabilidad e inferencia: Una visión conceptual y aplicada. Recuperado de: http://up-rid2.up.ac.pa:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1569/Rustom_Antonio_Estadistica_descriptiva.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sabelino, Z. (2020). Modelos de calibración del contenido de proteína y fenólicos totales usando espectroscopia del infrarrojo medio en tarwi (*Lupinus mutabilis*). (Tesis de ingeniería). Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperada de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/4428/sabelino-francia-zuly-del-pilar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Schoeneberger, H.; Gross, R.; Cremer, H.; Elmadfa, I. (1982). Composition and Protein Quality of *Lupinus mutabilis*. *The Journal of Nutrition*, 112(1), 70-76. Doi: <https://doi.org/10.1093/jn/112.1.70>
- Schulz, H.; Engelhardt, U.; Wegent, A.; Drews, H.; Lapczynski, S. (1999). Application of near-infrared reflectance spectroscopy to the simultaneous prediction of alkaloids and phenolic substances in Green tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5064-5067. Doi: 10.1021/jf9813743
- Shiroma, C.; Rodriguez, L. (2009). Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 596-605. Doi: 10.1016/j.jfca.2008.09.003
- Skolik, J.; Krueger, P.; Wiewiorowski, M. (1968). Correlation between the stereochemistry of quinolizidine alkaloids and their infrared spectra from 2840-2600 cm^{-1} .

Tetrahedron 24 (15), 5439-5456. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96339-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96339-2)

Skoog, D.; Holler, J.; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. Ed. 6. Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. Recuperado de: https://www.academia.edu/37326567/Principios_de_an%C3%A1lisis_instrumental_6ta_Edici%C3%B3n_Douglas_A._Skoog_LIBROSVIRTUAL

Skoog, D.; West, D.; Holler, F.; Crouch, R. (2005). Espectroscopia de Absorción Infrarroja. Fundamentos de química analítica, Ed. 8. Editorial Paraninfo, S. A.

Smith, J. (2010). Evaluation of Analytical Data. Food Analysis, 53-67. Doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1_4

Sogorb, M.; Vilanova, E. (2004). Técnicas analíticas de contaminantes químicos.: aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. Ediciones Díaz de Santos. Recuperado de: <https://books.google.com.pe/books?id=N-lvCQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

Stashenko, E.; Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Scientia Chromatographica, 2(1), 29-47. Recuperado de: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a3.pdf>

Suca, G; Suca C. (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.

Talavera, I.; Bustio, L.; Coma, Y.; Hernández, N. (2013). Quimiometrix II, una plataforma automatizada para el procesamiento multivariante de datos químicos y bioquímicos. Experiencias de aplicación. Revista Cubana de Química, 25(3), 257-265. Recuperada de: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543736001.pdf>

- Tapia, M. E. (2015). El tarwi, lupino andino. Tarwi, tauri o chocho. (pp 1-85). Perú. Recuperada de: <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>
- Tapia, M. (s.f.). Los granos andinos en la historia. Perú. Universidad Global del Cuzco. Recuperado de: <http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/vii-congreso-quinua/ejes-tematicos/recursos-geneticos/los-granos-andinos-en-la-historia-per%C3%BA.pdf>.
- Trugo, L. (2016). Lupin Breeding. Reference Module in Food Science (2nd ed.) 2, 174-182. Doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.00211-0
- Taverniers, I.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry, 23(8), 535-552. Doi: 10.1016/j.trac.2004.04.001
- Uribe, K.; Gallardo, T.; Osorio, G.; Almaraz, N. (2015). Factibilidad del uso de modelos de clasificación SIMCA para la detección de oxitetraciclina y sulfatiazol en miel de abeja. XII Encuentro de participación de la mujer en la ciencia. Recuperado de: http://congresos.cio.mx/memorias_congreso_mujer/archivos/extensos/sesion3/S3-BCA20.pdf
- Van, M.; Botha, A.; Ntsasa, N.; Tshilongo, J.; Leshabane, N. (2009). Towards the simultaneous detection of the low nmol/mol range of CO, CH₄ and CO₂ in nitrogen using GC-FID. Accreditation and quality assurance, 14(12), 665-670. Doi: 10.1007/s00769-009-0580-1
- Vásquez, V.; Salhuana, J.; Alvarado, M.; Ludeña, A.; Jiménez, L. (2019). Empleo de tres métodos de desamargado a través de la evaluación sensorial de harina y pan de *Lupinus mutabilis* Sweet. Agroindustrial Science, 9(1), 53-59. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7023241>
- Ventura, J. (2006). Desarrollo de métodos analíticos medioambientalmente sostenibles por espectrometría FTIR. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia. Recuperado de:

<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10253/ventura.pdf;jsessionid=67C676DDA83CEC7A00E7B4B85FB69C24?sequence=1>

Villacrés, E.; Rubio, A.; Egas, L.; Segovia, G. (2006). Usos Alternativos del chocho. chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) alimento andino redescubierto. Quito, Ecuador. Boletín Divulgativo, 333, pp. 1-19. Recuperado de: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/298/1/iniapscbd333.pdf>

Villacrés, E.; Peralta, E.; Cuadrado, L.; Revelo, J.; Abdo, S.; Aldáz, R. (2009). Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Quito, Ecuador. INIAP-ESPOCH-SENACYT. Editorial Grafistas. Recuperado de: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=V3ozAQAAMAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=alcaloides+del+chocho+lupinus+mutabili+sweet+guerrero+1987&ots=2RN6on5raL&sig=FpLEMTSCjXzCD9okGc4QVqvhTzk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true

Villacreses, N. (2011) Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiología. (Tesis de ingeniería). Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/963/1/99493.pdf>

Wang, W.; Xue, J.; Li, K.; Hu, D.; Huang, G.; Ye, L. (2017). Dynamic Predictive models of five alkaloids in *Coptis* during the process of stir-frying with wine using near-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, 1094-2912 (impreso), 1532-2386 (en línea). Doi: 10.1080/10942912.2017.1306554

Wehling, R. (2010). Infrared Spectroscopy. En Nielsen S.S. (Eds.), *Food Analysis, Food Science Texts Series*, (p. 407-419). West Lafayette, USA: Editorial Springer Science+Business Media, LLC 2010. Doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1

Weitz, B. (2009). Instalación de una planta procesadora de extruido de una mezcla de cañihua y tarwi: Estudio preliminar. *Ingeniería Industrial*, 27, 207-234. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337428493012>

- Ximénez, C.; San Martín, R. (2013). Fundamentos de las técnicas multivariantes. España, Madrid. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) Editores. Recuperado de: <https://books.google.com.pe/books?id=ZdvDAQAAQBAJ&pg=PA4&dq=análisis+cualitativo+multivariante&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiOosnhnLnqAhVRK7kGHY1bDqMQ6AEwAHoECAQQAg#v=onepage&q=análisis%20cualitativo%20multivariante&f=true>
- Yucra, Y. (2021). Cinética de desamargado del tarwi (*Lupinus mutabilis*) por congelación acoplado con microondas y ultrasonido. (Tesis de ingeniería). Universidad Nacional de Juliaca. Recuperado de: <http://repositorio.unaj.edu.pe/bitstream/handle/UNAJ/128/Tesis%20tarwi%20Eliana.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zavaleta, A. (2018). *Lupinus mutabilis* (tarwi). Leguminosa andina con gran potencial industrial. Lima, Perú. Fondo editorial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de: <http://fondoeditorial.unmsm.edu.pe/index.php/fondoeditorial/catalog/download/216/199/900-1?inline=1>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Ecotipos de tarwi proporcionados por el Programa de leguminosas de la UNALM

Código de ecotipo de tarwi	Código del grano amargo	Código del grano desamargado	Nombre de ecotipo de tarwi	Región de origen
E1	A1	D1	Altagracia	La Libertad
E2	A2	D2	Compuesto blanco semi precoz	Cusco
E3	A3	D3	Cholo fuerte	Áncash
E4	A4	D4	Andenes INIA	Cusco
E5	A5	D5	Huánuco 2	Huánuco
E6	A6	D6	Patón grande	La Libertad
E7	A7	D7	Lircay - Huancavelica	Huancavelica
E8	A8	D8	Huancavelica (Sihuas)	Huancavelica
E9	A9	D9	Puno 2	Puno
E10	A10	D10	Puno 1	Puno
E11	A11	D11	Cajamarca	Cajamarca
E12	A12	D12	Moteado beige	Junín
E13	A13	D13	Cheje Copani blanco	Puno
E14	A14	D14	H6 INIA	Junín
E15	A15	D15	Yanamuclo 008-2	Junín
E16	A16	D16	Yunguyo	Puno
E17	A17	D17	Yanamuclo PLGO	Junín
E18	A18	D18	Huánuco 1	Huánuco
E19	A19	D19	Andenes – 80	Áncash
E20	A20	D20	Pallasca	Áncash

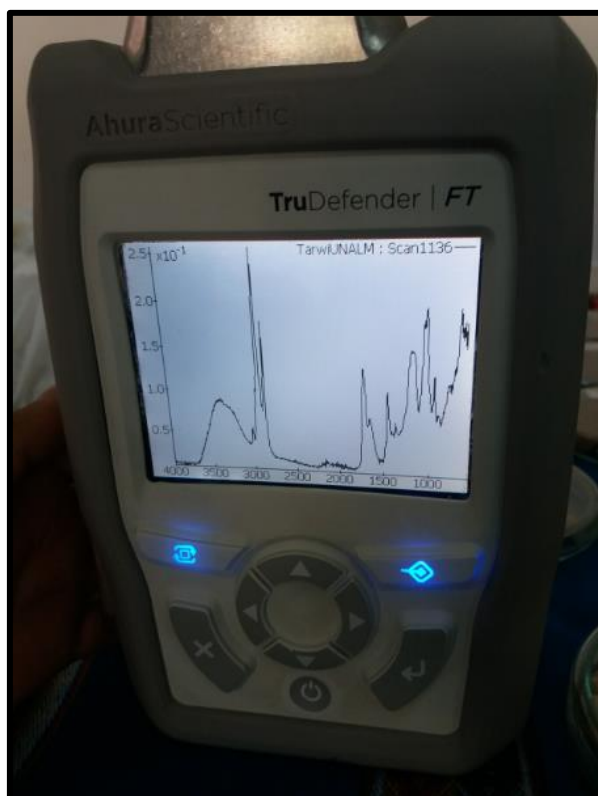
«continuación»

E21	A21	D21	Churibamba Huánuco 4384	Huánuco
E22	A22	D22	Comercial (mezcla)	Áncash
E23	A23	D23	Chacas	Áncash
E24	A24	D24	H6 INIA plomo	Junín
E25	A25	D25	CD Junín 1	Junín
E26	A26	D26	CD Junín 2	Junín
E27	A27	D27	CD Junín 3	Junín
E28	A28	D28	CD Junín 4	Junín
E29	A29	D29	CD Junín 5	Junín
E30	A30	D30	CD Junín 6	Junín
E31	A31	D31	CD Junín 9	Junín
E32	A32	D32	SGC 22	Cusco
E33	A33	D33	CD Junín 10 -1	Junín
E34	A34	D34	Andenes UNALM	Cusco
E35	A35	D35	Yunguyo negro	Puno
E36	A36	D36	Tauribamba (Sihuas) -1	Áncash
E37	A37	D37	CD Junín 7- 1	Junín
E38	A38	D38	CD Junín 7 -2	Junín
E39	A39	D39	Abancay	Apurímac
E40	A40	D40	Vicos	Áncash
E41	A41	D41	Tauribamba blanco	Áncash
E42	A42	D42	CD Junín 10-2	Junín
E43	A43	D43	Huallanca blanco	Áncash
E44	A44	D44	Yanamuclo 008-3	Junín
E45	A45	D45	Tauribamba (Sihuas)-3	Áncash
E46	A46	D46	PLGO 3	La Libertad
E47	A47	D47	Huánuco 1 B/N	Huánuco
E48	A48	D48	H6 INIA blanco	Junín
E49	A49	D49	Yana tarwi	Áncash

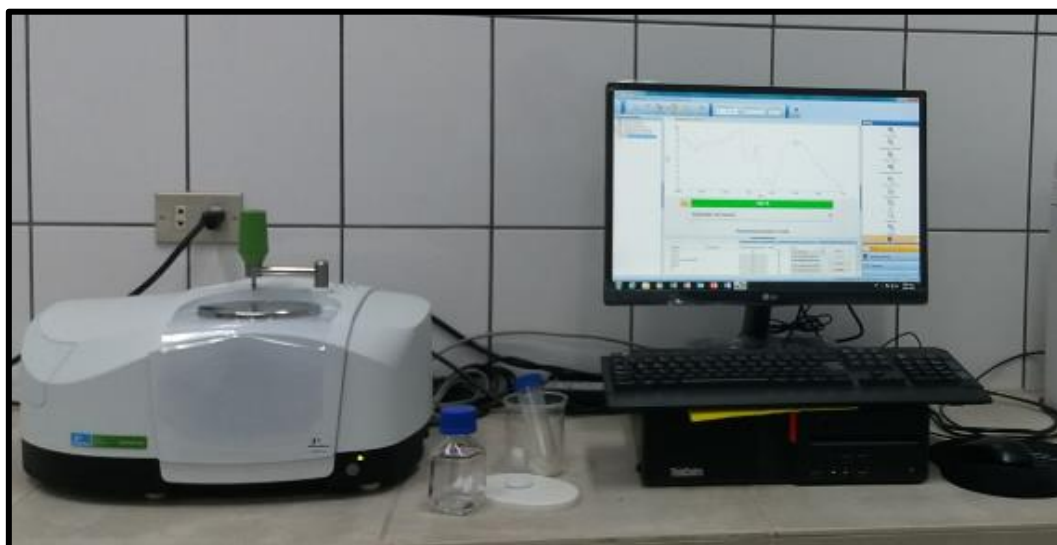
ANEXO 2: Sistema instrumental del GC-FID



ANEXO 3: Equipo de FT-MIR portátil



ANEXO 4: Sistema instrumental de FT-MIR de mesa



ANEXO 5: Instructivo del manejo del espectrómetro portátil y el de mesa para la obtención de los espectros FT-MIR de los estándares y de las muestras de tarwi amargo y desamargado

1. Encender el equipo.
2. Realizar la lectura del aire como espectro de fondo (background).
3. Colocar la muestra (estándar / harina) en cantidad suficiente para que cubra toda el área correspondiente al cristal.
4. Cubrir y presionar la muestra (estándar / harina) con el elemento de ajuste.
5. Realizar la lectura del espectro de la muestra (estándar / harina).
6. Retirar el elemento de ajuste y retirar la muestra (harina).
7. Limpiar el cristal con algodón y metanol.
8. Realizar la lectura del background.

ANEXO 6: Instructivo del manejo del programa Pirouette para el análisis de clasificación por SIMCA

1. Cargar el primer espectro con la opción “open data” (file → open data) y cargar el resto de los espectros con la opción “merge samples” (file → merge samples) (Full data).
2. Incluir los datos a partir del segundo espectro (filas sombreadas). Para ello seleccionar las filas correspondientes y pulsar la opción “include” (edit → include).
3. En caso se vaya a realizar una posterior predicción, se debe excluir las filas de las muestras a predecir. Para ello seleccionar las filas correspondientes y pulsar la opción “exclude” (edit → exclude).
4. Excluir las variables que el modelo quimiométrico no va a usar en su análisis. Para ello seleccionar las columnas correspondientes y pulsar la opción “exclude” (edit → exclude).
5. Realizar la asignación de clases en las celdas debajo de la última columna denominada como “Y1”. Para ello escribir el número (cada número determina una categoría) correspondiente a cada fila. La Clase 1 fue para muestras amargas y se la representó con el número “1” y la Clase 2 fue para muestras desamargadas y se la representó con el número “2”.
6. Activar la función clase. Para ello, seleccionar la columna “Y1” y pulsar la opción “class variable” (edit → column type → class variable). Se observará que la denominación de la columna “Y1” cambia a “C1”. Volver a seleccionar la columna “Y1” y pulsar la opción “activate class” (edit → activate class).
7. Pulsar la opción “run” (process → run) y seleccionar “SIMCA” (algorithm). Se modificarán las opciones de procesamiento (algorithm options). Seleccionar las opciones del algoritmo “SIMCA” con las que se desea trabajar: Transformaciones, Pre-procesamiento, máximo número de factores, alcance y umbral de probabilidad.

8. Pulsar la opción “run” (del cuadro run configure) para ejecutar el algoritmo SIMCA.
9. Optimizar el modelo (incluir y/o excluir filas y columnas, cambiar opciones de procesamiento).

ANEXO 7: Instructivo del manejo del programa Pirouette para el análisis de la predicción de la clasificación por SIMCA

1. Crear un “Full Data-2”. Para ello pulsar “new set” (edit → new set).
2. El “Full Data-2” debe incluir solo los datos de las muestras incógnitas. Para ello seleccionar las filas que deben ser excluidas (filas que se usaron en la clasificación SIMCA) y pulsar la opción “exclude” (edit → exclude). No se excluye ninguna columna ya que el programa Pirouette sabe qué columnas excluir en la predicción basado en la clasificación SIMCA previa.
3. Pulsar la opción “predict” (process → predict) y seleccionar el “Full Data-2” (exclusión set) y el modelo “Full Data:SIMCA” (models).
4. Pulsar la opción “add” y luego “run” (ambos del cuadro abierto del configure prediction) para ejecutar la predicción SIMCA.

ANEXO 8: Instructivo del manejo del programa Pirouette para el análisis de la calibración por PLS

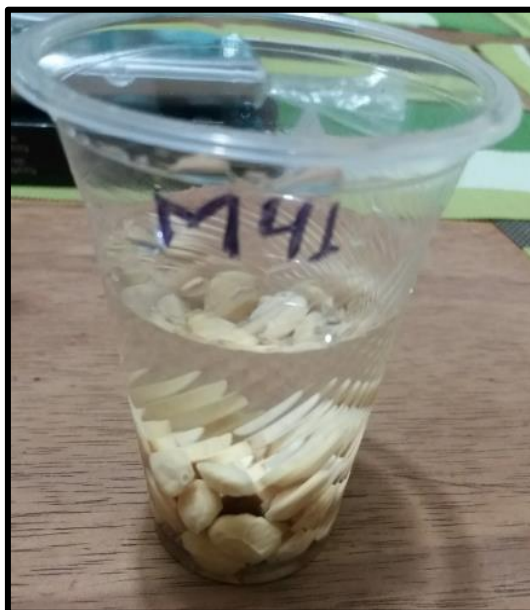
1. Cargar el primer espectro con la opción “open data” (file → open data) y cargar el resto de los espectros con la opción “merge samples” (file → merge samples) (Full data).
2. Incluir los datos a partir del segundo espectro (filas sombreadas). Para ello seleccionar las filas correspondientes y pulsar la opción “include” (edit → include).

3. Excluir las variables que el modelo quimiométrico no va a usar en su análisis. Para ello seleccionar las columnas correspondientes y pulsar la opción “exclude” (edit → exclude).
4. Realizar la asignación de valores cuantitativos del contenido de alcaloides en las celdas debajo de la última columna denominada como “SPCZValue”. Para ello escribir el número (contenido de alcaloides) correspondiente a cada fila (de acuerdo al ecotipo).
5. Pulsar la opción “run” (process → run) y seleccionar “PLS” (algorithm). Se modificarán las opciones de procesamiento (algorithm options). Seleccionar las opciones del algoritmo “PLS” con las que se desea trabajar: Transformaciones, Pre-procesamiento, máximo número de factores y método de validación.
6. Pulsar la opción “run” (del cuadro run configure) para ejecutar el algoritmo PLS.
7. Optimizar el modelo (incluir y/o excluir filas y columnas, cambiar opciones de procesamiento).

ANEXO 9: Granos de tarwi amargo seleccionados y pesados para iniciar el desamargado por método acuoso



ANEXO 10: Etapa de remojo de granos de tarwi amargo con agua potable



ANEXO 11: Etapa de cocción de granos de tarwi con agua potable en olla casera



ANEXO 12: Etapa de lavado por cinco días de los granos de tarwi, agua amarillenta observado en los primeros cambios de agua



ANEXO 13: Etapa de lavado por cinco días durante el desamargado acuoso de los granos de tarwi, agua transparente observado en los últimos cambios de agua



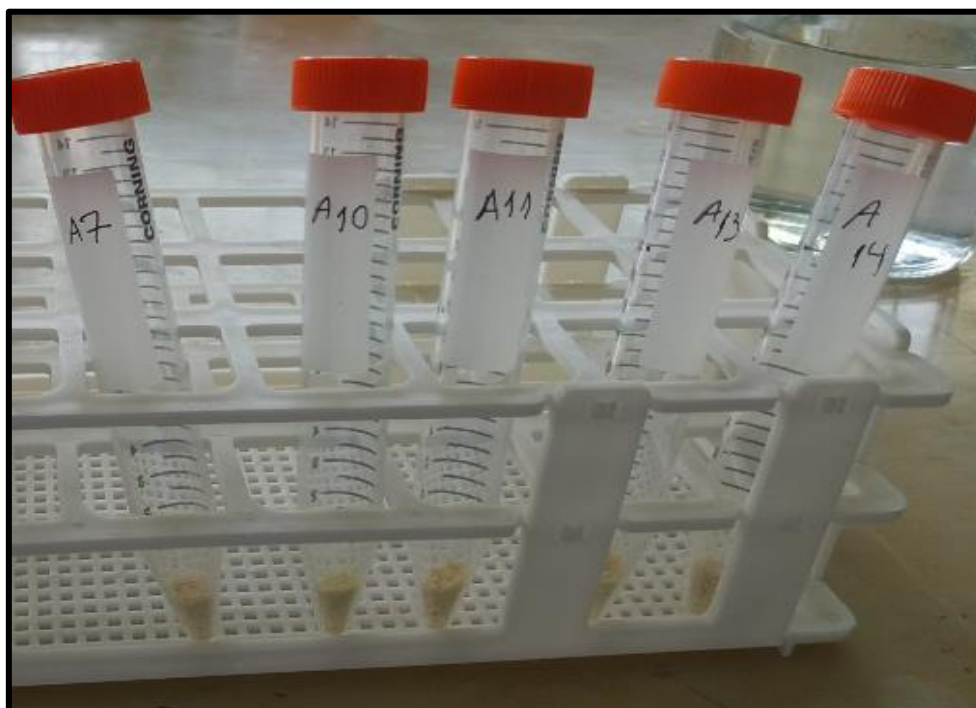
ANEXO 14: Muestras de harina de tarwi amargo y desamargado



ANEXO 15: Pesado de muestra de tarwi para proceso de extracción de alcaloides



ANEXO 16: Muestras pesadas de tarwi amargo



ANEXO 17: Muestras pesadas de tarwi desamargado tratadas con ácido tricloroacético, sonicación y centrifugación



ANEXO 18: Movimientos suaves giratorios para el lavado con diclorometano de soluciones neutralizadas



ANEXO 19: Decantación tras la mezcla con diclorometano con formación de dos fases: fase superior amarilla correspondiente al ácido tricloroacético, fase inferior transparente correspondiente al diclorometano



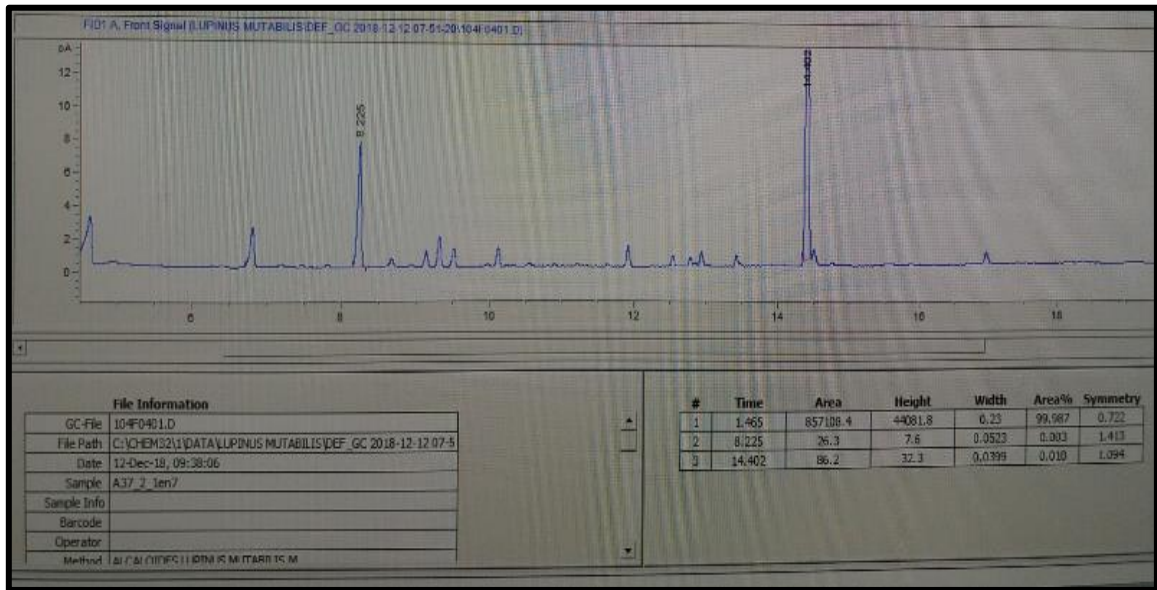
ANEXO 20: Secado de solución del extracto de alcaloides en diclorometano (fase transparente decantada) por sistema de evaporación



ANEXO 21: Filtrado de solución de alcaloides en metanol hacia vial para cromatografía



ANEXO 22: Cromatograma observado desde computadora del GC-FID



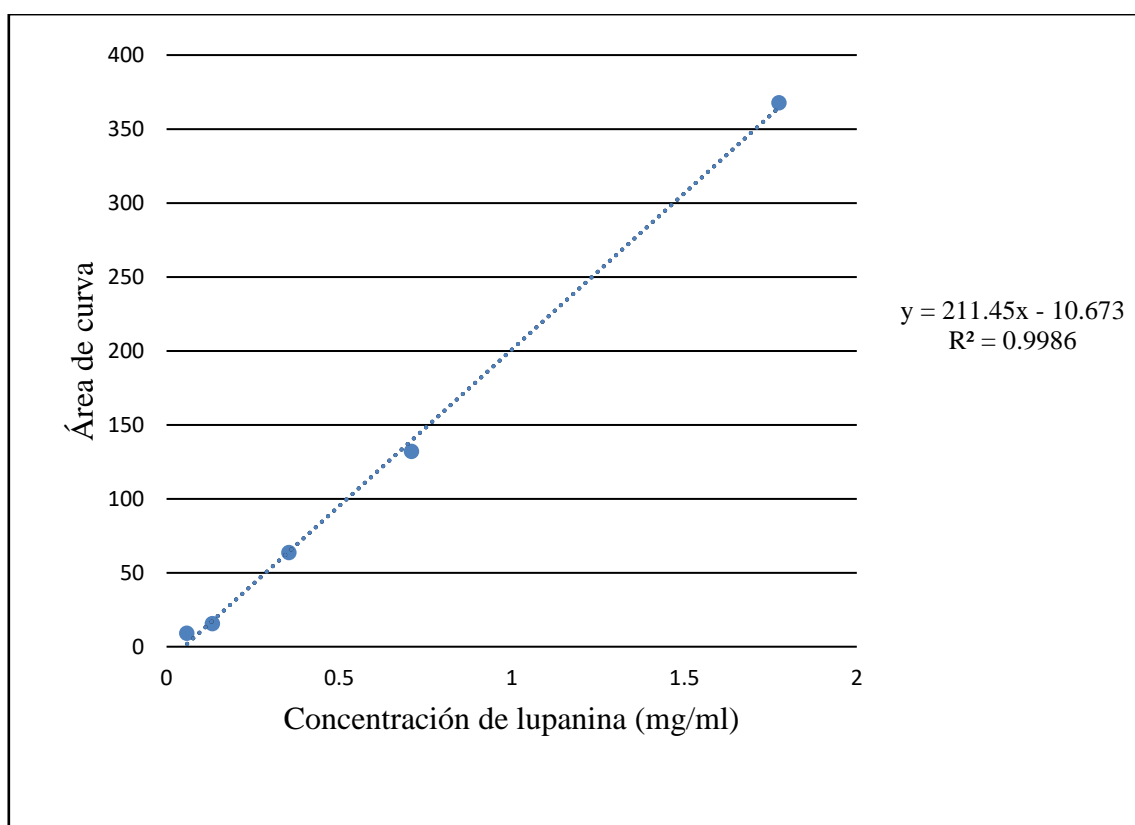
ANEXO 23: Preparación de solución stock y diluciones a partir del estándar perclorato de lupanina

Nombre de solución	Mezcla	Concentración (mg Lupanina/ml Metanol)
Stock	25 mg perclorato de lupanina + 2200 ul metanol	8.0909
P ₁	618 ul stock + 382 ul metanol	5.0002
P ₂	710 ul P ₁ + 290 ul metanol	3.5501
P ₃	500 ul P ₂ + 500 ul metanol	1.7751
P ₄	200 ul P ₂ + 800 ul metanol	0.7100
P ₅	100 ul P ₂ + 900 ul metanol	0.3550
P ₆	75 ul P ₃ + 925 ul metanol	0.1331
P ₇	167 ul P ₅ + 833 ul metanol	0.0593

ANEXO 24: Datos para construcción de la curva de calibración del estándar lupanina para bajas concentraciones en cromatógrafo GC-FID

Concentración de lupanina (mg/ml)	Área debajo de la curva de lupanina
0.0593	9.05
0.1331	15.45
0.3550	63.6
0.7100	132.05
1.7751	367.7

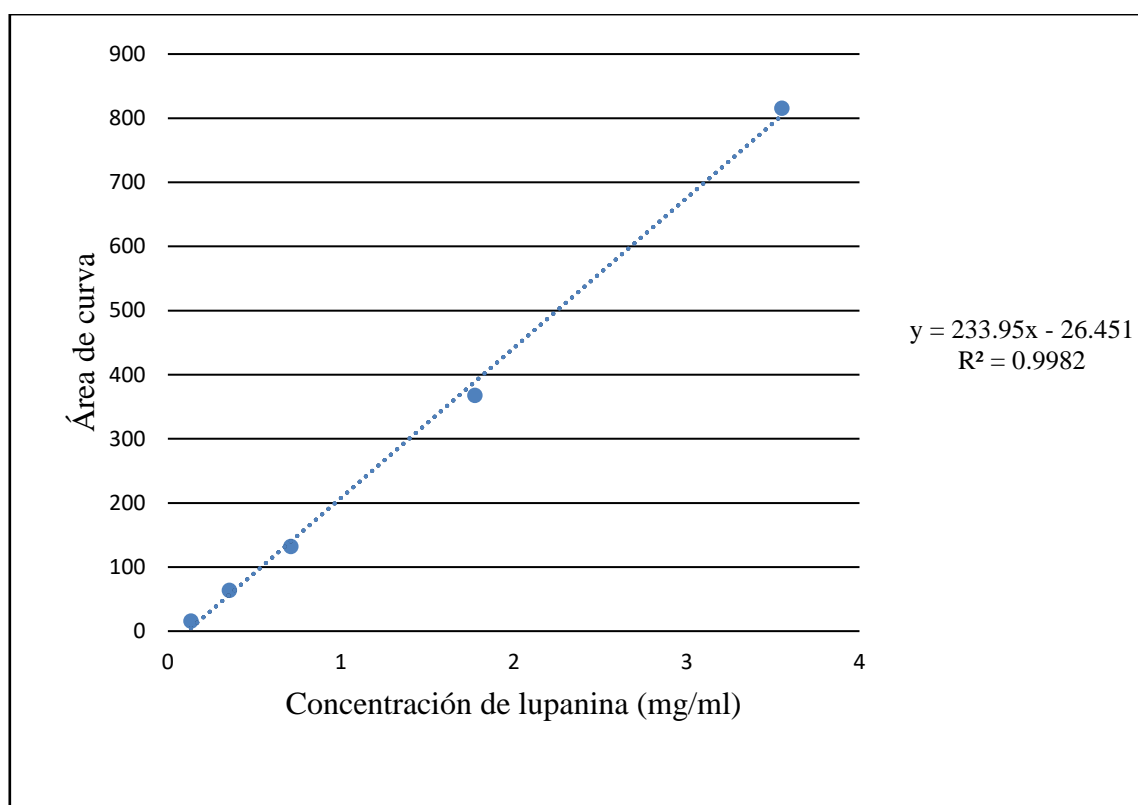
ANEXO 25: Curva de calibración del estándar lupanina para bajas concentraciones en cromatógrafo GC-FID



ANEXO 26: Datos para construcción de la curva de calibración del estándar lupanina para altas concentraciones en cromatógrafo GC-FID

Concentración de lupanina (mg/ml)	Área debajo de la curva de lupanina
0.1331	15.45
0.3550	63.6
0.7100	132.05
1.7751	367.7
3.5501	815.1

ANEXO 27: Curva de calibración del estándar lupanina para altas concentraciones en cromatógrafo GC-FID



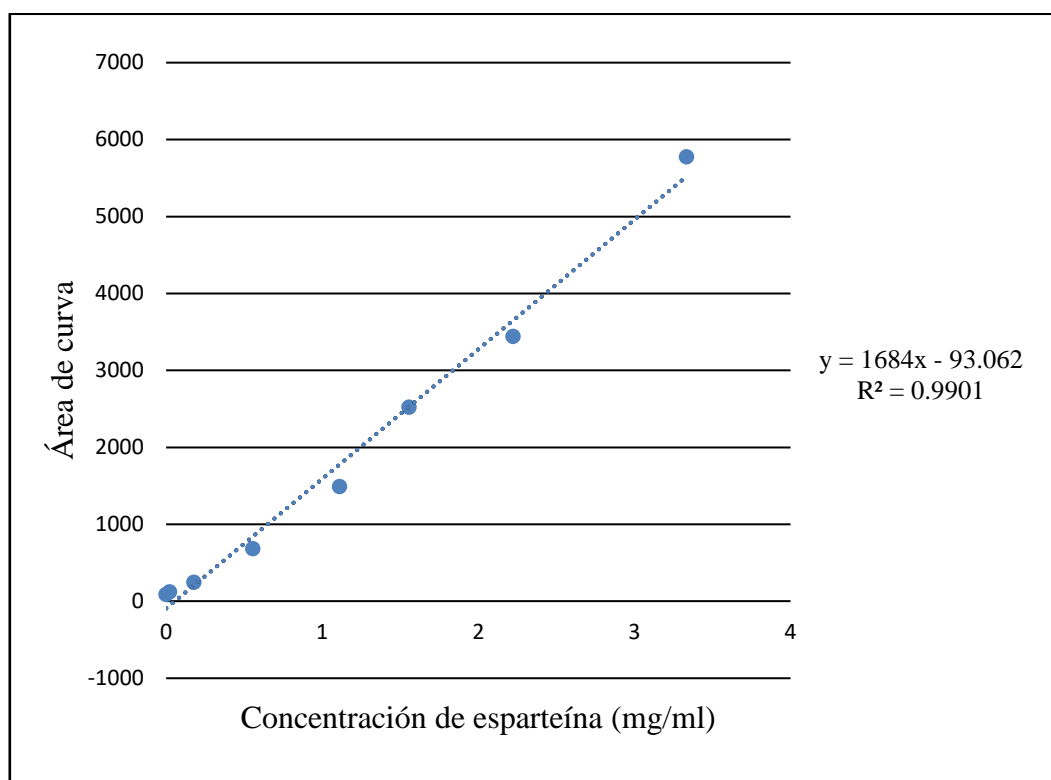
ANEXO 28: Preparación de solución stock y diluciones a partir del estándar esparteína

Nombre de solución	Mezcla	Concentración (mg Esparteína/ml Metanol)
Stock	1000 mg esparteína + 2000 ul metanol	500
P _{1-a}	10 ul stock + 1490 ul metanol	3.3333
P _{1-b}	10 ul stock + 1490 ul metanol	3.3333
P ₂	1000 ul P _{1-a} + 500 ul metanol	2.2222
P ₃	700 ul P _{1-b} + 800 ul metanol	1.5556
P ₄	500 ul P _{1-b} + 1000 ul metanol	1.1111
P ₅	250 ul P _{1-b} + 1250 ul metanol	0.5556
P ₆	80 ul P _{1-a} + 1420 ul metanol	0.1778
P ₇	10 ul P _{1-a} + 1490 ul metanol	0.0222
P ₈	10 ul P ₇ + 1490 ul metanol	0.0001

ANEXO 29: Datos para construcción de la curva de calibración de la estándar esparteína en cromatógrafo GC-FID

Concentración de esparteína (mg/ml)	Área debajo de la curva de esparteína
0.00011	87.3
0.0222	121.35
0.1778	245.4
0.5556	685
1.1111	1490.8
1.5556	2525
2.2222	3441.1
3.3333	5778.4

ANEXO 30: Curva de calibración de la estándar esparteína en cromatógrafo GC-FID



ANEXO 31: Valores de límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOC) y tiempo de retención (TR) de la lupanina y esparteína en GC-FID

Alcaloides analizados	LOD	LOC	TR	
			Promedio	CV
Lupanina	0.0892 mg/ml	0.1234 mg/ml	14.410 min	0.04 %
Esparteína	0.0637 mg/ml	0.0674 mg/ml	8.259 min	0.57 %

Esparteína: $LOD = (S_{lod} + 93.062) / 1684$, donde $S_{lod} = S_{blanco} + 3 * S_{ruido}$

$LOC = (S_{loc} + 93.062) / 1684$, donde $S_{loc} = S_{blanco} + 10 * S_{ruido}$

Lupanina: $LOD = (S_{lod} + 10.673) / 211.45$, donde $S_{lod} = S_{blanco} + 3 * S_{ruido}$

$LOC = (S_{loc} + 10.673) / 211.45$, donde $S_{loc} = S_{blanco} + 10 * S_{ruido}$

ANEXO 32: Evaluación de precisión en la cuantificación del contenido de lupanina y esparteína (%) en b.s. de los granos amargos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*)

Ecotipos de tarwi como grano amargo	Contenido de lupanina (%)				Contenido de esparteína (%)			
	Promedio ± DE (*) (%) en b.s.	CV (%) (*)	DRM (%) (**)	Precisión (***)	Promedio ± DE (*) (%) en b.s.	CV (%) (*)	DRM (%) (**)	Precisión (***)
A1	1.572	-	4.249	>2%	0.078	-	4.860	>2%
A2	2.161 ± 0.067	3.103	-	<5%	0.1334 ± 0.006	4.580	-	<5%
A3	4.506 ± 0.498	11.062	-	>5%	0.256	-	4.278	>2%
A4	2.244	-	7.503	>2%	0.139	-	5.401	>2%
A5	4.112	-	3.314	>2%	0.426	-	2.842	>2%
A6	3.989 ± 0.129	3.236	-	<5%	0.310 ± 0.023	7.526	-	>5%
A7	4.714	-	5.244	>2%	0.320	-	5.992	>2%
A8	4.643	-	0.380	<2%	0.249	-	-	-
A9	4.660	-	0.991	<2%	0.176	-	4.898	>2%
A10	5.689	-	4.300	>2%	0.248	-	0.259	<2%
A11	3.545	-	3.086	>2%	0.235	-	4.845	>2%
A12	5.686	-	6.616	>2%	0.112	-	4.095	>2%
A13	4.084 ± 0.109	2.675	-	<5%	0.196	-	14.636	>2%
A14	2.218	-	4.693	>2%	0.100	-	0.629	<2%
A15	4.161	-	3.731	>2%	0.204	-	4.699	>2%
A16	2.583	-	4.374	>2%	0.421	-	2.750	>2%
A17	2.674	-	0.486	<2%	0.438	-	1.256	<2%

«continuación»

A18	2.199	-	9.739	>2%	0.232	-	4.121	>2%
A19	5.163	-	0.548	<2%	0.220	-	1.072	<2%
A20	6.200	-	12.990	>2%	0.240	-	1.429	<2%
A21	3.942 ± 0.406	10.292	-	>5%	0.229 ± 0.009	3.819	-	<5%
A22	1.267	-	5.793	>2%	0.074	-	4.405	>2%
A23	1.360	-	8.149	>2%	0.124 ± 0.003	2.046	-	<5%
A24	4.421	-	6.623	>2%	0.183	-	1.590	<2%
A25	3.144	-	0.796	<2%	0.223	-	2.187	>2%
A26	1.320	-	2.614	>2%	0.148	-	10.666	>2%
A27	2.820 ± 0.172	6.099	-	>5%	0.307 ± 0.032	10.575	-	>5%
A28	1.271	-	2.084	>2%	0.141 ± 0.006	4.543	-	<5%
A29	4.010 ± 0.138	3.442	-	<5%	0.167 ± 0.009	5.665	-	>5%
A30	4.286	-	1.722	<2%	0.263	-	4.160	>2%
A31	4.012	-	0.878	<2%	0.294	-	5.307	>2%
A32	4.053	-	0.420	<2%	0.106	-	3.645	>2%
A33	4.766	-	1.513	<2%	0.345	-	5.088	>2%
A34	2.997	-	0.578	<2%	0.115	-	0.096	
A35	3.406	-	8.386	>2%	0.174	-	6.811	>2%
A36	3.604	-	0.853	<2%	0.226	-	14.621	>2%
A37	1.036	-	9.281	>2%	0.114	-	0.049	<2%
A38	1.159	-	2.164	>2%	0.121	-	2.260	>2%
A39	6.412	-	1.241	<2%	0.117	-	5.924	>2%
A40	2.530	-	6.501	>2%	0.256	-	5.068	>2%
A41	1.916	-	4.657	>2%	0.126	-	4.502	>2%
A42	5.270	-	4.629	>2%	0.167	-	4.831	>2%

«continuación»

A43	2.545	-	4.050	>2%	0.566	-	5.040	>2%
A44	2.032 ± 0.186	9.154	-	>5%	0.115	-	16.629	>2%
A45	2.948	-	4.215	>2%	0.245 ± 0.032	12.892	-	>5%
A46	3.318	-	7.901	>2%	0.096	-	2.859	>2%
A47	2.894	-	1.391	<2%	0.365	-	7.323	>2%
A48	2.834	-	1.894	<2%	0.098 ± 0.005	4.768	-	<5%
A49	4.217	-	0.465	<2%	0.244	-	1.874	<2%
Suma de medidas de precisión	-	49.06	161.04	-	-	56.41	183.00	-

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variabilidad

DRM: Desviación relativa de la media

(*) Para los casos de 3 repeticiones

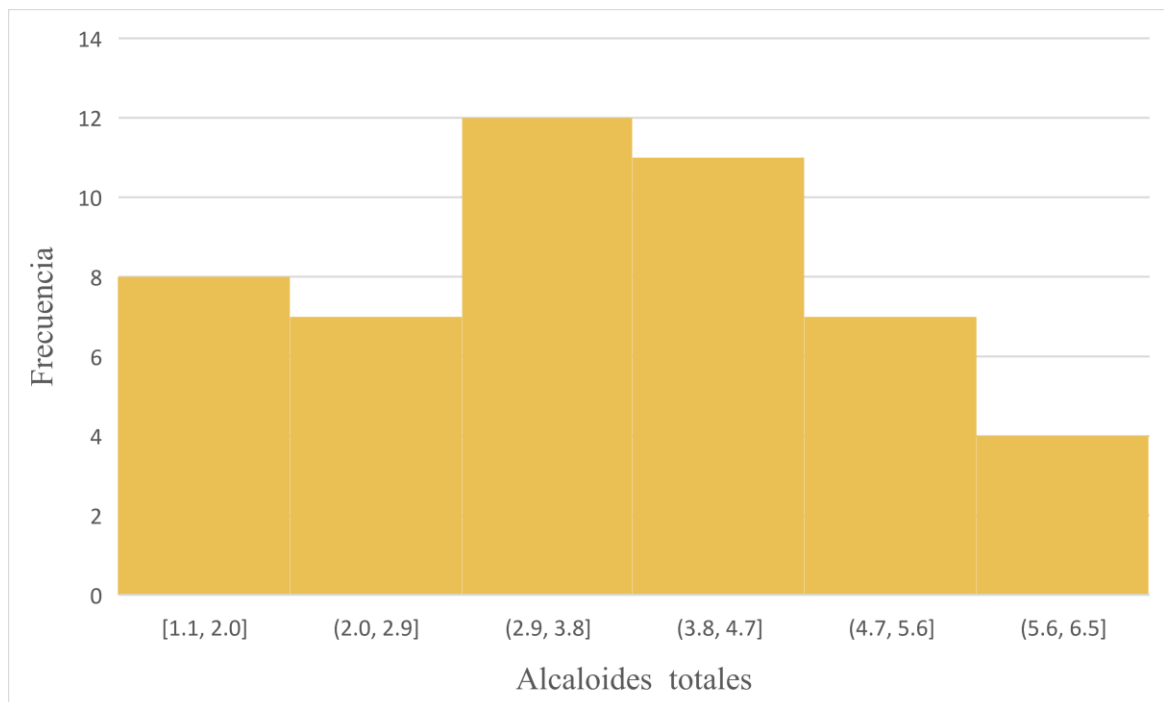
(**) Para los casos de 2 repeticiones

(***) Para evaluar el CV: <5% es valor aceptable de precisión, >5% es valor no aceptable de precisión. Para evaluar la DRM: <2% es valor aceptable de precisión, >2% es valor no aceptable de precisión.

**ANEXO 33: Resultado de la prueba de normalidad de la variable “alcaloides totales”
usando la prueba estadística Shapiro Wilk**

Shapiro Wilk	
1. Hipótesis	<i>H₀</i> : La variable "alcaloides totales" proviene de una distribución normal <i>H_a</i> : La variable "alcaloides totales" no proviene de una distribución normal
2. Significancia	$\alpha = 5\% = 0.05$
3. Valor calculado	0.973
4. P-valor	$\rho = 0.328$
5. Decisión	Si $\rho > \alpha$, entonces aceptamos <i>H₀</i> , caso contrario aceptamos <i>H_a</i> . $0.328 > 0.05$, esto implica aceptar la <i>H₀</i>
6. Conclusión	La variable "alcaloides totales" sí proviene de una población normal.

ANEXO 34: Histograma de los valores de la variable “alcaloides totales”



ANEXO 35: Ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) con alto contenido de alcaloides

Ecotipos de tarwi	Nombre de ecotipo de tarwi con alto contenido de alcaloides	Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) del grano amargo	Localidad de origen
E7	Lircay - Huancavelica	5.034	Huancavelica
E10	Puno 1	5.937	Puno
E12	Moteado beige	5.798	Junín
E19	Andenes – 80	5.383	Ancash
E20	Pallasca	6.440	Ancash
E33	CD Junín 10 -1	5.111	Junín
E39	Abancay	6.529	Apurímac
E42	CD Junín 10-2	5.438	Junín

ANEXO 36: Ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) con intermedio contenido de alcaloides

Ecotipos de tarwi	Nombre de ecotipo de tarwi con intermedio contenido de alcaloides	Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) del grano amargo	Región de origen
E3	Cholo fuerte	4.762	Áncash
E5	Huánuco 2	4.539	Huánuco
E6	Patón grande	4.299	La Libertad
E8	Huancavelica (Sihuas)	4.892	Huancavelica
E9	Puno 2	4.835	Puno
E13	Cheje Copani blanco	4.280	Puno
E15	Yanamucllo 008-2	4.365	Junín
E21	Churibamba Huánuco 4384	4.172	Huánuco
E24	H6 INIA plomo	4.604	Junín
E29	CD Junín 5	4.178	Junín
E30	CD Junín 6	4.549	Junín

«continuación»

E31	CD Junín 9	4.306	Junín
E32	SGC 22	4.159	Cusco
E49	Yana tarwi	4.461	Áncash

ANEXO 37: Ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) con bajo contenido de alcaloides

Ecotipos de tarwi	Nombre de ecotipo de tarwi con bajo contenido de alcaloides	Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.) del grano amargo	Región de origen
E1	Altagracia	1.650	La Libertad
E2	Compuesto blanco semi precoz	2.294	Cusco
E4	Andenes INIA	2.382	Cusco
E11	Cajamarca	3.781	Cajamarca
E14	H6 INIA	2.318	Junín
E16	Yunguyo	3.004	Puno
E17	Yanamuclo PLGO	3.113	Junín
E18	Huánuco 1	2.431	Huánuco
E22	Comercial (mezcla)	1.341	Áncash
E23	Chacas	1.484	Áncash
E25	CD Junín 1	3.367	Junín
E26	CD Junín 2	1.469	Junín
E27	CD Junín 3	3.126	Junín
E28	CD Junín 4	1.411	Junín
E34	Andenes UNALM	3.113	Cusco
E35	Yunguyo negro	3.579	Puno
E36	Tauribamba (Sihuas) -1	3.831	Áncash
E37	CD Junín 7- 1	1.150	Junín
E38	CD Junín 7 -2	1.280	Junín

«continuación»

E40	Vicos	2.786	Áncash
E41	Tauribamba blanco	2.042	Áncash
E43	Huallanca blanco	3.112	Áncash
E44	Yanamuclo 008-3	2.146	Junín
E45	Tauribamba (Sihuas)-3	3.193	Áncash
E46	PLGO 3	3.414	La Libertad
E47	Huánuco 1 B/N	3.259	Huánuco
E48	H6 INIA blanco	2.932	Junín

ANEXO 38: Agrupaciones de ecotipos por valor cercano de alcaloides totales

Nombre del grupo ("n" muestras)	Criterio: Contenido de alcaloides	Ecotipo	Alcaloides totales (%) en b.s.	Promedio de alcaloides totales (%) en b.s.	DE (%) en b.s.	CV (%)
G1 (n = 3)	Alto	A10	5.937	6.302	0.319	5.066
		A39	6.529			
		A20	6.440			
G2 (n = 3)	Alto	A19	5.383	5.540	0.226	4.071
		A42	5.438			
		A12	5.798			
G3 (n = 5)	Alto-Intermedio	A3	4.762	4.927	0.143	2.910
		A9	4.835			
		A8	4.892			
		A7	5.034			
		A33	5.111			
G4 (n = 4)	Intermedio	A49	4.461	4.538	0.059	1.303
		A5	4.539			
		A30	4.549			

«continuación»

		A24	4.604			
G5 (n = 7)	Intermedio	A32	4.159			
		A21	4.172			
		A29	4.178			
		A13	4.280	4.251	0.081	1.905
		A6	4.299			
		A31	4.306			
		A15	4.365			
G6 (n = 3)	Bajo	A35	3.579			
		A11	3.781	3.730	0.133	3.564
		A36	3.831			
G7 (n = 4)	Bajo	A45	3.193			
		A47	3.259			
		A25	3.367	3.308	0.101	3.047
		A46	3.414			
G8 (n = 7)	Bajo	A40	2.786			
		A48	2.932			
		A16	3.004			
		A43	3.112	3.026	0.129	4.255
		A17	3.113			
		A34	3.113			
		A27	3.126			
G9 (n = 3)	Bajo	A14	2.318			
		A4	2.382	2.377	0.057	2.397
		A18	2.431			
G10 (n = 3)	Bajo	A41	2.042			
		A44	2.146	2.161	0.126	5.849
		A2	2.294			

«continuación»

G11 (n = 3)	Bajo	A26	1.469	1.534	0.101	6.554
		A23	1.484			
		A1	1.650			
G12 (n = 4)	Bajo	A37	1.150	1.295	0.111	8.578
		A38	1.280			
		A22	1.341			
		A28	1.411			

n: cantidad de ecotipos

ANEXO 39: Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas para los grupos del Anexo 38 usando la prueba estadística Bartlett

Bartlett	
1. Hipótesis	$H_0: \sigma_i^2 = \sigma^2 \quad \forall i = G1, G2, \dots, G12.$ $H_a: \sigma_i^2 \neq \sigma^2 \quad \text{para al menos algún } i.$
2. Significancia	$\alpha = 5\% = 0.05$
3. Número de tratamientos	$t = 12$
4. Grados de libertad	$gl = 11$
5. Estadístico de prueba calculado	$Q = 13.06$
6. Valor tabular Chi-Cuadrado	$X_{(\alpha; gl)}^2 = 19.68$
7. Decisión	<p>Si $Q < X^2$, entonces no se rechaza la H_0, caso contrario se rechaza la H_0.</p> <p>$13.01 < 19.68$, esto implica no rechazar la H_0.</p>
8. Conclusión	Con un nivel de significación de 0.05 no se rechaza la H_0 , por lo tanto no se puede afirmar que las varianzas sean heterogéneas.

ANEXO 40: Resultado de la prueba de análisis de varianza entre los grupos del Anexo 38

Análisis de varianza	
1. Hipótesis	$H_0: \mu_i = \mu \quad \forall i = G1, G2, \dots, G12$ $H_a: \mu_i \neq \mu \quad \text{para al menos algún } i.$
2. Significancia	$\alpha = 5\% = 0.05$
3. Número de tratamientos	$t = 12$
4. Grados de libertad del error	$gle = 37$
5. Estadístico de prueba calculado	$F_c = 461.75$
6. Valor tabular	$F_{(\alpha; t-1; gle)} = 2.06$
7. P-valor	$\rho = 4.3E-36$
8. Decisión	Si $F_c > F$, entonces se rechaza la H_0 , caso contrario no se rechaza la H_0 . $461.75 > 2.06$, esto implica rechazar la H_0 .
9. Conclusión	Con un nivel de significación de 0.05 se rechaza la H_0 , por lo tanto al menos una media es significativamente diferente.

ANEXO 41: Análisis de varianza entre los grupos del Anexo 38

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcal	Fcrit	Sig.
Entre grupos	11	95.91	8.72	461.75	2.06	*
Error	37	0.70	0.02			
Total	48	96.61				

*: La diferencia es significativa

ANEXO 42: Resultado de la prueba de comparación múltiple entre los grupos del Anexo 38 por la prueba de Tukey

Prueba de Tukey	
1. Hipótesis	$H_0: \mu_i = \mu_j \quad \forall i, j = G1, G2, \dots, G12$ $i \neq j$ $H_a: \mu_i \neq \mu_j$
2. Significancia	$\alpha = 5\% = 0.05$
3. Número de tratamientos	$t = 12$
4. Grados de libertad del error	$gle = 37$
5. Valor tabular	$AES(T)_{(\alpha; t; gle)} = 4.904$
6. Estadístico de prueba DLS	$ALS(T) = 4.904 * \sqrt{\frac{CME}{2} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$
7. Decisión	<p>Si $Y_{i.prom} - Y_{j.prom} > ALS$, entonces se rechaza la H_0 es decir sí existe diferencia significativa entre las medias de ambos grupos, caso contrario no se rechaza la H_0 es decir no existe diferencia significativa entre ambas medias.</p>
8. Conclusión	<p>Con un nivel de significación de 0.05 no existen diferencias significativas entre las medias de los grupos G4-G5, G7-G8, G9-G10 y G11-G12, para el resto de combinaciones sí existe diferencia significativa.</p>

AES(T): Amplitud estudentizada significativa de Tukey

ALS(T): Amplitud límite significativa de Tukey

ANEXO 43: Comparación múltiple entre los grupos del Anexo 38 por la prueba de Tukey

Comparación	ALS (T)	$Y(i\cdot) \text{ prom} - Y(j\cdot) \text{ prom}$	Significancia
G1-G2	0.389	0.762	*
G1-G3	0.348	1.375	*
G1-G4	0.364	1.764	*
G1-G5	0.329	2.051	*
G1-G6	0.389	2.572	*
G1-G7	0.364	2.994	*
G1-G8	0.337	3.275	*
G1-G9	0.389	3.925	*
G1-G10	0.389	4.141	*
G1-G11	0.389	4.768	*
G1-G12	0.364	5.006	*
G2-G3	0.348	0.613	*
G2-G4	0.364	1.002	*
G2-G5	0.329	1.289	*
G2-G6	0.389	1.810	*
G2-G7	0.364	2.231	*
G2-G8	0.337	2.513	*
G2-G9	0.389	3.162	*
G2-G10	0.389	3.379	*
G2-G11	0.389	4.006	*
G2-G12	0.364	4.244	*
G3-G4	0.320	0.389	*
G3-G5	0.279	0.676	*
G3-G6	0.348	1.197	*
G3-G7	0.320	1.619	*
G3-G8	0.289	1.900	*

«continuación»

G3-G9	0.348	2.550	*
G3-G10	0.348	2.766	*
G3-G11	0.348	3.393	*
G3-G12	0.320	3.631	*
G4-G5	0.299	0.287	n.s.
G4-G6	0.364	0.808	*
G4-G7	0.337	1.230	*
G4-G8	0.308	1.512	*
G4-G9	0.364	2.161	*
G4-G10	0.364	2.377	*
G4-G11	0.364	3.004	*
G4-G12	0.337	3.243	*
G5-G6	0.329	0.521	*
G5-G7	0.299	0.943	*
G5-G8	0.265	1.225	*
G5-G9	0.329	1.874	*
G5-G10	0.329	2.090	*
G5-G11	0.329	2.717	*
G5-G12	0.299	2.956	*
G6-G7	0.364	0.422	*
G6-G8	0.337	0.704	*
G6-G9	0.389	1.353	*
G6-G10	0.389	1.569	*
G6-G11	0.389	2.196	*
G6-G12	0.364	2.435	*
G7-G8	0.308	0.282	n.s.
G7-G9	0.364	0.931	*
G7-G10	0.364	1.147	*
G7-G11	0.364	1.774	*

«continuación»

G7-G12	0.337	2.013	*
G8-G9	0.337	0.649	*
G8-G10	0.337	0.866	*
G8-G11	0.337	1.492	*
G8-G12	0.308	1.731	*
G9-G10	0.389	0.216	n.s.
G9-G11	0.389	0.843	*
G9-G12	0.364	1.082	*
G10-G11	0.389	0.627	*
G10-G12	0.364	0.865	*
G11-G12	0.364	0.239	n.s.

* La diferencia es significativa

n.s.: La diferencia no es significativa

ANEXO 44: Agrupaciones de ecotipos por el criterio de región de origen

Nombre del grupo ("n" muestras)	Criterio: Región de origen	Ecotipo	Alcaloides totales (%) en b.s.	Promedio de alcaloides totales (%) en b.s.	DE (%) en b.s.	CV (%)
L1 (n = 5)	Puno	E10	5.937	4.327	1.136	26.249
		E9	4.835			
		E13	4.280			
		E16	3.004			
		E35	3.579			
L2 (n = 18)	Junín	E12	5.798	3.370	1.501	44.544
		E33	5.111			
		E42	5.438			
		E15	4.365			

«continuación»

		E24	4.604			
		E29	4.178			
		E30	4.549			
		E31	4.306			
		E14	2.318			
		E17	3.113			
		E25	3.367			
		E26	1.469			
		E27	3.126			
		E28	1.411			
		E37	1.150			
		E38	1.280			
		E44	2.146			
		E48	2.932			
		<hr/>				
		E19	5.383			
		E20	6.440			
		E3	4.762			
		E49	4.461			
		E22	1.341			
L3 (n = 11)	Áncash	E23	1.484	3.530	1.625	46.032
		E36	3.831			
		E40	2.786			
		E41	2.042			
		E43	3.112			
		E45	3.193			
		<hr/>				

«continuación»

		E5	4.539			
L4 (n = 4)	Huánuco	E21	4.172	3.600	0.947	26.303
		E18	2.431			
		E47	3.259			
		E32	4.159			
L5 (n = 4)	Cusco	E2	2.294	2.987	0.863	28.891
		E4	2.382			
		E34	3.113			
L6 (n = 3)	La Libertad	E6	4.299	3.121	1.349	43.217
		E1	1.650			
		E46	3.414			
s.g. (n = 2)	Huancave- lica	E7	5.034	4.963	-	-
		E8	4.892			
s.g. (n=1)	Apurímac	E39	6.529	6.529	-	-
s.g. (n=1)	Cajamarca	E11	3.781	3.781	-	-

s.g.: Sin grupo. No participan en el análisis estadístico

n: cantidad de ecotipos

ANEXO 45: Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas para los grupos del Anexo 44 usando la prueba estadística Bartlett

Bartlett	
1. Hipótesis	$H_o: \sigma_i^2 = \sigma^2 \quad \forall i = L1, L2, \dots, L6.$ $H_a: \sigma_i^2 \neq \sigma^2 \quad \text{para al menos algún } i.$
2. Significancia	$\alpha = 5\% = 0.05$
3. Número de tratamientos	$t = 6$
4. Estadístico de prueba calculado	$Q = 2.47$
5. Chi-Cuadrado	$X_{(\alpha; t-1)}^2 = 11.07$
6. Decisión	<p>Si $Q < X^2$, entonces no se rechaza la H_o, caso contrario se rechaza la H_o.</p> <p>$2.47 < 11.07$, esto implica no rechazar la H_o.</p>
7. Conclusión	<p>Con un nivel de significación de 0.05 no se rechaza la H_o, por lo tanto no se puede afirmar que las varianzas sean heterogéneas.</p>

ANEXO 46: Resultado de la prueba de análisis de varianza entre los grupos del Anexo 44

Análisis de varianza	
1. Hipótesis	$H_o: \mu_i = \mu \quad \forall i = L1, L2, \dots, L6$ $H_a: \mu_i \neq \mu \quad \text{para al menos algún } i.$
2. Significancia	$\alpha = 5\% = 0.05$
3. Número de tratamientos	$t = 6$
4. Grados de libertad del error	$gle = 39$
5. Estadístico de prueba calculado	$F_c = 0.52$
6. Valor tabular	$F_{(\alpha; t-1; gle)} = 2.46$
7. P-valor	$\rho = 0.758$
8. Decisión	<p>Si $F_c > F$, entonces se rechaza la H_o, caso contrario no se rechaza la H_o.</p> <p>$0.52 < 2.46$, esto implica no rechazar la H_o.</p>
9. Conclusión	Con un nivel de significación de 0.05 no se rechaza la H_o , por lo tanto las medias no son significativamente diferentes.

ANEXO 47: Análisis de varianza entre los grupos del Anexo 44

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcal	Fcrit	Sig.
Entre grupos	5	5.24	1.05	0.52	2.46	n.s.
Error	39	78.44	2.01			
Total	44	83.69				

n.s.: La diferencia no es significativa

ANEXO 48: Evaluación de precisión en la cuantificación del contenido de lupanina y esparteína (%) en b.s. de los granos desamargados de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*)

Ecotipos de tarwi como grano desamargado	Contenido de lupanina (%)				Contenido de esparteína (%)			
	Promedio \pm DE (*) (%) en b.s.	CV (%) (*)	DRM (%) (**)	Precisión (***)	Promedio \pm DE (*) (%) en b.s.	CV (%) (*)	DRM (%) (**)	Precisión (***)
D1	0.0391 \pm 0.0039	10.0602	-	>5%	0.0079 \pm 0.0009	11.4674	-	>5%
D2	0.0200	-	-	-	<LC	-	-	-
D3	0.0521	-	5.3093	>2%	0.0083	-	1.8955	<2%
D4	0.0185 \pm 0.0007	3.7681	-	<5%	0.0072	-	5.1447	>2%
D5	0.0215	-	5.1954	>2%	0.0088	-	6.3224	>2%
D6	0.0168	-	6.6062	>2%	0.0073 \pm 0.0001	0.8971	-	<5%
D7	0.0185	-	-	-	0.0094	-	7.4400	>2%
D8	0.0183 \pm 0.0025	13.7226	-	>5%	0.0082	-	4.7527	>2%
D9	0.0159	-	8.1505	>2%	<LC	-	-	-
D10	0.0306	-	8.1697	>2%	0.0080	-	4.8951	>2%
D11	0.0160	-	-	-	0.0075 \pm 0.0002	2.4675	-	<5%
D12	<LC	-	-	-	<LC	-	-	-
D13	0.0184	-	2.7393	>2%	0.0080	-	0.4928	<2%
D14	0.0366	-	9.4198	>2%	0.0077	-	1.2795	<2%
D15	0.0583 \pm 0.0046	7.9346	-	>5%	0.00902 \pm 0.0003	3.9078	-	<5%
D16	0.0316	-	8.5009	>2%	0.0093	-	0.4147	<2%
D17	0.0172	-	6.6516	>2%	0.0081	-	0.8487	<2%

«continuación»

D18	0.0134	-	-	-	0.0078	-	0.5096	<2%
D19	0.0251 ± 0.0024	9.5771	-	>5%	0.0089	-	4.8409	>2%
D20	0.0158	-	-	-	0.0076	-	1.3013	<2%
D21	0.0191	-	-	-	0.0078	-	1.1531	<2%
D22	0.0290	-	0.6040	<2%	0.0083	-	1.1322	<2%
D23	0.0229	-	-	-	0.0078	-	-	-
D24	0.0223	-	2.0080	>2%	0.0075	-	2.3362	>2%
D25	0.0155	-	0.4417	<2%	0.0100 ± 0.0002	1.5892	-	<5%
D26	0.0143	-	-	-	0.0074	-	1.8152	<2%
D27	<LC	-	-	-	<LC	-	-	-
D28	0.0210	-	-	-	0.0081	-	-	-
D29	<LC	-	-	-	0.0074 ± 0.0000	0.5786	-	<5%
D30	<LC	-	-	-	0.0079	-	-	-
D31	0.0593	-	10.1424	>2%	0.0125	-	1.6324	<2%
D32	<LC	-	-	-	<LC	-	-	-
D33	0.0145	-	-	-	<LC	-	-	-
D34	0.0210 ± 0.0028	13.3839	-	>5%	0.0074	-	-	-
D35	0.0161	-	2.9171	>2%	<LC	-	-	-
D36	0.0147	-	-	-	<LC	-	-	-
D37	0.0258	-	2.1238	>2%	0.0093 ± 0.0002	1.7861	-	<5%
D38	0.0178	-	5.3140	>2%	0.0076	-	-	-
D39	0.0141	-	-	-	0.0078	-	-	-
D40	0.0478	-	-	-	0.0102	-	-	-
D41	0.0152	-	0.5014	<2%	0.0076	-	1.5543	<2%
D42	0.0149	-	2.3451	>2%	0.0086	-	6.0801	>2%
D43	0.0262 ± 0.0033	12.4634	-	>5%	0.0079	-	3.5835	>2%

«continuación»

D44	0.0389	-	4.1220	>2%	0.0079	-	0.5904	<2%
D45	0.0214	-	11.4407	>2%	0.0097	-	0.1022	<2%
D46	<LC	-	-	-	0.0083 ± 0.0007	8.7460	-	>5%
D47	0.0840	-	7.9607	>2%	0.0199	-	1.0674	<2%
D48	0.0151	-	-	-	<LC	-	-	-
D49	0.0180 ± 0.0019	10.6730	-	>5%	<LC	-	-	-
Suma de medidas de precisión	-	81.58	110.66	-	-	31.44	61.18	-

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variabilidad

DRM: Desviación relativa de la media

(*) Para los casos de 3 repeticiones

(**) Para los casos de 2 repeticiones

(***) Para evaluar el coeficiente de variabilidad: <5% es valor aceptable de precisión, >5% es valor no aceptable de precisión. Para evaluar la desviación relativa de la media: <2% es valor aceptable de precisión, >2% es valor no aceptable de precisión

ANEXO 49: Cuantificación del contenido de alcaloides totales (%) en b.s. de granos amargos, alcaloides residuales (%) en b.s. de granos desamargados y pérdida de alcaloides tras desamargado acuoso (%)

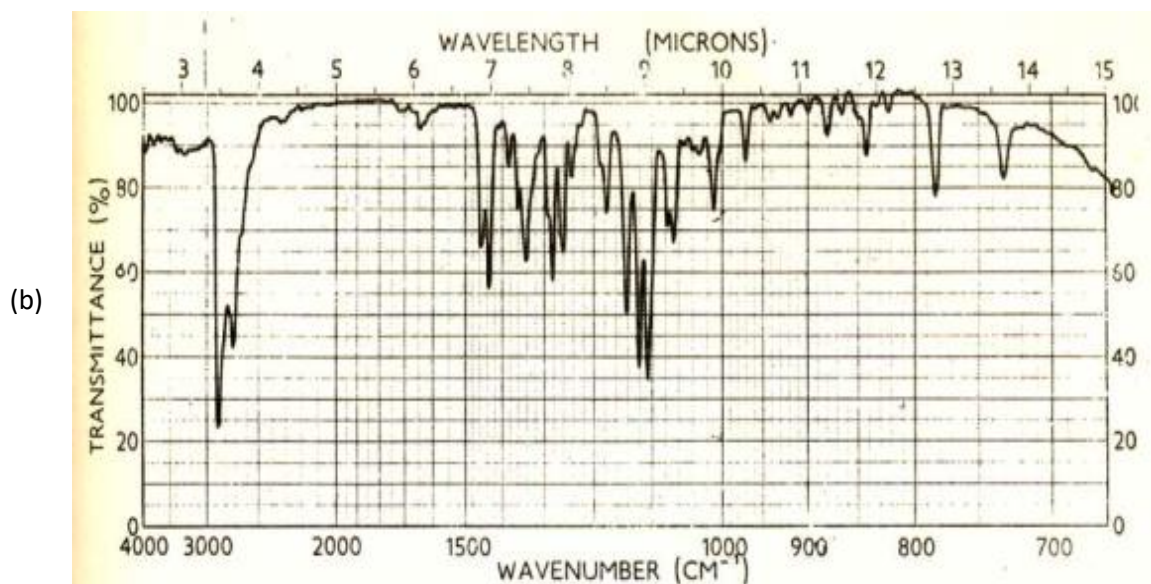
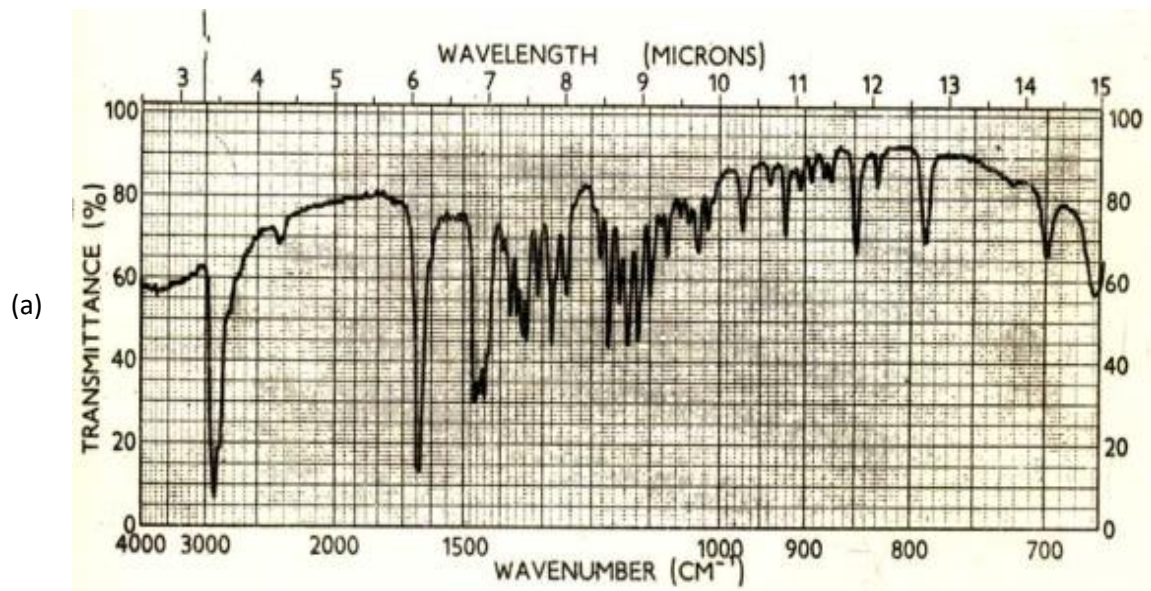
Ecotipos de tarwi	Contenido de alcaloides totales (%) (b.s.)	Contenido de alcaloides residuales (%) (b.s.)	Pérdida de lupanina (%) (b.s.)	Pérdida de esparteína (%) (b.s.)	Pérdida total de alcaloides (%) (b.s.)
E1	1.650	0.047	97.514	89.848	97.151
E2	2.294	0.020	99.073	NC	99.127
E3	4.762	0.060	98.845	96.753	98.733
E4	2.382	0.026	99.175	94.817	98.920
E5	4.539	0.030	99.478	97.925	99.332
E6	4.299	0.024	99.579	97.643	99.439
E7	5.034	0.028	99.607	97.059	99.445
E8	4.892	0.026	99.607	96.682	99.458
E9	4.835	0.016	99.659	NC	99.671
E10	5.937	0.039	99.461	96.776	99.349
E11	3.781	0.024	99.548	96.812	99.377
E12	5.798	<LC	NC	NC	NC
E13	4.280	0.026	99.549	95.923	99.383
E14	2.318	0.044	98.350	92.366	98.091
E15	4.365	0.067	98.599	95.611	98.460
E16	3.004	0.041	98.777	97.786	98.638
E17	3.113	0.025	99.358	98.149	99.188
E18	2.431	0.021	99.389	96.618	99.125
E19	5.383	0.034	99.513	95.959	99.368
E20	6.440	0.023	99.745	96.817	99.636
E21	4.172	0.027	99.515	96.583	99.353
E22	1.341	0.037	97.716	88.687	97.219
E23	1.484	0.031	98.317	93.719	97.933

«continuación»

E24	4.604	0.030	99.495	95.910	99.352
E25	3.367	0.025	99.508	95.511	99.243
E26	1.469	0.022	98.920	95.024	98.527
E27	3.126	<LC	NC	NC	NC
E28	1.411	0.029	98.352	94.267	97.945
E29	4.178	0.007	NC	95.580	99.823
E30	4.549	0.008	NC	96.992	99.826
E31	4.306	0.072	98.523	95.758	98.334
E32	4.159	<LC	NC	NC	NC
E33	5.111	0.015	99.696	NC	99.716
E34	3.113	0.028	99.300	93.581	99.089
E35	3.579	0.016	99.527	NC	99.550
E36	3.831	0.015	99.592	NC	99.616
E37	1.150	0.035	97.509	91.865	96.949
E38	1.280	0.025	98.463	93.680	98.012
E39	6.529	0.022	99.780	93.351	99.664
E40	2.786	0.058	98.112	96.005	97.919
E41	2.042	0.023	99.205	93.971	98.882
E42	5.438	0.023	99.718	94.878	99.569
E43	3.112	0.034	98.971	98.599	98.904
E44	2.146	0.047	98.088	93.083	97.820
E45	3.193	0.031	99.274	96.051	99.027
E46	3.414	0.008	NC	91.357	99.756
E47	3.259	0.104	97.097	94.537	96.811
E48	2.932	0.015	99.467	NC	99.484
E49	4.461	0.018	99.572	NC	99.596

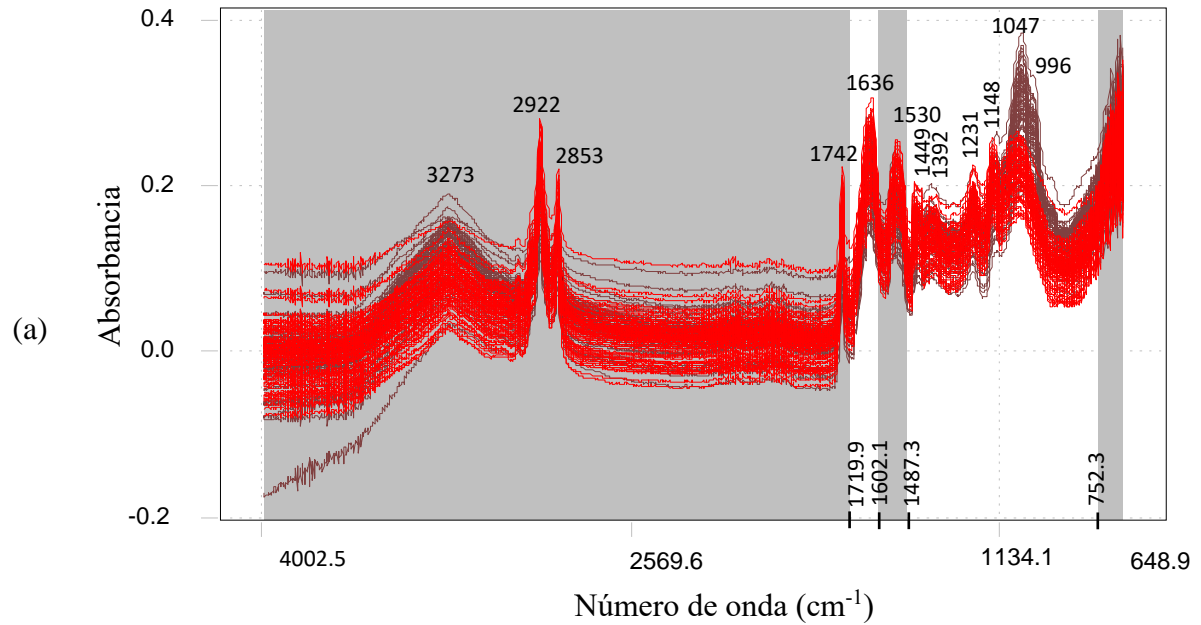
NC: No cuantificado. No se puede cuantificar el porcentaje de pérdida porque el valor de alcaloide en el grano desamargado está por debajo del LC (<LC)

ANEXO 50: Espectros MIR de: (a) lupanina y (b) esparteína, del *Lupinus Paniculatus* Desr. de Argentina del estudio de Mammarella (1970)

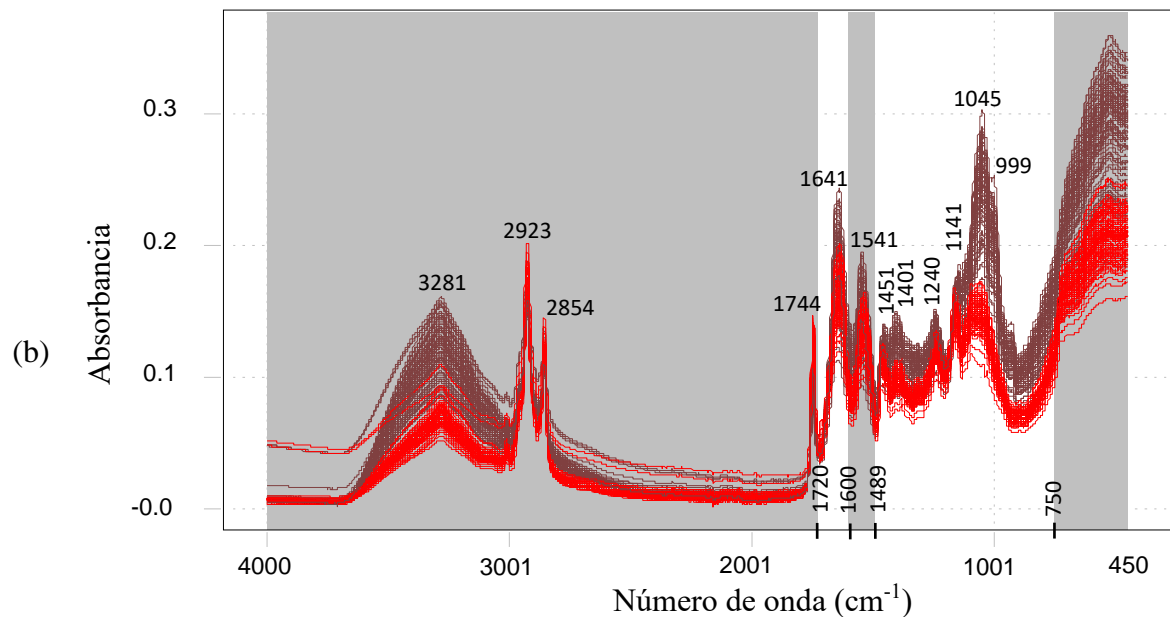


ANEXO 51: Total de espectros FT-MIR del conjunto de muestras usadas en el análisis multivariado SIMCA y zona seleccionada para los análisis SIMCA y PLS

Las muestras se indican en los Anexos 52 y 53, para el análisis con los espectros del portátil (a) y con el de mesa (b) respectivamente. La zona blanca es la zona incluida y las zonas plomas son las zonas excluidas



— Espectros de tarwi amargo — Espectros de tarwi desamargado



— Espectros de tarwi amargo — Espectros de tarwi desamargado

ANEXO 52: Relación de ecotipos y repeticiones usados en el modelo de clasificación SIMCA a partir de los espectros del espectrómetro portátil

Códigos de tarwi amargos (n° de repeticiones)	Códigos de tarwi desamargados (n° de repeticiones)
<i>Muestras usadas para la clasificación SIMCA</i>	
A6(2), A7(2), A8(2), A9(2), A10(2), A11(2), A12(2), A13(2), A14(2), A15(2), A16(2), A17(2), A18(2), A19(2), A20(2), A21(2), A22(2), A23(2), A24(2), A25(2), A26(2), A27(2), A28(2), A29(2), A30(2), A31(2), A32(2), A33(2), A34(2), A35(2), A36(2), A37(2), A38(2), A39(2), A40(2), A41(2), A42(2), A43(2), A44(2), A45(2), A46(2), A47(2)	D5(2), D6(2), D7(2), D8(2), D9(2), D10(2), D11(2), D12(2), D13(2), D14(2), D15(2), D16(2), D17(2), D18(2), D19(2), D20(2), D21(2), D22(2), D23(2), D24(2), D25(2), D26(2), D27(2), D28(2), D29(2), D30(2), D31(2), D32(2), D33(2), D34(2), D35(2), D36(2), D37(2), D38(2), D39(2), D40(2), D41(2), D42(2), D43(2), D44(2), D45(2), D46(2)
Total de ecotipos = 42 Total de espectros = 84	Total de ecotipos = 42 Total de espectros = 84
<i>Muestras usadas para la predicción SIMCA</i>	
A1(2), A2(2), A3(2), A4(2), A5(2)	D1(2), D2(2), D3(2), D4(2), D47(2)
Total de ecotipos = 5 Total de espectros = 10	Total de ecotipos = 5 Total de espectros = 10

Ver en Anexo 1 información de los ecotipos

ANEXO 53: Relación de ecotipos y repeticiones usados en el modelo de clasificación SIMCA a partir de los espectros del espectrómetro de mesa

Códigos de tarwi amargos (n° de repeticiones)	Códigos de tarwi desamargados (n° de repeticiones)
<i>Muestras usadas para la clasificación SIMCA</i>	
A6(2), A7(2), A8(2), A9(2), A10(2), A11(2), A12(2), A13(2), A14(2), A15(2), A16(2), A17(2), A18(2), A19(2), A20(1), A21(2), A22(1), A23(2), A24(2), A25(2), A26(2), A27(2), A28(2), A29(2), A30(2), A31(2), A32(2), A33(2), A34(2), A35(2), A36(2), A37(2), A38(2), A39(2), A40(2), A41(2), A42(2), A43(2), A44(2), A45(1), A46(2), A47(1), A48(2), A49(2)	D6(2), D7(2), D8(2), D9(2), D10(2), D11(2), D12(2), D13(2), D14(1), D15(1), D16(2), D17(2), D18(2), D19(2), D20(2), D21(2), D22(2), D23(2), D24(2), D25(2), D26(2), D27(2), D28(2), D29(2), D30(2), D31(2), D32(2), D33(2), D34(2), D35(2), D36(2), D37(2), D38(2), D39(2), D40(2), D41(2), D42(2), D43(2), D44(2), D45(2), D46(2), D48(2), D49(2)
Total de ecotipos = 44 Total de espectros = 84	Total de ecotipos = 43 Total de espectros = 84

«continuación»

Muestras usadas para la predicción SIMCA

A1(2), A2(2), A3(2), A4(2), A5(2)

D1(2), D2(2), D3(2), D4(2), D47(2)

Total de ecotipos = 5

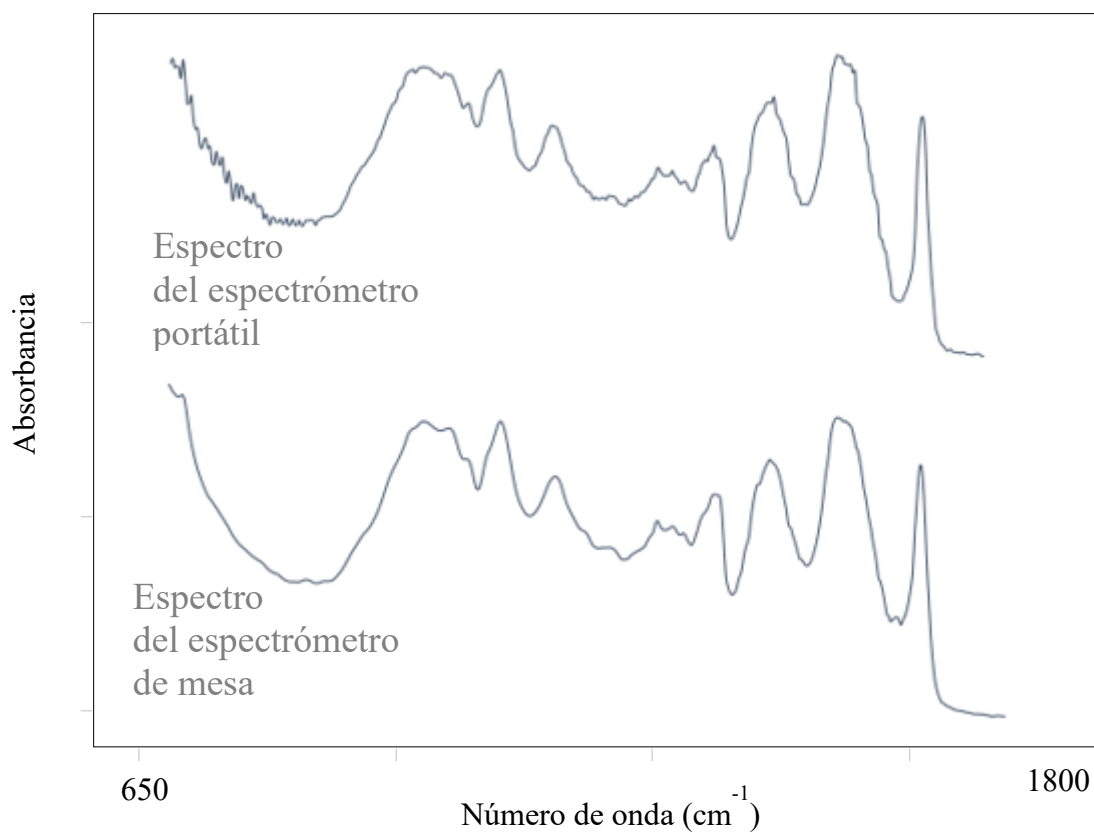
Total de ecotipos = 5

Total de espectros = 10

Total de espectros = 10

Ver en Anexo 1 información de los ecotipos

ANEXO 54: Espectros iniciales (sin el pre-tratamiento de la transformación) del ecotipo D2 obtenido por espectrómetro portátil y de mesa



**ANEXO 55: Relación de ecotipos y repeticiones usados en el modelo de calibración
PLS a partir de los espectros del espectrómetro portátil**

Códigos de tarwi amargos (n° de repeticiones)	Códigos de tarwi desamargados (n° de repeticiones)
A1(2), A2(2), A4(2), A6(2), A7(2), A9(2), A11(1), A13(2), A14(2), A15(1), A16(2), A17(2), A18(1), A21(2), A22(2), A23(2), A24(1), A25(1), A26(2), A27(2), A28(2), A29(1), A30(1), A31(2), A32(1), A34(2), A35(2), A36(2), A37(1), A38(2), A40(2), A41(1), A42(1), A43(2), A44(2), A45(2), A46(2), A47(1)	D1(1), D2(2), D3(1), D4(1), D5(2), D6(1), D7(2), D9(1), D11(2), D14(1), D15(2), D16(1), D17(1), D18(1), D19(2), D20(1), D21(2), D22(1), D23(2), D24(1), D25(2), D26(2), D29(2), D30(2), D33(2), D34(2), D35(1), D36(1), D37(1), D39(2), D40(2), D41(2), D43(1), D44(1), D45(1), D46(2)
Total de ecotipos = 38 Total de espectros = 64	Total de ecotipos = 36 Total de espectros = 54
Total de códigos (muestras) = 74 Total de espectros = 118	

Ver en Anexo 1 información de los ecotipos

**ANEXO 56: Relación de ecotipos y repeticiones usados en el modelo de calibración
PLS a partir de los espectros del espectrómetro de mesa**

Códigos de tarwi amargos (n° de repeticiones)	Códigos de tarwi desamargados (n° de repeticiones)
A1(2), A3(2), A4(1), A5(1), A6(2), A7(1), A8(1), A9(2), A11(2), A13(1), A14(2), A16(1), A17(2), A18(2), A21(2), A22(1), A23(1), A25(1), A26(1), A27(2), A28(1), A29(1), A30(2), A31(1), A32(1), A33(2), A34(2), A35(2), A36(2), A37(2), A38(2), A40(2), A41(1), A42(1), A43(2), A44(2), A45(1), A47(1), A48(2), A49(2)	D1(2), D2(2), D3(2), D4(2), D5(2), D6(2), D7(2), D8(2), D10(2), D11(2), D13(2), D14(1), D15(1), D16(2), D17(2), D18(2), D19(1), D20(2), D21(2), D22(2), D23(2), D24(2), D25(2), D26(2), D29(2), D30(2), D31(2), D33(2), D34(2), D35(2), D36(2), D37(2), D38(2), D39(2), D40(2), D41(2), D42(2), D43(2), D44(2), D45(2), D46(2), D48(2), D49(2)
Total de ecotipos = 40 Total de espectros = 62	Total de ecotipos = 43 Total de espectros = 83
Total de códigos (muestras) = 83 Total de espectros = 145	

Ver en Anexo 1 información de los ecotipos

ANEXO 57: Factores óptimos de la calibración por el método PLS del contenido de alcaloides (%) en b.s.

Obtenido al usar los espectros del espectrómetro portátil (a) y del espectrómetro de mesa (b)

